

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**TAU-FLUVALİNAT'A MARUZ KALAN *Daphnia magna* 'da OKSİDATİF
STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi
Kübra AYDEMİR

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şule TATAR YOLCULAR

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Volkan KORKMAZ

TUNCELİ – 2022

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TAU-FLUVALİNAT'A MARUZ KALAN *Daphnia magna* 'da OKSİDATİF
STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra AYDEMİR
(190040002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şule TATAR YOLCULAR

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Volkan KORKMAZ

TUNCELİ- 2022

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TAU-FLUVALİNAT'A MARUZ KALAN *Daphnia magna* 'da OKSİDATİF
STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

**Kübra AYDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 26/05/2022 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Doç. Dr.
Şule TATAR YOLCULAR
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza:.....

Prof. Dr.
Gülşad USLU ŞENEL
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

İmza:.....

Doç. Dr.
Gökhan Önder ERGÜVEN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz: Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB020-18

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı "Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu"ndaki hükümlere tabidir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza

Kübra AYDEMİR

Danışman

Doç. Dr. Şule TATAR YOLCULAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tezimin oluşum ve yapım aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Şule TATAR YOLCULAR'a ve II. Danışmanlığımı üstlenen Dr. Öğr. Üyesi Volkan KORKMAZ'a,

Laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Fırat Üniversitesi'nin değerli öğretim elemanları Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ ve Arş. Gör. Görkem KIRMIZIKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşantım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her türlü desteklerini üzerimde hep hissettiğim, hep yanımda olan ve hayatım boyunca minnettar kalacağım sevgili ailem; annem Nezahat GİRGİN'e, kız kardeşim Büşra ÖZESMER'e ve sevgili eşim Ahmet AYDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kübra AYDEMİR
TUNCELİ-2022

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR VE SEMBOLLER LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yapılan Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	2
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Pestisitler	4
2.1.1. Pestisitlerin tarihçesi ve kullanımı	4
2.1.2. Pestisitlerin hedef olmayan canlılar üzerine etkileri	4
2.1.3. Pestisitlerin insanlar üzerine etkileri	5
2.1.4. Pestisitlerin çevreye olan etkileri	5
2.2. İnsektisitler	6
2.2.1. Piretroidlerin genel özellikleri.....	7
2.2.2. Piretroidlerin etki mekanizması.....	7
2.2.3. Tau-fluvalinat	7
2.2.3.1. Fluvalinat'ın ekolojik etkileri.....	9
2.3. Cladocera.....	10
2.3.1. <i>Daphnia magna</i> (Cladocera, Crustacea)	10
2.3.2. <i>Daphnia magna</i> 'nın sistematığı	11
2.3.3. <i>Daphnia</i> sp'nin morfolojisi ve fizyolojisi.....	12
2.3.4. <i>Daphnia magna</i> 'nın sucul ekosistemler için ekolojik önemi.....	12
2.4. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	14
2.4.2. Katalaz (KAT).....	14
2.4.3. Glutasyon S-transferaz (GST)	15
2.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	15
2.5.1. Redükte glutasyon (GSH).....	15
2.5.2. Malondialdehid (MDA).....	16
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Model Organizma <i>Daphnia magna</i>	17
3.2. Tau-fluvalinat Temini.....	18
3.3. Akut Toksisite Deneyi (LC ₅₀)	18
3.4. Subletal Tau-fluvalinat Konsantrasyon Uygulamaları	19
3.5. Glutasyon Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu	19
3.6. GSH Miktarının HPLC Cihazında Ölçümü.....	20
3.7. Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Ölçümü	20
3.8. Lipidlerin Ekstraksiyonu	21
3.9. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü	21
3.10. Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü	22
3.11. Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçümü	22
3.12. İstatistiksel Analizler	22

4. BULGULAR	24
4.1. Akut Toksisite Değerleri	24
4.2. Enzimatik Antioksidan Değerleri	25
4.2.1. GST seviyesi	25
4.2.2. KAT seviyesi	26
4.2.3. SOD seviyesi	27
4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Değerleri	28
4.3.1. GSH seviyeleri	28
4.3.2. MDA seviyeleri	28
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Fluvalinat'ın yapısal formülü.	8
Şekil 2.2. <i>Daphnia magna</i> 'nın genel yapısı	12
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan <i>Daphnia magna</i> 'da GST seviyelerindeki değişiklikler.....	26
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan <i>Daphnia magna</i> 'da KAT seviyelerindeki değişiklikler.....	27
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan <i>Daphnia magna</i> 'da SOD seviyelerindeki değişiklikler.....	28
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan <i>Daphnia magna</i> 'da GSH seviyelerindeki değişiklikler.....	29
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan <i>Daphnia magna</i> 'da MDA seviyelerindeki değişiklikler.....	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Fluvalinat'ın genel özellikleri	8
Tablo 4.1. Tau-fluvalinat'ın <i>Daphnia magna</i> üzerindeki akut toksisite değerleri	24
Tablo 4.2. Tau-fluvalinat'a maruz bırakılan <i>Daphnia magna</i> 'da bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitesindeki değişimler.....	25



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Stok <i>D. magna</i> akvaryumları.....	17
Resim 3.2. Pestisit uygulama.....	18
Resim 3.3. Hettich Universal 32R	19
Resim 3.4. Shimadzu RID-10A	20
Resim 3.5. ShimadzuUVmini-1240	21
Resim 3.6. Thermo SCIENTIFIC ORION 3 STAR.....	22



KISALTMALAR VE SEMBOLLER LİSTESİ

ASTM	: Amerikan Standartları Birliği
BHC	: Benzen Hekzaklorür
C₂₆H₂₂ClF₃N₂O₃	: Fluvalinat
DDT	: Dikloro Difenol Trikloroethan
EPA	: Eikozapentaenoik Asit
Fe⁺³	: Ferrik İyon
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₃PO₄	: Fosforik Asit
KAT	: Katalaz
Kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mPa	: Mega Pascal
NaCl	: Sodyum Klorür
NaClO₄	: Sodyum Perklorat
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Serbest Süperoksit Radikal Anyonu
°C	: Santigrat Derece
pH	: Potansiyel Hidrojen
ppm	: Milyonda Bir
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
US EPA	: ABD Çevre Koruma Kurumu
v/v	: Hekzan/İzopropil
γ-GCS	: γ-Glutamil Sistein Sentaz
μm	: Mikrometre

ÖZET

Son yıllarda pestisit kullanımı ciddi oranda artmış ve bu artış pestisitlerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerindeki artışı da beraberinde getirmiştir. Sentetik bir piretroid olan Tau-fluvalinat'ın *Daphnia magna*'daki oksidatif stres düzeyinin tespiti bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla canlı materyalini oluşturan *D. magna* örnekleri farklı konsantrasyonlar da pestisit içeren ortamlarda ile 24 ve 96 saat süre ile çalışılmıştır. Fluvalinat'ın oksidatif etkilerini belirlemek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), Glutasyon S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ve Glutasyon (GSH) ve malondialdehid (MDA) düzeyleri tespit edilmiştir.

SOD aktiviteleri 24 saat sonrasında C grubu hariç tüm gruplarda azalmıştır ve 96 saat sonrasında C grubu hariç tüm gruplarda artmıştır. Bu azalma 24 saat sonrasında A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$). 96 saat sonrasında ise SOD seviyesindeki artış ve azalışlar tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$). SOD aktivitesindeki değişimler farklı uygulama sürelerine göre kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). KAT düzeyleri kontrolle kıyaslandığında her iki grupta da 24 ve 96 saatlik uygulama süreleri sonrasında azalmıştır. ($p<0.05$). Bu azalış 24 saat sonrasında A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$) C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$). 96 saat sonrasında ise KAT seviyesindeki azalışlar tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise sadece B ve C grubundaki azalış maruz kalma süresine göre anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0.05$). GSH düzeyleri kontrolle kıyaslandığında 24 saat sonrasında tüm gruplarda azalmıştır ($p<0.05$). 96 saat sonrasında sadece A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri kıyaslandığında ise kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$). GST düzeyleri kontrolle kıyaslandığında 24 saat sonrasında tüm gruplarda azalmıştır. ($p<0.05$). Kontrolle kıyaslandığında 96 saat sonrasında tüm gruplarda artmıştır. Maruz kalma süreleri kıyaslandığında ise kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). MDA düzeyleri kontrolle kıyaslandığında 24 saat sonrasında tüm gruplarda azalmıştır ($p<0.05$). 96 saat sonrasında sadece A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri kıyaslandığında ise kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

Enzim aktivitelerinin farklı konsantrasyon ve farklı uygulama sürelerine bağlı olarak değişim gösterdiği saptanmıştır. Tau-fluvalinat'a karşı *D. magna* dokularında SOD, KAT ve GST enzimleri ile GSH ve MDA düzeylerindeki değişikliklerin yararlı birer biyobelirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Daphnia magna*, Oksidatif stres, Tau-fluvalinat, Pestisit, Enzim

ABSTRACT

In recent years, the use of pesticides has been increasing consciously, but this use is unconsciously damaging to organisms. Determination of the oxidative stress level of Fluvalinate, a synthetic pyrethroid on *Daphnia magna* is the purpose of this study. For this purpose, individuals of *D. magna* which make up living materials were studied at different concentrations for 24 and 96 hours. To determine oxidative effects of Fluvalinate, Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathion S-Transferase (GST) enzyme activities and levels of Glutathion (GSH) and Malondialdehyde (MDA) were detected.

SOD activities decreased in all groups except group C after 24 hours and increased in all groups except group C after 96 hours. This decrease was statistically significant ($p < 0.05$) in groups A and B after 24 hours and insignificant in group C ($p > 0.05$). After 96 hours, increases and decreases in SOD levels were found to be significant in all groups ($p < 0.05$). The changes in SOD activity were statistically significant in all groups except the control according to different application periods. ($p < 0.05$). CAT levels were decreased after 24 and 96 hour treatment periods in both groups when compared to control ($p < 0.05$). This decrease was statistically significant ($p < 0.05$) in groups A and B after 24 hours and insignificant in group C ($p > 0.05$). After 96 hours, decreases in CAT levels were found to be significant in all groups ($p < 0.05$). When the exposure times are compared; only the decrease in groups B and C was significant according to the exposure time ($p < 0.05$). GSH levels decreased in all groups after 24 hours compared to the control ($p < 0.05$). It decreased only in group A and increased in groups B and C after 96 hours ($p < 0.05$). The changes in GSH activity were statistically significant in all groups except the control according to different application periods. ($p < 0.05$). GST levels decreased in all groups after 24 hours compared to the control ($p < 0.05$). It increased in all groups after 96 hours compared to the control group. The changes in GST activity were statistically insignificant in all groups except the control according to different application periods ($p > 0.05$). MDA levels decreased in all groups after 24 hours compared to the control ($p < 0.05$). It decreased only in group A and increased in groups B and C after 96 hours ($p < 0.05$). The changes in MDA activity were statistically significant in all groups except the control according to different application periods. ($p < 0.05$).

It was determined that enzyme activities changed depending on different concentrations and different durations of application. Against Tau-fluvalinat, changes in the levels of SOD, CAT and GST enzymes and GSH and MDA in *Daphnia magna* tissues have been shown to be useful as biomarkers.

Key words: *Daphnia magna*, Oxidative stress, Tau-fluvalinat, Pesticide, Enzyme

1. GİRİŞ

Tarım alanındaki üretim, aqua kültür ve toplum sağlığındaki faydaları bilindikçe pestisit kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Atamanalp ve Yanık, 2001). Ancak pestisitlerin rastgele kullanımları neticesinde geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarıyla ekolojik sistemin dengesini bozmasının yanı sıra su, toprak, hava kirlenmesine neden olmaktadır. Böylece de ekonomik yönden önemli bir alanı kapsayan ve balıkları da kapsayan çoğu hedef dışı organizma zarar görmektedir (Oruç ve Üner, 1999). Tau-fluvalinat, $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ kimyasal formülüne sahip sentetik bir piretroid kimyasal bileşiktir. Sentetik piretroidler, insektisitler arasında en çok kullanılan gruplardan biridir. Organik fosforlu ve neonicotinoid grubundaki bir takım ilaçlar doğal dengeyi bozabilmektedir (Portakaldalı ve Satar, 2015; Satar ve ark., 2018). Faydalı böcek popülasyonu üzerinde bu insektisitlerin yan etkisi ve zararlı böceklerin bu insektisitlere karşı direnç geliştirmeleri ve çevresel zararlarından dolayı çoğu pestisit yasaklanması, sentetik piretroid grubundaki insektisitlerin kullanım alanını daha da genişletmiştir (Satar ve ark., 2013; Satar ve ark., 2018). Tau-fluvalinat sentetik piretroid (3A) grubunda bulunan ve son yıllarda ruhsatlanmış piretroid grubu bir insektisittir. Bunlar piretrum papatyalarından (*Chrysanthemum* spp.) ekstrakte edilen 6 piretrinden meydana gelmektedir. Doğal piretrinler çiçeklerde bulunan kimyasallardandır (Johnson ve ark., 2006). Son 30 yılda; memeliler üzerindeki düşük toksik etkisi, hızla etki göstermesi, geniş bir spektrumunun olması ve biyolojik birikim potansiyelinin düşük olması nedeniyle kullanımları artmıştır. Artan pestisit kullanımıyla birlikte yeni piretroid insektisitler geliştirilmeye başlanmıştır (Naumann, 1990). Bu gruptaki insektisitler, türlere göre değişim göstermekle birlikte, hedef organizma için maksimum toksite ve yararlı organizmalar için düşük toksisiteye neden olabilmektedir (Johnson ve ark., 2006).

Tarımsal ve ev araçları için piretroidler geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kullanım sıklığındaki en önemli avantajı, böceklerle karşı yüksek oranda toksik etki gösterirken, hızlı metabolizmaları dolayısıyla memelilerde düşük oranda toksik olması ve toprak bünyesinde birikim yapmamasıdır (Kakko, 2004). Bunun temel nedeni de bu piretroidlerin seçici toksisitesinde asıl mekanizmanın, böceklerin sinir sisteminde bulunan sodyum kanallarının piretroidlere karşı yüksek oranda hassas olmasıdır (Song ve Narahashi, 1996).

Serbest radikaller, organizmalarda her zaman oluşan ve antioksidan savunma sistemi sayesinde giderilen moleküllerdir. Serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan sistem

tarafından giderilmesi arasında oksidatif denge olarak adlandırılan bir denge vardır. Oksidatif dengenin sağlanmadığı durumlarda organizmalar, bu radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görür. Antioksidan savunma mekanizmasının yeterli olmaması ya da serbest radikal oluşumunun artması durumunda oksidatif stres ortaya çıkar (Kayış, 2010).

Aerobik organizmalar, çeşitli dış çevresel etkiler sonucu olarak ya da normal metabolik aktiviteleri boyunca meydana gelen toksik oksijen ara ürünlerinin neden olduğu oksidatif hasarların engellenmesi için enzim yapısında var olan ve enzim yapısında var olmayan savunma sistemlerine sahiptirler.

Stres koşullarında ortaya çıkan O₂ radikallerine karşı gelişen enzimatik antioksidantlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)'dır (Ketterer, 2001). Enzimatik olmayan antioksidantlar ise redükte glutatyon (GSH; L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin), karotenoidler ve flavonoidleri içermektedir (Çaylak, 2011).

Tatlı su ekosistemlerinin hayati bir bileşeni olan *Daphnia* gibi zooplanktonlar, fitoplanktonların birincil avcılarıdır ayrıca kendilerinden daha büyük avcılar için ise çok önemli bir besin kaynağıdır. Kısa ömürleri, hızlı üremeleri, geniş yaşam alanları, kolay kültürlenme ve kirlenici maddelere duyarlılığı gibi benzersiz özellikleri, *Daphnia*'yı suda yaşayan organizmaların ekolojisi, fizyolojisi ve toksikolojisini araştırmak için en uygun model organizma haline getirmiştir. (Liu ve ark., 2020). *Daphnia*'lar, uluslararası çevre koruma kuruluşları tarafından da (OECD, ASTM, US EPA) çeşitli akut ve kronik toksisite testi protokolleri için model organizma olarak kabul edilmektedir (Sousa ve Nunes, 2020).

1.1. Yapılan Çalışmanın Amacı ve Önemi

Sosyo-ekonomik, kültürel ve teknoloji alanlarında gerçekleşen değişimler yüzyılın koşulları doğrultusunda insanların hayatındaki her alana etki etmeye devam etmektedir. Değişimin devam etmesi nedeniyle hava ve toprak kirliliğinin yanı sıra su kirliliği problemi de önemli unsurlar arasında yerini almaktadır. Su kirliliği probleminin ortaya çıkmasındaki nedenler arasında; kanalizasyon ve sanayi atıkları, zirai alanda kullanılan maddeler vb. sayılabilir. Tarımsal maddeler, akarsu kirliliğinin %50'lik kısmını oluşturmaktadır (Cook ve ark., 1995; Alberdi ve ark., 1996).

Yapılan bu tez çalışmasının amacı Tau-fluvalinat'ın farklı dozlarına maruz kalan *D. magna*'da oluşabilecek oksidatif stres düzeyinin belirlenmesidir. Ayrıca, bitkinin strese

karşı savunma sistemlerinde GSH ve MDA nonenzimatik antioksidan miktarlarındaki değişimler ve enzimatik antioksidanlardan SOD, KAT ve GST aktivitelerindeki değişiklikler belirlenerek kirliliğin birer biyobelirteci olarak söz konusu biomarkırların kullanılabilirlikleri de çalışmanın amaçlarından biridir.

Bu tez çalışması sonucunda; sentetik olarak hazırlanmış suya eklenen Tau-fluvalinat'ın, *D. magna*'nın GSH ve MDA düzeyleri ile SOD, KAT ve GST enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olup olmadığı da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile bu alanda yapılacak çalışmalar için ve alınacak önlemler konusunda bir ön çalışma olacak ve kaynak sağlayacaktır.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Pestisitler

Pestisitler büyük çoğunlukla organik sentez maddelerinden oluşmaktadır. “zararlı” anlamında kullanılan pestisit kelimesi Latince kökenlidir. Pestisit terimi, insan yaşamı için zararlı etkilere sahip ve canlı organizmaları yok etmek amacıyla kullanılan bileşikler ifade eder (McEven ve Stephenson, 1979).

2.1.1. Pestisitlerin tarihçesi ve kullanımı

19. yüzyılın sonlarında pestisit üretimi için organik kimya sayesinde en çok bilinen pestisit DDT ve diğer insektisit ve herbisitler bulunmuştur. II. dünya savaşının ardından dahu alanda büyük gelişmeler izlenmiştir (Carlson, 1994).

İnorganik yapıda olan bakır, kükürt, demir ve arsenik tuzları ilk kullanılan pestisitlerdendir. Bitki ekstraktları olan derris, nikotin ve piretrium organik yapıdaki pestisitler arasında yer almaktadır. Bunların büyük çoğunluğu yüksek düzeyde toksik etkiye sahiptir ve kullanımları tehlike arz etmektedir. Günümüzde binlerce aktif maddenin karışımı sonucu elde edilen 35000’e kadar preparat pestisit bulunmaktadır. (Carlson, 1994).

2.1.2. Pestisitlerin hedef olmayan canlılar üzerine etkileri

Hastalık yapıcı parazitler, tarımsal alanlardaki zararlı böcekler, insan ve hayvanların etrafındaki birçok haşere ile kontrolde kimyasal mücadele yöntemi olarak pestisitler kullanılmaktadır. Çoğu pestisit asıl hedeflerine yönelik seçici etkinlik gösterememekte ve insan ve hayvanlar üzerinde de toksik etki meydana getirebilmektedir.

Genel olarak pestisitler; kuş vb. canlıların üreme ve çoğalma potansiyelinde azalma; omurgalı ve omurgasız canlılar gibi bazı organizmalarda yaşamın sonlanması; hedef dışı organizmalarda direnç oluşumu ile böcek ve parazitler yoluyla insanlara hastalık taşıma; uzun vadeli etkileriyle ekosistem yapısı ve tür sayılarının değişimine etki ederler (Soyöz ve Özçelik, 2003).

2.1.3. Pestisitlerin insanlar üzerine etkileri

Mesleki zehirlenme ya da kaza ile meydana gelebilen pestisit maruziyeti insan sağlığı üzerinde birçok etkiye neden olmaktadır. Zehirlenme nedenleri arasında aşağıda belirtilen hususlar yer almaktadır;

- Depolama yöntemlerinin uygunsuz olması,
- Kaza sonucu pestisitlerin dağılması ve gıda maddelerinin kontamine olması,
- Pestisit kaplarının yeterince temizlenmemesi,
- Düzensiz yükleme ve taşıma yapılması,
- Bakım ve atıkların değerlendirilme işlemlerinde eksiklik,
- Pestisitlerle ilgili yeterli bilginin toplum tarafından bilinmemesi ve pestisitlerin toksisite etkilerinin bilinmemesi.

Sinir sistemini daha çok etkileyen kronik zehirlenmeler, karaciğere zarar vermektedir. İki şekilde pestisitlerin besinler içerisindeki kalıntılarının kronik toksisitesi araştırılmaktadır;

1. Kabul edilebilir günlük alım (mg/kg)
2. Maksimum kalıntı değerleri (ppm)

Pestisitlerin insanlarda gözlerde tahriş, dermatit, solunum yolu rahatsızlıkları, kasılma krizi, sperm gelişiminin olumsuz etkilenmesi gibi sonuçlara neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla kronik toksisite etkilerinden başka, insanlar üzerinde teratojenik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir (Kiely ve ark., 2004).

2.1.4. Pestisitlerin çevreye olan etkileri

Birçok kullanım alanı bulunan pestisitler, tarımsal alanlarda, bahçelerde ya da ormanlarda uygulanmaktadır. Bu yolla su, hava ve toprağa geçen pestisitler, bu ortamlarda yaşamını sürdüren organizmalara geçer ve burada dönüşüme uğrar. Pestisitlerin hareketi üzerinde iklimsel ve tarımsal şartların, pestisitlerin kimyasal yapısının, formülasyon tipinin, fiziksel özelliklerinin ve uygulama şeklinin etkili olduğu bilinmektedir.

Askıdaki maddelere ve suya bağlanan ilaç kalıntıları, dip sedimanlarında birikim yapar veya canlılar tarafından adsorbe edilir (Rand ve Petrocelli, 1985). Pestisitlerle yüksek oranda kontamine olmuş sularda oksijen yetersizliği ortaya çıkmaktadır. Sucul ortamda yaşayan canlılarda zehirlenmelere yol açmakla birlikte balık ve diğer canlıların toplu ölümlerine neden olmaktadır.

Tarımsal alanlarda herhangi bir kimyasal ilaç kullanılmadan yapılan üretimler %65 oranında ürün kaybına neden olmaktadır. Tarımda verimliliği dünya genelinde arttırmak amacıyla pestisit kullanımı zorunlu kılınmıştır (Öztürk, 1990). Çevre kirliliği problemini oluşturan ve çevresel kirleticiler arasında yer alan bu maddeler, tarımda önemli faydaları olduğu bilinmesine rağmen çevreye yayılması neticesinde canlılar için toksik etki oluşturmaktadır (Yazgan, 1997).

2.2. İnsektisitler

İnsektisitler böcek ve haşerelere karşı kullanılan bir çeşit pestisit olarak tanımlanır. Hedef organizmaların sinir sistemine etki eden kimyasal insektisitlerin tamamı nörotoksik etkiye sahiptir. Böceklerin merkezi sinir sistemleri (MSS) ileri düzeyde gelişmiş özelliğe sahip olmasıyla, memeli canlılarla benzer özelliklere sahiptir ve insektisitlerin etki mekanizmaları hedefledikleri organların tamamında aynıdır. Fakat söz konusu etki dozlama ile alakalıdır (Vural, 2005). Sentetik organik insektisitler, bitkisel insektisitler ve inorganik ve doğal insektisitler olmak üzere 3 grupta sınıflandırılabilirler.

Bunun yanında 1949 yılında alletrin, 1968 yılında tetrametrin ve 1973 yılında permetrin bulunmuştur (Öztürk, 1990).

1940 yıllarında sentetik pestisitlerin keşfiyle birlikte çevresel sorunlar ortaya çıkmış olup endişelerin artması ile birlikte bunun azaltılmasına yönelik çalışmalara başlanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerle sentetik ilaçların fizikokimyasal özellikleri kalıcılık özelliğini ortaya koymuştur. Sentetik ilaçların kullanımının artışı ile çok sayıda kuş ve balık ölümlerine yol açtığı ve buna bağlı olarak besin zincirinin son halkasında yer alan insanlara etkisinin yoğun bir şekilde ulaştığı tespit edilmiştir. Bu etkiler göz önüne alındığında bazı ülkelerde insektisitlerin kullanımı tamamen yasaklanmasına rağmen bazı ülkelerde kullanımına yönelik kısıtlamalar getirilerek önlem alınmaya çalışılmaktadır (Deveci, 2012).

2.2.1. Piretroidlerin genel özellikleri

Piretroidler, aktif piretrin bileşikleri üzerinde yapısal ve insektisit etkileri benzerlik gösteren sentetik maddelerdir. Kimyasal yapılarına göre, alpha-cyano grubu taşıyanlar ve taşımayanlar olmak üzere 2'ye ayrılırlar (Balcıoğlu ve ark., 2004).

Piretroidler, böceklerde yoğun toksik özellik gösterirken, memelilerin hızlı metabolizmalarından dolayı düşük toksik etki göstermesi ve toprakta birikim yapmaması en önemli avantajları arasında yer almaktadır (Kakko, 2004).

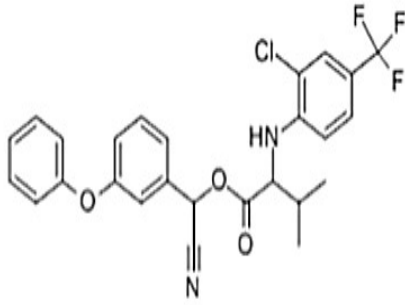
2.2.2. Piretroidlerin etki mekanizması

Piretroidlerin sodyum kanallarının açık kalmasına sebep vererek böcekleri felç edip öldürdükleri, pretroid grubunun sinir sisteminde aksonlardaki ilettime etki ettiği, zehirlenme belirtileri ve nörofizyolojik etkileri araştırmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Genellikle düşük sıcaklıklarda etkinliklerinin daha yüksek olduğu bilinmesine rağmen bazı piretroid grubunun sıcaklıkla doğru orantılı olarak etkilerinin arttığı belirlenmiştir (Song ve Narahashi, 1996).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki piretroidler, insan bünyesinde fazla metabolize olmadan hızlı bir şekilde vücuttan atılmaktadır ve mesleki olarak bu gruba maruz kalan insanların ürelerinde ana bileşiğin değişmediği insanlar üzerinde akut ve sistemik toksisite etkisinin düşük olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 1991). Alpha-cyano grubunu taşıyan piretroidlerin, taşımayan piretroidlere oranla vücuttan daha düşük hızla atıldığı belirlenmiştir. Piretroidlerin zehirlenme belirtileri, organik fosforluların belirtileri ile çok benzerdir. Bundan dolayı, tanı koymada dikkatli olunması gerekmektedir (Kakko 2004).

2.2.3. Tau-fluvalinat

Fluvalinat ilk olarak Tau-fluvalinat formlarından kaydedilmiştir. Fluvalinat sentetik bir piretrioiddir; sarı renkli, sıvı, su içerisinde kolay çözünmeyen ancak organik çözücülerle çözünen ve ışığa karşı oldukça kararlı bir maddedir (Kaya ve ark., 2002). Fluvalinat EPA toksisite II sınıfında ve orta derecede toksik bir bileşendir (URL-1, 2021). Fluvalinat'ın yapısal formülü Şekil 2.1'de, genel özellikleri ise Tablo 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Fluvalinat'ın yapısal formülü (Tomlin, 1995).

Tablo 2.1. Fluvalinat'ın genel özellikleri (Kidd ve James, 1991)

Görünüşü	Viskoz ve sarı
Genel Adı	Tau-fluvalinat
Kimyasal Adı	(RS)-alfa-siyano-3-fenoksifenil N-(2-kloro-a,a,a-trifloro-p-tolin)-D-valinat
Molekül Formülü	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃
Molekül Ağırlığı	502.93
Sudaki Çözünürlüğü (25°C)	0.002 mg/L
Diğer Çözücülerde Çözünürlüğü	Organik çözücülerde ve aromatik hidrokarbonlarda çözünebilir
Kaynama Noktası	> 450 °C
Buharlaşma Basıncı (25°C)	0.013 mPa
Yoğunluk	1.29 g/ cm ³

Fluvalinat, geniş spektrumlu bir insektisittir ve emülsiyon, süspansiyon veya sıvı formda sentetik bir piretiroiddir (URL-1, 2021). Birçok bitki üzerinde bulunan örümcek akarının ve arı kovanlarında yer alan parazitlerin kontrolünde kullanılmaktadır (Roberts ve Hutson, 1999). Fluvalinat pestisitinin kullanılan bazı formülleri gözde kaşıntıya neden olmaktadır. Bu maddeyi içeren ürün etiketlerinde güvenlik amaçlı tehlike madde uyarısı bulunmalıdır. Sodyum kanallarının inhibisyonuna neden olan sentetik bir piretiroiddir. Sinir

hücrelerinin zarlarında sodyum kanallarını açık tutarak etki eder. İlk olarak sinir hücrelerinde bir uyarmaya ve ardından bu hücrelerde felce neden olurlar (URL-2, 2021).

2.2.3.1. Fluvalinat'ın ekolojik etkileri

Sentetik piretroidlerin hayvanlardaki toksik etkisi farklı şekillerde ve derecelerde meydana gelmektedir. Memeli canlılar ve kuşlarda kullanımı daha güvenli olmakla birlikte, artropodlara ve balıklara karşı da akut etkisi bulunmaktadır. Hangi yollarla maruz kalındığı, metabolizma ve eliminasyon oranı toksisite miktarına etki etmektedir (Solomon ve ark., 2001). İnsektisite karşı verilen tepkiler, toksik etkinin olduğu yere göre büyük farklılıklar gösterir. Günümüzde ve gelecekte kullanımları için sentetik pretroid gruplarının su, hava, toprak ve hedef dışında kalan türlerde var olmalarının sonuçları araştırılmalıdır (Satoh ve Gupta, 2011).

Sucul ortamda yaşayan canlılara belli bir süre etki ederek nüfusun yarısının ölümüyle sonuçlanan konsantrasyon LC₅₀ olarak adlandırılır.

Balıklar için fluvalinat büyük ölçüde zehirlidir (Meister, 1992). *Bluegill sunfish* ile yapılan çalışmada 96 saat sonundaki LC₅₀ değeri 0,09 µg/l, Gökkuşluğu alabalığı için 2,9 µg/l, küçük tatlı su kabuklu *D. manga* 48 saat sonundaki LC₅₀ değeri ise 74 µg/l'dir. Midsidkarideste ise 2,9 µg/l'dir (EPA, 2009). Akut toksisitesinin tespiti için yapılan bir araştırmada; Fluvalinat uygulaması yapılan *Poecilia reticulata*'da 96 saatlik LC₅₀ değeri 0,026 ± 0,5 µg/L olarak bulunmuştur (Yalçınkaya, 2013).

Fluvalinat'ın kullanıldığı bir çalışmaya göre Kuzey Amerika Ay Balığı'nda (*Mola mola*) 96 saatlik çalışma sonucunda LC₅₀ değerinin 0,9 µg/L olduğu görülmüştür (Kidd ve James, 1991). Başka bir çalışmada ise; *Oncorhynchus mykiss* için bu değer 2,9 µg/L; *Cyprinus carpio* içinse 2,9 µg/L olarak tespit edilmiştir (Gupta, 2011).

Fluvalinat'ın mutajenik bir etkisi yoktur ancak belli dozlarda canlı organizmalar üzerinde teratolojik bir etkiye sahiptir. Bunun yanında teratolojik etkinin oluşmasında dozlama ve stres varlığı önem arz etmektedir (EPA, 2009).

6-8 günlük yarılanma süresine sahip olmasıyla toprakta düşük seviyelerde kalıntı bırakmaktadır (Kidd ve James, 1991; Wauchope ve ark., 1992). Killi ve kumlu topraklarda fluvalinat yarılanma süresi aerobik koşullar altında 4-8 güne kadar düşürmektedir. Bunun yanında anaerobik koşullar altında kumlu topraklarda fluvalinat'ın yarılanma süresi 15 gün civarındadır (Anonymous, 2005). Fluvalinat suda hemen hemen hiç çözünmemektedir.

Toprak partiküllerini bağlamada kuvvetli bir yönelim göstermektedir (Wauchope ve ark., 1992). Fluvalinat'ın sudaki yarılanma süresi 1 gündür ve ışık etkisinde bozunmaktadır.

2.3. Cladocera

Yaklaşık 400 türü bulunan bu grup çoğunlukla mikroskobiktir. Bu türlerin çoğu tatlı sulara geniş bir yer bulur. Göllerin genellikle limnetik bölgelerinde yer alırlar. Bununla birlikte akarsuların durgun bölgelerinde, küçük su birikintilerinde, gölcüklerde, tuzlu ve acı göllerde de yer bulan türleri mevcuttur. Ayrıca makrofit sucul bitki örtüsü içinde yaşayan bazı türleri de bulunmaktadır (Goldman ve Horne, 1983; Demirsoy 1992; Tanyolaç 2000).

2.3.1. *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)

Bilinen hayvan türlerinin en az %95'ini omurgasız canlılar oluştururlar ve ekosistemin yapı ve fonksiyonları açısından çok önemlidirler. Genel olarak su piresi olarak da bilinen *D. magna*, ideal bir test organizmasıdır ve toksikolojik çalışmalarda 50 yıldır sıkça kullanılmaktadır (Jemec ve ark., 2007).

D. magna balık çiftliklerinde besin olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle Esoxidae, Cyprinidae ve Percidae familyalarının yavru dönemlerinde yeme ihtiyaç duyarlar (Cirik ve Gökpınar, 1993). Akvaryumda yaşayan balıkların beslenmesinde de kullanıldıkları gibi tatlı su balıklarından başka farklı böcek türleri tarafından da tüketilirler. Deney hayvanı olarak laboratuvarlarda da kullanılmaktadır.

Daphnia'lar bir tatlısu kabuklusu olarak yüksek oranlarda protein ve temel yağ asitleri içermektedir. *Daphnia*'ların besin değeri türüne ve yaşına göre farklılık göstermesinin yanında kuru ağırlık olarak yaklaşık %50'si proteinlerden oluşturmaktadır. Genç bireyler ergin bireylere göre daha düşük miktarda yağ asidine sahiptir. Bu nedenle de tatlı su balıkları için besleyici özelliği yüksek kaliteli bir yemdir (Akyıldız 1992; Cirik ve Gökpınar, 1993).

Akuatik ekosistem kirleticilerinin etkisini araştıran birçok bilimsel çalışmada, balıklar, mikroorganizmalar, bitkiler ve omurgasızlar gibi birçok farklı model canlı kullanılmıştır (Kado ve ark., 1998). Besin zincirinin orjininde olması ve kimyasallara karşı hassasiyeti bulunması sebebiyle zooplanktonlar ekotoksikolojik deneylerde daha çok kullanılmaktadır (Hanazato, 1998). Akuatik ortamlarda besin zincirinde önemli bir halka

olan su pireleri, toksikoloji çalışmalarında çok sık kullanılan akuatik test organizmalardır. Toksikoloji çalışmalarında indikatör organizma olarak kullanılan Daphnia türleri hızlı büyüme oranları, yüksek üreme potansiyelleri ve kısa yaşam döngüleriyle büyük bir öneme sahiptir (Adema, 1978; Harmon ve ark., 2003; Cooman ve ark., 2005; Altındağ ve ark., 2008).

Hemen hemen dünyanın her yerinde göl ve akarsuların durgun bölgelerinde bulunabilen *D. magna*, genellikle 3 mm'den daha küçük boyuttadır (Tatarazako ve Oda, 2007). Akuatik besin zincirinde kilit bir rol almasının yanısıra doğal şartlar altında öncelikle bakteri ve alglerle beslenirler (Jonczyk ve Gilron, 2005; Li ve Tan, 2011) ve predatör balık ve omurgasızların (makro eklembacaklıların) en önemli besin kaynağıdır. (Dodson ve Hanazato, 1995; Tatarazako ve Oda, 2007; Li ve Tan, 2011). Besin zincirindeki öneminden dolayı, Daphnia'larda oluşabilecek negatif herhangi bir durum ekosistem düzeyinde yanıtlar verebilmektedir (Flaherty ve Dodson, 2005). Düşük metabolik aktivitelerinden dolayı sıcaklık düşüşü ile yaşam süreleri artmaktadır (Pennak, 1989). 250 °C'de 40, 200°C'de 56 gün kadar yaşayabilmektedirler (Jonczyk ve Gilron, 2005). 6-120 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda Daphnia popülasyonu oldukça artmakta ve litrede 200-500 organizmaya kadar çıkabilmektedir. Yaz ayları boyunca popülasyonlar genellikle azalır, sonbaharda artar ve kış aylarında tekrar azalır (Jonczyk ve Gilron, 2005). Daphnia'nın olgunlaşması için gereken süre 6 ila 10 gün arasındadır ve bu vücut büyüklükleriyle ilgilidir (Pennak, 1989). Daphnia'ların yumurta, juvenil, adolesan ve yetişkin olmak üzere dört önemli safhadan oluşan bir yaşam döngüleri vardır (Jonczyk ve Gilron, 2005).

2.3.2. *Daphnia magna* 'nın sistematigi (Ustaoglu, 2004)

Phylum	: Arthropoda
Subphylum	: Crustacea
Classis	: Branchiopoda
Subclassis	: Phyllopoda
Ordo	: Diplostraca
Subordo	: Cladocera
Familia	: Daphniidae
Genus	: Daphnia

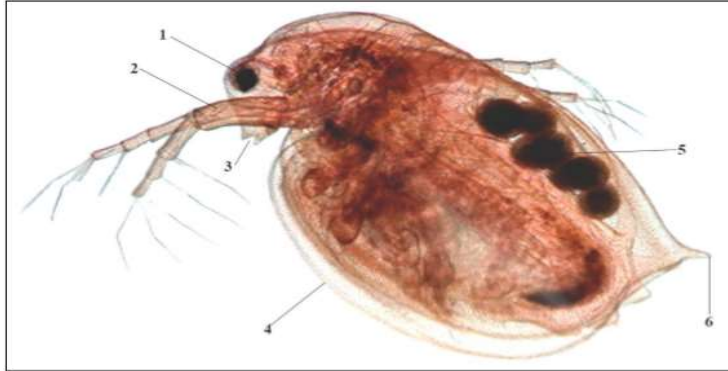
Species : *D. magna* (Straus, 1820)

2.3.3. *Daphnia sp*'nin morfolojisi ve fizyolojisi

Daphnia sp. çoğunlukla tatlı sularda yaşayan, 0,2 ila 3 mm boyutunda, küçük, ilkel Crustaceae'lardır.

Başları dışarıda kalmak suretiyle vücutları bir kabuk (karapaks) örtüsü ile kaplıdır (Alpbaz ve ark., 1992). Arka kısmı genellikle mevsimsel olarak uzayıp kısalabilen kuyruk şeklindedir ve üzeri dişli bir çıkıntıya sahiptir (Barnes, 1974) (Şekil 2.2).

Daphnia. sp.'nin vücudu bir gövde ve 5 extremiteli baştan oluşmuştur. 1. çift, seksüel dimorfizm antenleridir. 2. çift, hareketi sağlayan organel antenlerdir. Diğer üç çift ise organizmaya besin alım metabolizmasında kullanılmaktadır. *D. sp.*'ler dış kabuklarını belirli periyotlarda değiştirirler (Cirik ve Gökpınar, 1993). *D. manga* 'nın genel yapısı Şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2. *D. magna*'nın genel yapısı (Baykan, 2007)

1. Seksüel dimorfizm anten, 2. Hareketi sağlayan organel antenler, 3. Antenül, 4. Karapaks, 5. Yumurtalar, 6. Spin

2.3.4. *Daphnia magna*'nın sucul ekosistemler için ekolojik önemi

Göl, gölet ve havuzlarda yaşayabilen Cladoceranlar ve özellikle de *D. magna* başta olmak üzere *Daphnia* türleri besin zincirinde önemli bir bağlantı oluşturur: Balıklar *Daphnia* türleri üzerinden beslenir onlar ise fitoplanktonlarla beslenirler. Bu nedenle tatlı sulardaki besin ağında birincil üreticilerden daha yüksek trofik seviyelere enerji transferinde önemli bir rol oynarlar (Dodson ve Frey, 2001; Dumont ve Negrea, 2002).

Bu nedenle Daphnia'lar, sadece yaşam sürelerine ait parametreleri anlamak için değil aynı zamanda farklı besin, predasyon ve sıcaklık şartları altındaki durumları karşılaştırmak içinde oldukça iyi bir “model organizma” olarak hizmet ederler (Gliwicz, 2003).

Şu özellikler Daphnia'yı bir model organizma olarak çok uygun kılar:

- Daphnia türleri coğrafik olarak geniş bir dağılıma ve dünya ölçeğinde geniş bir yayılıma sahiptir. Bu nedenle dağılım (dispersal) ve filocoğrafya çalışmaları için ilginç bir canlıdır.

- Hızlı ve direk gelişimle ürerler (örneğin bir larval dönemleri yoktur). Bu nedenle kısa zamanda büyük popülasyonlar oluşturulabilir ve bu popülasyonlar çevresel değişimlere çok hızlı cevap verirler (Ersoy, 2005).

- Kùltürlerini yapmak kolaydır.

- Oldukça saydamdırlar, bu nedenle içteki organların işlevleri dışardan görünebilir, böylece morfolojik ve fizyolojik çalışmalar için genellikle uygun bir denektir.

- Gelişen yumurtalarını bir kuluçka kesesinde taşır; böylece yaşam döngüsünü ve popülasyon dinamiği parametrelerini kolayca hesaplama fırsatı oluşur.

- Küçük (milimetrik boyda) olmalarına rağmen yine de ele gelir bir büyüklükleri (el ile çalışma imkânı) vardır. Böylece mikrokozm ve mezokozm deneyleri için uygundurlar (Demirel, 2011).

- Çoğunlukla partenogenetik olarak ürerler. Uzun dönemli laboratuvar çalışmalarında klonları oluşturulabilir. Popülasyon genetiği çalışmalarında, bu klon ile seleksiyon birimleri çalışmaları yürütmek mümkündür.

- Döngüsel partenojendirler; örneğin bazı şartlar altında seksüel üreyebilirler. Seksüel üremenin ürünleri, dayanıklı bir efipium içinde sarmalanmış dormant (gelişimi bir süreliğine durmuş) yumurtalardır. Böylece, hem zor koşullara yıllarca dayanıklı, hem de iyi bir dağılım ajanı olarak fonksiyon görebilecek haldedirler. Tüm bunlar aseksüel ve seksüel üremenin neticelerini çalışmaya izin verir.

- Akuatik besin ağında merkezi bir pozisyonu işgal ederler (birincil üreticileri tüketerek ve predatörler tarafından tüketilerek); böylece, trofik seviyelerdeki etkileşimleri çalışmak mümkün olur. Birçok gölde, Daphnia'lar nicel olarak son derece önemlidirler ve “anahtar tür” olarak rol oynarlar.

- Bu merkezi pozisyon, “bir besin ağı içindeki çoklu ilişkilere adaptasyonları” çalışma konusunda onları ideal denekler yapar.

- Çeşitli seviyelerdeki matematik modellemeler için uygundurlar; fizyolojileri, popülasyon dinamikleri ve ekosistem etkileri çok iyi çalışılabilir.

- Fenotipik ve genotipik değişkenlikleri ve filogenileri çok iyi tanımlanmıştır (Lampert, 2006).

- Güçlü otlama kapasitelerini kullanarak *Daphnia* bireyleri fitoplanktonlar üzerinde beslenerek, sadece su berraklığını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda fitoplanktonların büyümelerini de kontrol altında tutarlar (Schriver ve ark., 1995; Jeppesen ve ark., 1999; Scheffer, 1999). Onların bu güçlü otlama kapasitesinin bir sonucu olarak, su berraklığı artar ve bu birçok sucul canlı çok önemli sığınaklar teşkil eden makrofitlerin (örneğin sazların) büyümesi için fırsat yaratır.

- *Daphnia* su berraklığının korunmasında çok önemli bir role sahiptir ve bu durum, göl ekosistemlerinin biyoçeşitliliğinin korunması sonucunu doğurur. Bu nedenle, *Daphnia* popülasyonlarını etkileyebilecek faktörler, su berraklığı ve sucul çevredeki çeşitlilik üzerinde de direkt olarak etkili olacaktır.

Daphnia, tatlısu sistemlerinin “ekolojik risk değerlendirmesinde” yardımcı olabilecek bir “biyomarker” olarak kullanılabilir (Edmondson ve Litt, 1982).

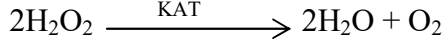
2.4. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve oksijene parçalanmasını kataliz eden enzimlerdir (Altaş, 2009). Hayvansal organizmalara benzer olarak O_2^- in H_2O_2 ’e dismutasyonunu gerçekleştirir. Mn-SOD mitokondrilerde, Fe-SOD kloroplast stromasında ve CuZn-SOD ise kloroplastlarda ve stoplazma da bulunmaktadır (Alscher ve Hess, 1993).

2.4.2. Katalaz (KAT)

Katalaz, bitki hücrelerinde, hayvanlarda ve aerobik bakterilerde bulunan bir enzimdir. Katalaz enziminin başlıca görevi; hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya dönüştürmektedir (Kayış, 2010). Katalaz, Süperoksit dismutaz tarafından inhibe edilmesi sırasında oluşan hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene parçalar (Grangerve ark., 1981).



KAT H_2O_2 'e özgüdür, diğer organik peroksitler etkilenmez (Siems ve ark.,1994).

2.4.3. Glutasyon S-transferaz (GST)

Glutasyon, hayvan ve bitki dokularında genellikle herbisitlerin, ksenobiyotiklerin ve pestisitlerin metabolizmasında rol oynar. Birçok ksenobiyotik bileşikle beslenmiş yaşayan organizma glutasyon S-transferazın konjugasyonu ile metabolize edilir (Yıldırım, 2017). Organik hidroperoksitlerin birçok formuna ve hidrojen peroksite karşı aktif özellikte değildir (Sun, 1990). GS'nin detoksifiye edici fonksiyonu elektrofilik substratları ile redükte glutasyonun konjugasyonunu katalizlemesi ile gerçekleşir (Reid ve Jahoor, 2001).



2.5. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.5.1. Redükte glutasyon (GSH)

GSH, çoğu hayvan hücresi tarafından üretilen ve yaygın olarak bulunan bir tripeptittir. Yapısında glisin, glutamik asit ve sisteinden oluşan detoksifiye enzimlerin ve antioksidanların kofaktörü olarak görev yapar. Antioksidan savunma sistemindeki görevi reaktif oksijen türleri ve elektrofillere karşıdır. GSH (γ -glutamil-sisteinil-glisin), birbirini izleyen ATP bağımlı iki enzimatik reaksiyonla yeniden sentezlenir. İlk basamakta, sistein ve glutamat, γ -glutamilsisteinsentaz (γ -GCS) katalizörlüğü eşliğinde bağlanarak γ -glutamilsistein formuna dönüşmüştür. GSH sentezinin tamamlanması glutasyon sentaz katalizörlüğünde glisinin kovalent olarak γ -glutamil-sistein'e kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleşir. Tiyol (-SH) grubunda bulunan enzimlerin çoğu düşük hızla okside olur veya O_2 'nin doğrudan etki etmesiyle aktivitelerinde hızla düşüş meydana gelir. Proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte şekilde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Glutasyon peroksidaz ile hidrojen peroksit hızlıca suya indirgenir ve GSH kendisi okside olarak tiyol gruplarını yeniden indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar.

Özellikle H_2O_2 'in eliminasyonunda GSH'ın oksitlenebilir özelliğinden faydalanılır (Yıldırım, 2017). Serbest radikalleri direk olarak temizlemesinin yanı sıra bir kofaktör olarak, GPx ile birlikte etki gösterir (Van Der ve ark., 2003).

2.5.2. Malondialdehid (MDA)

MDA, lipid peroksidasyonunda doğal olarak ortaya çıkan bir oksidatif indirgenme ürünüdür ve aynı zamanda biyolojik membranlardan geçerek oksidatif hasarın önemli belirleyicisi olarak tanımlanabilir (Strmac ve Braunbeck, 2002). Uzun bir yaşama sahip olan Aldehit yapılı bileşimlerdir. Aynı zamanda hücre membranlarından geçiş yapabilirler ve bundan kaynaklı olarak lipid peroksidasyonunun etkileri organizmada çıkabilir (Çobanoğlu ve ark., 2011). Peroksidasyonla oluşan MDA, 3 veya daha fazla çift bağ içeriğinde bulunduran bir dialdehittir (Masella vd. 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Model Organizma *Daphnia magna*

Bu çalışmada kullanılan test organizmaları (*D. magna*) yerel satıcılardan temin edilmiştir. Çevre toksikolojisi laboratuvarına alınan test organizmalarının laboratuvar ortamına adaptasyonunun tam olarak sağlanabilmesi için 100-150 L'lik hacimlerde değişen akvaryumlarda hayatlarına devam etmeleri sağlanmıştır. Bunun için 18–20 °C (± 1) sıcaklıkta ve 12:12 saat aydınlık: karanlık fotoperiyot süresi uygulanmıştır. Ortama adaptasyonun tam olarak gerçekleştiğini anlamak için günlük ölüm oranının %10'dan daha az olması beklenmiştir. *D. magna* bireyleri günde bir kez kuru spirulina tozu ve ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) karışımı ile düzenli olarak beslenmiş ve her bir akvaryum, içerisindeki çözülmüş oksijen miktarının hayati tehlike oluşturacak kadar azalmaması için bir hava pompasıyla düzenli olarak havalandırılmıştır. Ayrıca akvaryum suyunun %25 ile 35'i arasındaki miktarları her beş günde bir yenilenmiştir. Stok *D. magna* akvaryumları Resim 3.1'de; pestisit uygulaması ise Resim 3.2'de verilmiştir.



Resim 3.1. Stok *D. magna* akvaryumları



Resim 3.2. Pestisit uygulama

3.2. Tau-fluvalinat Temini

Çalışmada kullanılan Tau-fluvalinat MAVRİK® 2F ticari adı ile ADAMA Turkey firmasından satın alınarak temin edilmiştir.

3.3. Akut Toksisite Deneyi (LC₅₀)

Çalışmada Tau-fluvalinat'ın *D.magna* üzerindeki akut toksisitesini belirlemek için hem 24 saatlik hem de 96 saatlik statik LC₅₀ testi uygulanmıştır. Bu amaçla organizmalara aralık belirleme testi uygulanmıştır.

24 saatlik aralık belirleme testi sonuçlarına göre ortama sırasıyla 0.000 (kontrol); 6,08; 7,00; 8,05; 9,25; 10,64; 12,24; 14,07; 16,19; 18,62; 21,41; 24,62; 28,31 µg/L Tau-fluvalinat konsantrasyonları uygulanmıştır. LC₅₀ değeri için belirlenen konsantrasyonlar da 350 mililitre hacme sahip polikarbonat kaplara 10'ar adet *D.magna* kullanılarak toksisite testi uygulanmıştır. Akut toksisite testlerinin, aralık belirleme testleri dahil tüm aşamaları üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

96 saatlik LC₅₀ değerlerinin saptanması amacıyla sırasıyla 0.000 (kontrol); 1,98; 2,28; 2,62; 3,02; 3,47; 4,00; 4,59; 5,28; 6,08; 7,00; 8,05; 9,25 µg/L Tau-fluvalinat konsantrasyonları uygulanmıştır. LC₅₀ değeri için belirlenen konsantrasyonlar da 350 mililitre hacme sahip polikarbonat kaplara 10'ar adet *D.magna* kullanılarak toksisite testi 3 tekrarlı şekilde uygulanmıştır.

Deney başlangıcından sonuna kadar hem 24 saatlik hem de 96 saatlik uygulama gruplarında herhangi bir şekilde test organizmalarına yemleme yapılmamıştır. Deneme

süresince her bir konsantrasyon grubu 24, 48, 72 ve 96. saatlerde gözlemlenmiştir. Hayat belirtisi göstermeyen bireyler deneme ortamından uzaklaştırılarak not edilip kayıt altına alınmıştır. Elde edilen verilerden probit analizi kullanılarak LC₅₀ toksisite değerleri hesaplanmıştır. Probit analizinde EPA V1.6 programı kullanılmıştır.

3.4. Subletal Tau-fluvalinat Konsantrasyon Uygulamaları

Tau-fluvalinat'ın organizmalar üzerindeki LC₅₀ değerlerinin belirlenmesinden sonra biyobelirteçler üzerindeki değişimlerin tespit edilmesi adına 3 farklı subletal konsantrasyon (1/20 konsantrasyon, A; 1/40 konsantrasyon, B; 1/60 konsantrasyon, C) uygulaması oluşturularak, 24 ve 96 saatlerdeki yanıtlar tespit edildi.

3.5. Glutasyon Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu

Hücre peletleri %0,9'luk NaCl ile yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra, ıslakken kütleleri belirlenip ve 10 mL 50 mM Tris-20 mM EDTA (pH= 7,40) tampon karışım ile soğuk olan bir ortamda homojen karışım elde edilmiştir. Bu homojen karışım +4 °C'de 9000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüjden hemen sonra üst süpernatant kısım alınarak GSH aktivitelerinin ölçümü yapılmıştır. Santrifüj işlemi için Hettich Universal 32R cihazı kullanılmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. Hettich Universal 32R

3.6. GSH Miktarının HPLC Cihazında Ölçümü

GSH miktarlarının ölçümleri HPLC cihazı ile analiz edilmiştir (Klejdus ve ark. 2004; Yılmaz ve ark., 2009). Kısaca, 1 mL homejanat alınır üzerine 1 mL %10'luk TCA eklenerek de protenize edilmiş ve 6000 rpm'de santrifüj işleminin sonrasında ise 1 mL otosamplerviallerine alınarak, HPLC cihazında 214 nm'de kantitatif ölçüm Shimadzu marka tam otomatik HPLC cihazında yapılmıştır (Shimadzu RID-10A) (Resim 3.4).

Mobil faz olarak %0,1 TFA ve metanol karışımı (%94/%6, v/v) kullanılmıştır. Ayırma işlemi ODS-3 HPLC kolonunda sağlanmıştır. Hesaplama işlemleri standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP6,26 programı (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile yapılmıştır.



Resim 3.4. Shimadzu RID-10A

3.7. Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Ölçümü

MDA miktarlarının ölçümleri HPLC cihazının kullanıldığı analiz metodu ile gerçekleştirilmiştir (Karataş ve ark., 2002). Tris tamponu ile homojenize edilen süpernatandan 1 mL alınmış %10' luk perklorik asit (PCA) ile birleştirilerek proteinler çöktürülerek ve karışım 5000 devirde 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatan kısım oto sampler viallerine konularak HPLC'de analizi yapılmıştır. Analiz için tam otomatik Shimadzu marka HPLC sistemi (Kyoto, Japan) kullanılmıştır. Mobil faz

olarak 30 mmol KH_2PO_4 ve metil alkol karışımı (Karatepe, 2004) (%82,5-%17,5) H_3PO_4 ile kolon olarak da ODS-3 HPLC kolonu (150 mm x 4,6- 5 μm) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk ve PDA dedektörünün dalga boyu 244 nm'de ayarlanmıştır. Hesaplama işlemleri ise standart karışımlardan elde edilen kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 soft ware (Shimadzu, Kyota, Japan) ile hesaplamaları yapılmıştır.

3.8. Lipidlerin Ekstraksiyonu

Hücre pelletinden lipidlerin ekstraksiyonu 3/2 (v/v) hekzan-izopropil alkol karışımından kullanılan Hara ve Radin (1978) metoduna göre yapılmıştır. Bunun için; hücre peletleri üzerine 10 mL hekzan/izopropil alkol karışımının 3/2, (v/v) ilave edilerek 11000 rpm'de 1 dakika süre ile homojen edilmiş ve sonrasında ise 6000 rpm'de santrifüj yapılarak üst supernatantları eşit olarak iki kısma ayrılmıştır.

3.9. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Hücre homojenatındaki katalaz aktivitesi Aebi (1984) belirtilen yöntemler ile hesaplamaları yapılmıştır. Katalaz aktivitesi, spektrofotometrik olarak 240 nm'de 1 dakika içinde H_2O_2 'in azalan konsantrasyonuna uygun bir şekilde belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak ölçümde SHIMADZU UVmini-1240 kullanılmıştır (Resim 3.5).



Resim 3.5. ShimadzuUVmini-1240

3.10. Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

Reaksiyon, potasyum fosfat tamponu (0.05 M, pH=7.8), 0.1 mM EDTA, 100 µl adrenalin, 100 µl ksantin ve 200 µl hücre homojenatı ve son olarak 50 µl ksantinoksidaz eklenerek başlanmıştır. 20 dakika sonra, absorbans değerleri 480 nm dalga boyunda okunmuştur (Panchenko ve ark. 1975; Pinho ve ark. 2006).

3.11. Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Ölçümü

Glutatyon S-transferaz aktivitesi Habig ve ark., (1974)'nın metoduna göre yapılmıştır. Bu ölçüm için, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1 mM GSH ve 0,1 M fosfat (pH= 6,5) tamponu kullanılmıştır. pH cihazı olarak Thermo SCIENTIFIC ORION 3 STAR pH portable kullanılmıştır (Resim 3.6). Enzim aktivitesi 340 nm' de spektrofometrik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0,1 mL GSH ve 0,1 mL CDNB ilave edilerek fosfat tamponu ile hacmi 2,9 mL'ye tamamlanmış ve 0,1 mL enzim çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon başlangıcından sonra her 15 saniyede absorbans değişimi distile su blank' ine karşı 340 nm'de ölçülmüştür. Bu ölçüm 3 dakika içinde tamamlanarak kaydedilmiştir.



Resim 3.6. Thermo SCIENTIFIC ORION 3 STAR

3.12. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizleri, SPSS 24.0 istatistik programı ile yapılmıştır. Probit analizi kullanılarak Tau-fluvalinat'ın *D. magna*'daki LC₅₀

değeri hesaplanmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarının biyokimyasal parametrelerindeki değişimler iki yönlü varyans analiziyle (ONEWAY–ANOVA) test edilmiştir (Sümbüloğlu, 1998; Kocaçalışkan ve Bingöl, 2008; Kalaycı, 2010).

4. BULGULAR

Bu çalışmada Tau-fluvalinat pestisitinin farklı dozlarına maruz kalan *D. magna* ' da Glutasyon S-transferaz (GST), Katalaz (KAT) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) düzeyleri ile Glutasyon (GSH) ve Malondialdehit (MDA) seviyeleri belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir.

4.1. Akut Toksisite Değerleri

Tau-fluvalinat'ın *D. magna* toksisite test sonucu 24 saat ve 96 saat sonra okunan akut toksisite değerleri Tablo 4.1'de bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitesindeki değişimler ise Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tau-fluvalinat'ın *D. magna* üzerindeki akut toksisite değerleri

	LC ₅₀ (µg/L)	Alt Seviye (µg/L)	Üst Seviye (µg/L)
24 saatlik	18,167	14,910	24,804
96 saatlik	3,298	2,882	3,720

Tablo 4.2. Tau-fluvalinat’a maruz bırakılan *D. magna*’da bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitesindeki değişimler

	Antioksidan parametreler	24. saat	96. saat
GST ($\mu\text{g/g/1 dk}$)	Kontrol	298,79 $\pm$ 7,27a	302,11 $\pm$ 7,19d
	A	225,62 $\pm$ 7,05bc	766,00 $\pm$ 23,05a*
	B	191,80 $\pm$ 12,52c	544,93 $\pm$ 38,14b*
	C	249,86 $\pm$ 18,97b	436,40 $\pm$ 17,49c*
KAT ($\mu\text{g/g/1 dk}$)	Kontrol	58,87 $\pm$ 1,77a	53,71 $\pm$ 1,01a
	A	19,71 $\pm$ 1,08b	31,33 $\pm$ 2,12b
	B	20,83 $\pm$ 1,99b	31,40 $\pm$ 1,49b*
	C	57,46 $\pm$ 2,15a	27,89 $\pm$ 1,16b*
SOD (U/g)	Kontrol	178,46 $\pm$ 0,85a	178,31 $\pm$ 6,85c
	A	176,34 $\pm$ 4,44ab	231,45 $\pm$ 11,3b*
	B	160,89 $\pm$ 4,40b	295,01 $\pm$ 7,90a*
	C	180,76 $\pm$ 7,80a	142,4 $\pm$ 5,60d*
GSH ($\mu\text{g/g}$)	Kontrol	3618,51 $\pm$ 103,93a	3870,02 $\pm$ 210,69bc
	A	2252,22 $\pm$ 125,85b	3538,63 $\pm$ 109,99c*
	B	1213,76 $\pm$ 46,94c	4269,94 $\pm$ 132,35b*
	C	2207,31 $\pm$ 120,11b	6207,18 $\pm$ 238,32a*
MDA (nmol/g)	Kontrol	164,05 $\pm$ 1,73a	150,48 $\pm$ 8,17c
	A	67,77 $\pm$ 11,90b	100,83 $\pm$ 5,04d*
	B	28,48 $\pm$ 4,21c	253,36 $\pm$ 16,15a*
	C	59,37 $\pm$ 3,73b	188,45 $\pm$ 11,33b*

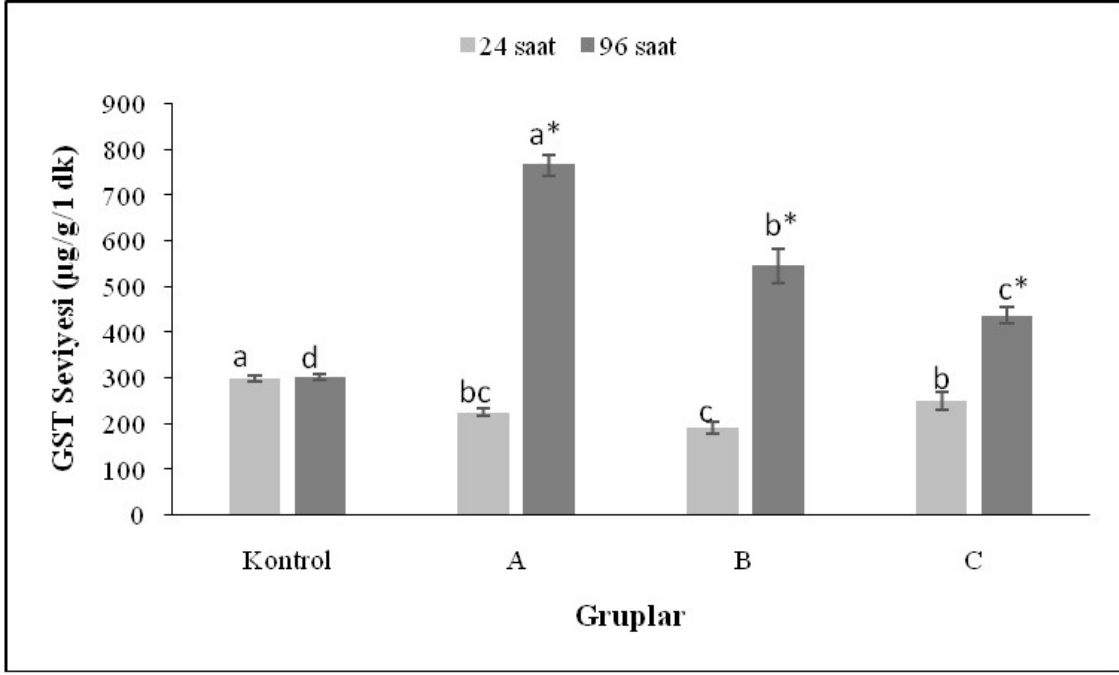
*Üst simgedeki a, b, c ve d harfleri aynı saatteki farklı gruplar arasındaki ve * işareti ise aynı grubun farklı saatleri 1/20 konsantrasyon, A; 1/40 konsantrasyon, B; 1/60 konsantrasyon, C) uygulaması oluşturularak (24. ve 96. saatler) arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

4.2. Enzimatik Antioksidan Değerleri

4.2.1. GST seviyesi

Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*’da GST düzeyleri araştırılmış olup sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir. GST düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında 24. saatte tüm gruplarda azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Yine kontrol grubuna kıyasla 96. saatte tüm gruplarda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak kontrol hariç tüm gruplar arasında önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Sadece 24. ve 96. saatte kontrol grubundaki artışın maruz kalma süresine göre anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 4.1).

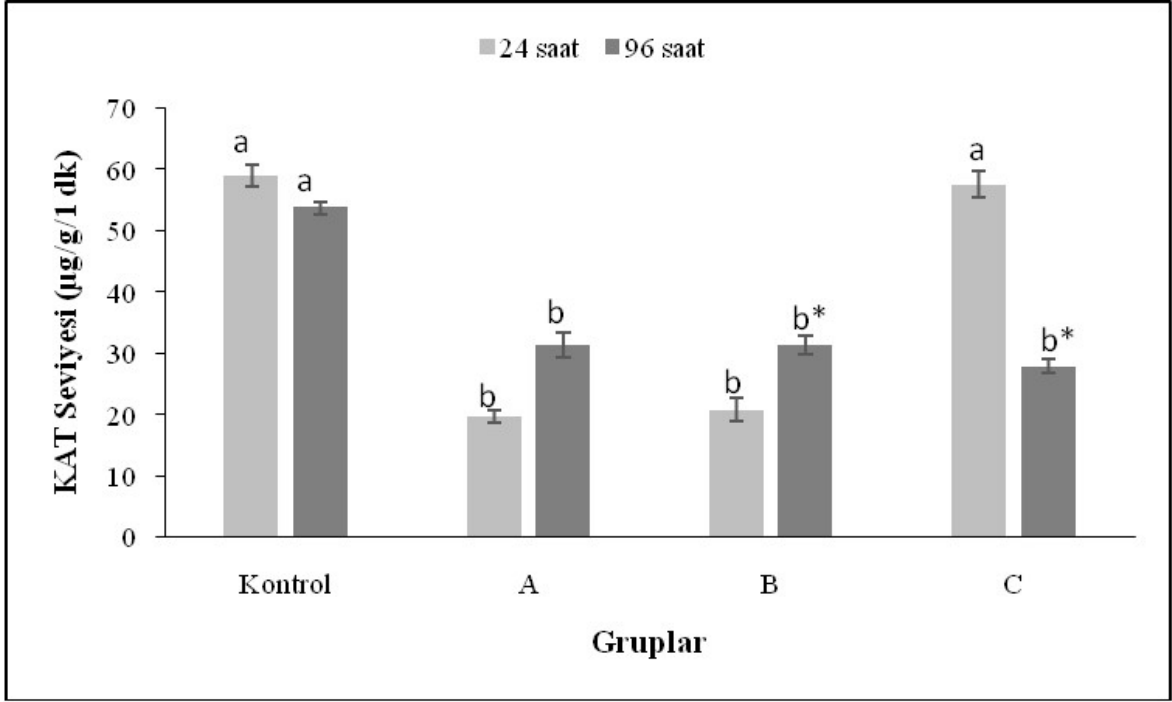


Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan *D. magna* 'da GST (µg/g/1 dk) seviyesindeki değişiklikler

4.2.2. KAT seviyesi

Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da KAT aktivitesi araştırılmış olup sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir. KAT aktivitesinin kontrolle kıyaslandığında hem 24. hem de 96. saatte tüm gruplarda azaldığı gözlenmiştir. Bu artış 24.saatte A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$). 96. saatte ise tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise sadece B ve C grubundaki artış maruz kalma süresine göre anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.2).

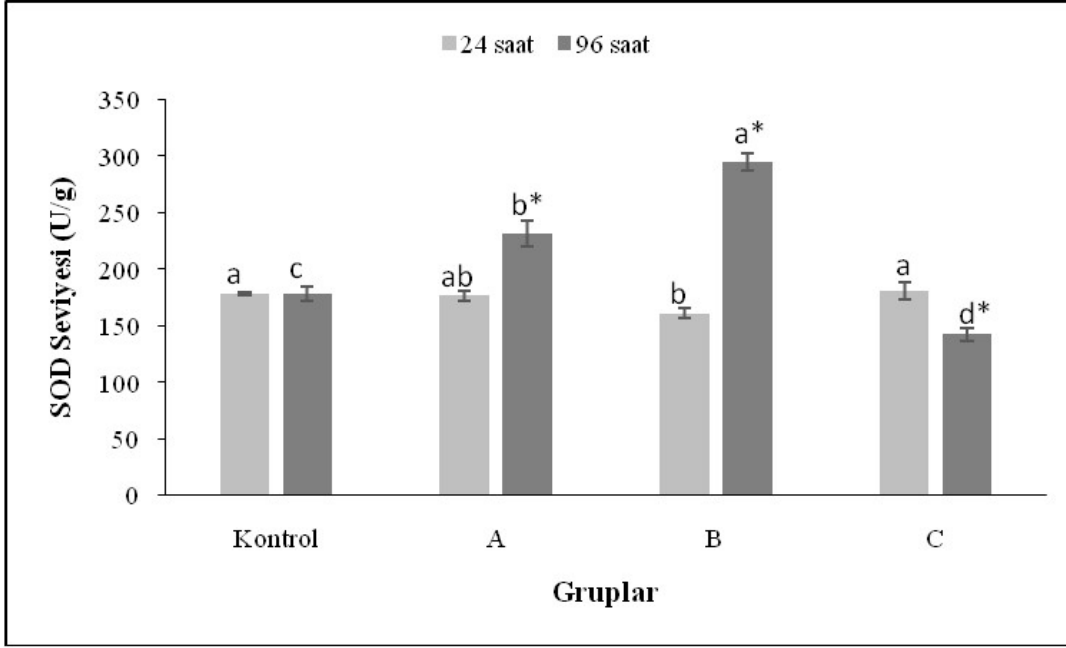


Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan *D. magna* 'da KAT (µg/g/1 dk) seviyesindeki değişiklikler

4.2.3. SOD seviyesi

Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da SOD aktivitesi araştırılmış olup sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SOD aktiviteleri 24. saatte C grubu hariç tüm gruplarda azalmış ve 96. saatte C grubu hariç tüm gruplarda artmıştır. Bu azalma 24. saatte A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p > 0.05$). 96. saate bakıldığında SOD seviyesindeki artış ve azalışlar tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p < 0.05$).

SOD aktivitesindeki değişimler farklı uygulama sürelerine göre kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan *D. magna* 'da SOD (U/g) seviyesindeki değişiklikler

4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Değerleri

4.3.1. GSH seviyeleri

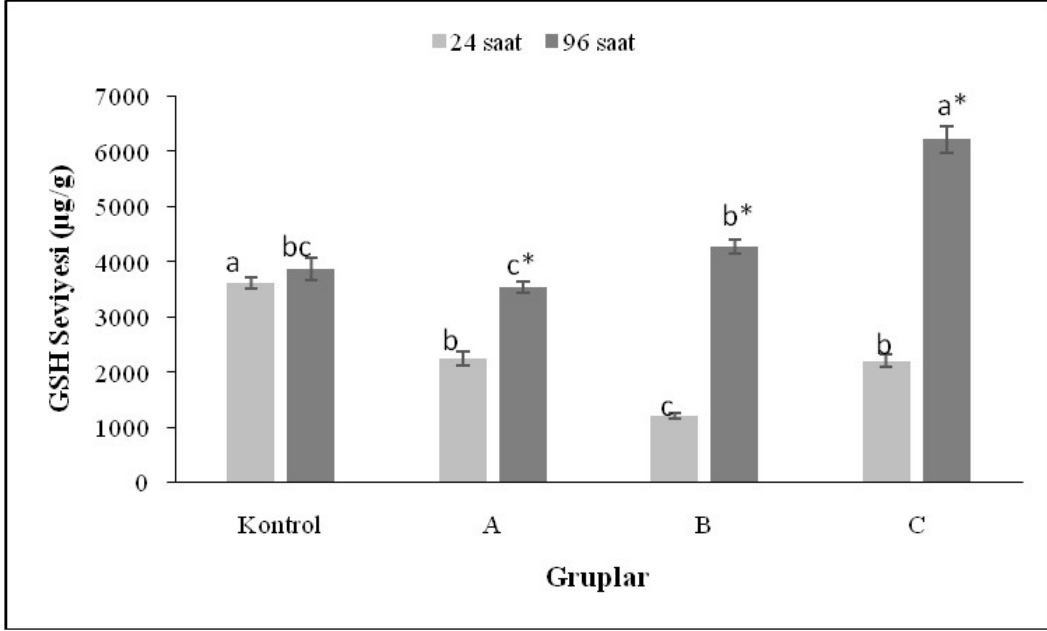
Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna* 'da GSH aktivitesi araştırılmış olup sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir. GSH düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında 24. saate tüm gruplarda azalmıştır ($p < 0.05$). 96. saat sonrasında sadece A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p < 0.05$).

Maruz kalma süreleri kıyaslandığında ise kontrol hariç tüm gruplarda 24. ve 96. saat sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.4).

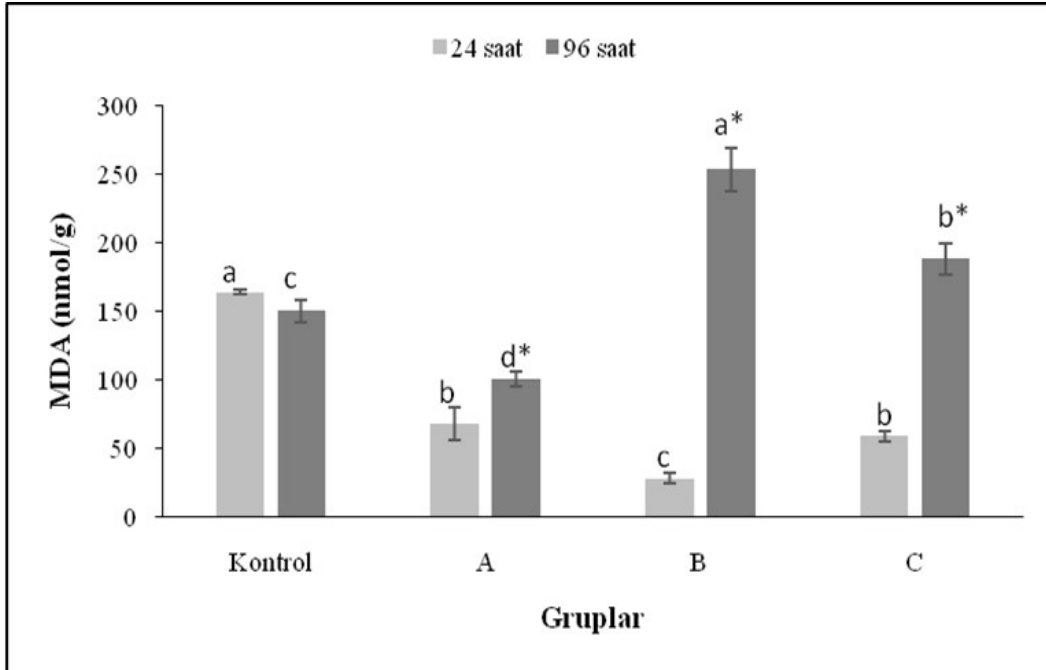
4.3.2. MDA seviyeleri

Farklı konsantrasyonlarda Tau-Fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna* 'da MDA aktivitesi araştırılmış olup sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir. MDA düzeyleri 24. saat sonrasında kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda azalmıştır ($p < 0.05$). 96. saat sonrasında ise A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p < 0.05$).

Farklı maruz kalma zamanlarında ise kontrol hariç tüm gruplarda anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan *D. magna* 'da GSH (µg/g) seviyesindeki değişiklikler



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat'a maruz kalan *D. magna* 'da MDA (nmol/g) seviyesindeki değişiklikler

5. TARTIŞMA

Pestisitlerin balıklar üzerindeki etkileri arasında en çok görülen sinir sistemini etkilemesinden kaynaklı oluşan davranış bozuklukları, istem dışı hareketler ve solunum felci gibi etkileri de sinir sisteminin olumsuz yönde etkilenmesinden kaynaklı ortaya çıkabilir (Vural, 1984).

Aynı çeşit hayvanların toksik kimyasallara karşı gösterdiği direnç ile farklı tür hayvanların aynı toksik kimyasal birleşenlere gösterdikleri tepkiler farklı olabilmektedir. pH, suyun sertliği, sıcaklık, balığın cinsi, büyüklüğü, dayanıklılığı, kullanılan pestisit içeriği ve maruz kaldığı süre sucul bir ortamda toksisiteye etki eden başlıca unsurlar arasında yer alır (Yalçinkaya, 2013). Fluvalinat ile ilgili yapılan deneylerin az olmasından kaynaklı kıyaslama yapmak zorlaşmaktadır. Fluvalinat'ın çevreye verdiği zararlar bilinerek kullanılmalıdır (Yalçinkaya, 2013). Fluvalinat'ın kullanıldığı bir çalışmaya göre Kuzey Amerika Ay Balığı'nda (*Mola mola*) 96 saatlik çalışma sonucunda LC₅₀ değerinin 0,9 µg/L olduğu görülmüştür (Kidd ve James, 1991). Farklı bir çalışmada Akut toksisitesinin tespiti için yapılan bir araştırmada; Fluvalinat uygulaması yapılan *Poecilia reticulata*'da 96 saatlik LC₅₀ değeri 0,026 ± 0,5 µg/L olarak bulunmuştur (Yalçinkaya, 2013). Çalışmamızda ise LC₅₀ değeri 3,298 µg/L bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar arasındaki farklılığın sebebi; deney süresinin ve yönteminin farklı olması, deney çalışmalarında kullanılan organizmaların dirençlerinin farklı olması, suyun pH'ı, suyun sertliği ve ortam sıcaklığı gibi faktörlerin değişkenliği ile bu durum açıklanabilir (Özok ve ark 2017).

Çeşitli konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz bırakılan *D. magna*'nın enzimatik ve enzimatik olmayan bazı antioksidan parametreleri araştırılmış ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere *D. magna* ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılmıştır (Watts ve ark., 2001; Schirling ve ark., 2006). Yaptığımız bu çalışmada, antioksidan enzimlerinden SOD, KAT ve GST ile enzimatik olmayan antioksidanlardan MDA ve GSH seviyeleri ve değerlerinin uygulamasındaki etkilerini ön görmede biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır.

SOD, KAT ve GSH enzimleri toksikolojik etkilere karşı birincil savunma hattını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra toksisitenin belirlenmesinde de bu enzimler biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Pandey ve ark., 2003). SOD, oksijen türevi serbest radikaller

karşı reaktif ve toksik süperoksit radikallerini hidrojen peroksit (H_2O_2) haline dönüştüren ilk savunma yoludur (Duman ve Kar, 2015). SOD, fagosite edilen bakterilerin intrasellüler (hücre içi) ölüm oranında etkili olmasının yanı sıra membran yapılı hücrelerin lipid peroksidasyonunun önlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Hücre dışında faaliyeti çok düşük olmasına karşın SOD, oksijen tüketiminin yüksek olduğu yapılarda yüksektir (Ihara ve ark., 2005; Lushchak ve Bagnyukova, 2006). SOD aktivitesi, sıcak bölgelerde yaşayan balıklarda soğuk bölgelerde yaşayan balıklara göre daha azdır (Abele ve Puntarulo, 2004). Yaptığımız çalışmada farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da SOD aktivitesi araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SOD aktiviteleri 24. saatte C grubu hariç tüm gruplarda azalmış ve 96. saatte C grubu hariç tüm gruplarda artmıştır. Bu azalma 24. saatte A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$). 96. saate bakıldığında SOD seviyesindeki artış ve azalışlar tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$). SOD aktivitesindeki değişimler farklı uygulama sürelerine göre kontrol hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). SOD aktivitesinin belirli bir konsantrasyonda ve uygulama süresinden sonra azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum enzimin bu konsantrasyonlarda inhibe edildiği şeklinde yorumlanabilir. Enzim aktivitesindeki azalışın nedeni hücre içerisinde oluşan H_2O_2 'in SOD enzimini inhibe etmesi olabilir (Taşdemir, 2009). SOD aktivitesindeki artışın H_2O_2 birikimine yol açabileceği ve bunun da KAT'ın işlevini sınırlandıracağı düşünülmektedir (Li ve ark., 2012). Daha önce yapılan çalışmalar ROS türlerinin KAT aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Kono ve Fridovich 1982; Escobar ve ark, 1996).

KAT, karaciğer, böbrek ve eritrositte yoğun olarak bulunan ve yapısında Fe^{+3} bulunduran 4 alt grubundan meydana gelen bir antioksidan enzim olmasının yanı sıra hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizlemektedir (Young ve Woodside, 2001). Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da KAT aktivitesi araştırılmıştır. KAT aktivitesinin kontrol ile kıyaslandığında hem 24. hem de 96. saatte tüm gruplarda azaldığı gözlenmiştir. Bu azalış 24.saatte A ve B gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$), C grubunda ise anlamsız olarak gözlenmiştir ($p>0.05$). 96. saatte ise tüm gruplarda anlamlı olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise sadece B ve C grubundaki artış maruz kalma süresine göre anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Katalaz; SOD enzimi tarafından üretilen H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e dönüştüren bir enzimdir. KAT aktivitesi de düşük uygulama

süreleri ve konsantrasyonlar da azalmış, azalan konsantrasyonlarda KAT enzim aktivitesi de azalmıştır. Düşük konsantrasyonlar da KAT enzim aktivitesinin azalması sebebi düşük konsantrasyonlardaki SOD aktivitesinin yüksek olması nedeniyle SOD'un substratı olan su H_2O_2 düzeyinin yüksek olması olabilir. Artan konsantrasyon ve uygulama sürelerinde KAT enziminin azalan konsantrasyon ve sürelerde azalması ise KAT enziminin inaktivasyonu sebebiyle olmalıdır (Taşdemir, 2009).

MDA, lipid peroksidasyonunun temel bir oksidatif indirgenme ürünüdür ve biyolojik membranlarda meydana gelen oksidatif hasarın önemli bir biyomarkırı olarak fonksiyon görür (Strmac ve Braunbeck, 2002). Serbest radikal oluşumunu artırma ya da hücrede meydana gelen peroksidasyon reaksiyonlarına karşı savunma seviyesini azaltma yoluyla MDA miktarını yükseltebilirler (Lackner, 1998). Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da MDA aktivitesi araştırılmıştır. MDA düzeyleri 24. saat sonrasında kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda azalmıştır ($p<0.05$). 96. saat sonrasında ise A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise kontrol hariç tüm gruplarda anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p<0.05$). Yapılan bazı çalışmalarda her üç antioksidan enzim için düşük konsantrasyon ve uygulama sürelerinde enzim aktivitesinin arttığı, ancak konsantrasyon ve uygulama süresinin artmasına bağlı olarak enzim aktivitelerinin inhibe edildiği belirlenmiştir. Ayrıca *D. magna*'nın arsenik türlerine karşı oluşturduğu biyolojik cevapta hem uygulama konsantrasyonunun hem de uygulama periyodunun önemli olduğu ve mutlaka birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirlenmiştir (Taşdemir, 2009). Genel olarak MDA düzeylerinin uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak sürekli bir artış eğiliminde olduğu görülmektedir. Protein içeriğinin ise düşük konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arttığı ancak artan konsantrasyon ve uygulama sürelerinde azaldığı söylenebilir. MDA düzeyinin artması lipid peroksidasyonunun varlığına işaret eder. Lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişimler ile birlikte GSH düzeyinde artması antioksidan savunmasının aktifliğini ortaya koymaktadır.

GSH-Px, g-glutamin, sistein ve glisin içeren bir tripeptittir. Bu molekül zenobiyotiklerin atılımını kolaylaştırmak için GST tarafından bağlayıcı kullanılan bir moleküldür ayrıca reaktif araçların metabolizmasında indirgeyici olarak kullanılır (Almroth, 2008). Hücresel fonksiyonların savunmasında önemli derecede etkin rolü olan GSH düzeyindeki artışın, fazlalaşan strese karşı oluşan adaptasyonun bir karşılığı olabileceği bildirilmiştir (Montiro ve ark., 2006; Serbes, 2011). GSH seviyesinin hafif

oksidatif stress altında adaptif bir mekanizma olarak sentezindeki artış ile birlikte yükselebildiği diğer taraftan şiddetli oksidatif stresin, adaptif mekanizmalardaki bozulmadan dolayı GSH seviyesini baskılayabildiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2004; Mamuk, 2015). Yaptığımız çalışmada farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da GSH aktivitesi araştırılmıştır. GSH düzeyleri kontrole göre kıyaslandığında 24. saatte tüm çalışma gruplarında azalmıştır ($p<0.05$). 96. saat sonrasında sadece A grubunda azalmış B ve C gruplarında artmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri kıyaslandığında ise kontrol hariç tüm gruplarda 24. ve 96. saatin ardından istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$). Dolayısıyla çalışma materyalimiz *D. magna*'da gözlenen artışların, strese karşı geliştirilen adaptasyon mekanizmalarından kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz (Türkmenoğlu, 2018). GSH düzeyindeki düşüşler ise GST ve GPx tarafından okside GSH (GSSG)'a çevrilmesinden ya da glutatyon redüktazın yeterli GSH üretememesinden kaynaklanabilir (Monteria ve ark., 2006).

Lipid peroksidasyonunda oluşan ürünlerinin GSH ile konjugasyonunu ve peroksidasyon zincir reaksiyonunun sonlanmasını sağladığı için GST önemli bir enzimdir. Bu enzimlerin asıl fonksiyonu, organo fosforları da içeren ksenobiyotikleri ve metabolitleri hücre içinde detoksifiye etmektir (Akbüber, 2018). Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat maddesine maruz kalan *D. magna*'da GST düzeyleri araştırılmıştır. GST düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında 24. saatte tüm gruplarda azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında 96. saatte tüm gruplarda arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak kontrol hariç tüm gruplar arasında önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Sadece 24. ve 96. saatte kontrol grubundaki artışın maruz kalma süresine göre anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). GST enziminin antioksidan olarak rolü, lipid peroksidasyonu ürünlerini glutatyona parçalayarak oksidatif zararı en az indirmektedir. GST strese karşı savunma mekanizmasına ve oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin metabolizmasına katılır. GST aktivitesindeki artış, detoksifikasyon işleminin meydana geldiğini gösterir. Yaptığımız çalışmada, Tau-fluvalinat'a maruz kalan GST ifadesinin zamana bağlı ilişkisi gözlenmiştir. GST kısa süre (24 saat) Tau-fluvalinat maruziyetinde indüklenip 96 saatte önemli ölçüde ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum kısa süreli Tau-fluvalinat maruziyetinin *D. magna*'larda oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz bulguların sonucunda Tau-fluvalinat'ın, farklı stres biyobelirteci olan antioksidan enzimlerinin spesifik aktivitelerinde farklılıklara neden olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra sublethal konsantrasyonlarının 96 saat gibi kısa sürelerde bile moleküler seviyede önemli etkiler meydana getirerek hücre zarlarının işlevsel ve yapısal bütünlüğünün bozunumuna sebep olan lipid peroksidasyonuna yol açabileceğini göstermiştir.

Farklı konsantrasyonlarda Tau-fluvalinat pestisitine maruz bırakılan *D. magna*'nın enzimatik ve enzimatik olmayan bazı antioksidan parametreleri araştırılmış ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere *D. magna* ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Yaptığımız bu çalışmada, antioksidan enzimlerinden SOD, KAT ve GST ile enzimatik olmayan antioksidanlardan MDA ve GSH seviyeleri değerlerinin uygulamasındaki etkilerini ön görmede biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır. SOD aktivitesinin belirli bir konsantrasyonda ve uygulama süresinden sonra azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum enzimin bu konsantrasyonlarda inhibe edildiği şeklinde yorumlanabilir. KAT aktivitesi de düşük uygulama süreleri ve konsantrasyonlarda azalmış, azalan konsantrasyonlarda KAT enzim aktivitesi de azalmıştır. Düşük konsantrasyonlarda KAT enzim aktivitesinin azalmasının sebebi düşük konsantrasyonlardaki SOD aktivitesinin yüksek olması nedeniyle SOD'un substratı olan su H_2O_2 düzeyinin yüksek olması olabilir. Genel olarak MDA düzeylerinin uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak sürekli bir azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Protein içeriğinin ise düşük konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arttığı ancak azalan konsantrasyon ve uygulama sürelerinde azaldığı söylenebilir. Lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişikliklerle GSH seviyesinin artması antioksidant savunma sisteminin çalıştığını göstermektedir. *D. magna*'da gözlenen artışların, strese karşı geliştirilen adaptasyon mekanizmalarından kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. GSH düzeyindeki düşüşler ise GST ve GPx tarafından okside GSH (GSSG)'a çevrilmesinden ya da glutatyon redüktazın yeterli GSH üretememesinden kaynaklanabilir. GST'in 24 saat Tau-fluvalinat maruziyetinde indüklenip 96 saatte önemli ölçüde ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum kısa süreli Tau-fluvalinat maruziyetinin *D. magna*'larda oksidatif strese neden olduğunu

göstermektedir. Sadece morfolojik özelliklerinden dolayı değil, moleküler ve biyokimyasal karakteristikleri ile de *Daphnia* türlerinin test organizması olarak kullanımı faydalıdır.



7. KAYNAKLAR

- Abele, D., ve Puntarulo, S.,** 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. Comparative biochemistry and physiology part A: *Molecular&integrative physiology*, 138(4), 405-415.
- Adema, D. M. M.,** 1978. *D. magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59(2), 125-134.
- Akbüber, C.,** 2018. TCPP (Fosforlu Alev Geciktirici)'nin *Daphnia magna* Toksikite Testleri ile Ekotoksikolojik Açıdan Değerlendirilmesi, *Doktora tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Akyıldız, A. R.,** 1992. Balık yemleri ve teknolojisi. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, 1280.
- Alberdi, JL, Sáenz, ME, DiMarzio, WD ve Tortorelli, MC.,** 1996. İki herbisit, parakuat ve glifosatın *D. magna* ve *D. Spinulata*'ya karşı karşılaştırmalı akut toksisitesi. *Çevresel kontaminasyon ve toksikoloji bülteni*, 57 (2), 229-235.
- Alpbaz, A. G.,** 1990. Deniz balıkları yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayın, (21), 24-94.
- Alscher, RG ve Hess, JL (Ed.),** 1993. Yüksek bitkilerdeki antioksidanlar (No. 04; QK898. A57, A5.). Boca Raton: CRC basın.
- Altaş, S.,** 2009. *CedrusLibani* (Sedir) ve *AbiesClicia* (Köknar) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Altındağ, A., Ergönül, M. B., Yigit, S., and Baykan, Ö.,** 2008. The acute toxicity of lead nitrate on *D. magna* Straus. *African Journal of Biotechnology*, 7(23).
- Anonymous,** 2005. Environmental Protection Agency, Pesticide Fact Sheet Number 86, Fluvalinate, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 2-39.
- Atamanalp, M., ve Yanık, T.,** 2001. Pestisitlerin Cyprinidae'lere toksik etkileri. *Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4), 555-563.
- Balcıoğlu, İ.C., Kurt, Ö. ve Özbilgin, A.,** 2004. Anti paraziter ilaçlar. ANKEM. 18(4); s.240.
- Barnes, R.,** 1974. Invertebrate Zoology, W.B. Saunders Company, London, 870.
- Baykan, Ö.,** 2007. Kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) metal tuzunun *D. magna* (Straus1820)(Cladocera, Crustacea) üzerindeki akut toksik etkisinin araştırılması,

Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

- Carlson, R.**, 1994. Silent Spring. Houghton Mifflin Company. Boston, pp.368.
laboratory studies, *Doctoral thesis*, University of Gothenburg.
- Cirik, S.,ve Gökpınar, Ş.**, 1993. Plankton bilgisi ve kültürü. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 47, 131-133.
- Cook, J. L., Baumann, P., Jackman, J. A., ve Stevenson, D.**, 1995. Pesticide Characteristics that affect water quality. *Farm Chemical Handbook*, 95, 429.
- Cooman, K., Debels, P., Gajardo, M., Urrutia, R., ve Barra, R.**, 2005. Use of *Daphnia* sp. For the ecotoxicological assessment of water quality in an agricultural watershed in South-Central Chile. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 191-200.
- Çaylak, E.**, 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tip Araştırmaları Dergisi*, 9 (1), 73-83.
- Çobanoğlu, U., Demir, H., Cebi, A., Sayır, F., Alp, H.H., Akan, Z., Gur, T., Bakan, E.**, 2011. Lipid peroxidation, DNA damage and Coenzyme Q10 in lung cancer Patients –Markers for Risk Assessment? *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 12: 1399-1403.
- Demirel, T.**, 2011. Çinkonun *D. magna* (Straus, 1820)(Crustacea: Cladocera) Üzerine Akut Toksik Etkisinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*.Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Demirsoy, A.**, 1992. Genel Türkiye Zoocoğrafyası. Meteksan AŞ 603 s. Ankara.
- Deveci, A.**, 2012. Bazı pestisitlerin soya (*Glycinemax (L.) Merrill cv. May 5312*) üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dodson, S. I. ve Frey, D. G.**, 2001.The Cladocera and other Branchiopoda. In Thorpe, J. E. And Covich, A. P. (eds), Ecology and Systematics of North American Fresh water Invertebrates, 2nd edn. Academic Press, New York, pp. 849–913.
- Duman, F. A. T. İ. H., ve Kar, M.**, 2015. Evaluation of effects of exposure conditions on the biological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(2), 437-444.
- Dumont, H. J., and Negrea, S. V.**, 2002. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world: Branchiopoda. Backhuys.
- Edmondson, W. T., Litt, A. H.**, 1982. *Daphnia* in lake Washington 1. *Limnology and Oceanography*, 27(2), 272-293.

- EPA (Environmental Protection Agency),** 2009. Types of Pesticides. Washington D.C., USA. Online: <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. (Erişim Tarihi: 24.03.2021).
- Ersoy, M.,** 2005. Farklı besin ortamlarında üretime alınan su piresi (*D. magna*)'nın ürün verimliliği, *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Escobar, J. A., Rubio, M. A., ve Lissi, E. A.,** 1996. SOD and catalase in activation by single toxygen and peroxy radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 285-290.
- Flaherty, C. M., ve Dodson, S. I.,** 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61(2), 200-207.
- Gliwicz, Z. M.,** 2003. Between hazards of starvation and risk of predation: the ecology of off shore animals. *Excellence in ecology*, 12, 1-379.
- Goldman, C. R., ve Horne, A. J.,** 1983. *Limnology*. McGraw-Hill.
- Granger, D. N., Rutili, G., McCord, J. M.,** 1981. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 81(1), 22-29.
- Gupta, R. C. Ed.,** 2011. *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Academic Press.
- Hanazato, T.,** 1998. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of fresh water communities. *Environmental pollution*, 101(3), 361-373.
- Harmon, S. M., Specht, W. L., and Chandler, G. T.,** 2003. A comparison of the daphnids *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia ambigua* for the irutilization in routine toxicity testing in the southe astern United States. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(1), 0079-0085.
- Ihara, Y., Nobukuni, K., Takata, H., and Hayabara, T.,** 2005. Oxidative stress and metal content in blood and cerebro spinal fluid of amyotrophic lateralscleros is patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation. *Neurological research*, 27(1), 105-108.
- Jemec, A., Drobne, D., Tiřler, T., Trebře, P., Roř, M., & Sepčić, K.,** 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *D. magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 144(4), 303-309.
- Jeppesen, E., Jensen, JP, Søndergaard, M., and Lauridsen, T.,** 1999. Su berraklığı için zooplanktonun rolüne özel vurgu yaparak bulanık ve temiz su göllerinde trofik dinamikler. *Sığ Göller 98'de* (s. 217-231). *Springer*, Dordrecht.

- Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A., and Berenbaum, M. R., 2006.** Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honeybees (*Hymenoptera: Apidae*) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1046-1050.
- Jonczyk, E., ve Gilron, G. U. Y., 2005.** Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia* sp. In Small-scale fresh water toxicity investigations (pp. 337-393). *Springer*, Dordrecht.
- Kado, N. Y., Kuzmicky, P. A., Loarca-Piña, G., ve Mumtaz, M. M., 1998.** Genotoxicity testing of methyltertiary-butyl ether (MTBE) in the *Salmonella* micro suspension assay and mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 412(2), 131-138.
- Kakko, I., 2004.** Toxic mechanisms of pyrethroids studied in vitro (Academic Dissertation). Finland: *Faculty of Medicine of the University of Tampere*, 55.
- Kalaycı, Ş., 2010.** SPSS uygulamalı çok değişkenli istatistik teknikleri (sayı, 5). Ankara: Asil Yayıncılık.
- Karatas, F., Karatepe, M., and Baysar, A. H. M. E. T., 2002.** Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 311(1), 76-79.
- Kaya, S., Pirinçci, İ., ve Bilgili, A., 2002.** Veteriner hekimliğinde toksikoloji. *Medisan Yayınevi*, 414, 415.
- Kayış, T., 2010.** Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla laticincta* L.'nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kidd, H., ve James, D. R., 1991.** The agro chemicals handbook.
- Kiely, T., Donaldson, D., and Grube, A., 2004.** Pesticides industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 114.
- Kocaçalışkan İ., ve Bingöl N., 2008.** Biyoistatistik, Nobel Yayın, Ankara.
- Kono, Y., ve Fridovich, I., 1982.** Inhibition of catalase by superoxide radicals. In *Federation proceedings* (vol. 41, no. 4, pp. 1207-1207). 9650 rockville pike, Bethesda, MD 20814-3998: *Federation American Society for Experimental Biology*.
- Lackner, R., 1998.** "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In *Fish ecotoxicology* (pp. 203-224). *Birkhäuser*, Basel.
- Lampert, W., 2006.** *Daphnia*: model organism, irritant and prey. *Polonya ekoloji dergisi*, 54 (4), 607-620.

- Li, S., ve Tan, Y.,** 2011. Hormetic response of cholinesterase from *D. magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 852-859.
- Li, Y., Shi, J. Q., Qu, R. J., Feng, M. B., Liu, F., Wang, M., Wang, Z. Y.,** 2012. Toxicity assessment on three direct dyes (D-BLL, D-GLN, D-3RNL) using oxidative stress bio assay and quantum parameter calculation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 132-140.
- Liu, Z., Cai, M., Wu, D., Yu, P., Jiao, Y., Jiang, Q., Zhao, Y.,** 2020. Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations. *Environmental Pollution*, 256, 113506.
- Lushchak, V. I., and Bagnyukova, T. V.,** 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology&Pharmacology*, 143(1), 36-41.
- Mamuk, Ö.,** 2015. Bisfenol A'ya maruz bırakılan inci kefali (*Chalcalburnus tarichi Pallas, 1811*)'nin primer hepatositlerinde oksidatif stresin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Masella, R., Benedetto, R.D., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C.,** 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems.
- McEwen, F. L., and Stephenson, G. R.,** 1979. The use and significance of pesticides in the environment (No. 632.95 M24).
- Meister, R. T.,** 1992. Farm chemicals handbook 1992. Willoghby, OH: Meister Publishing Company.
- Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L.,** 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology&Pharmacology*, 143(2), 141-149.
- Naumann, K., and Haug, G.,** 1990. Synthetic pyrethroid insecticides: structures and properties (Vol. 4). Berlin: Springer-Verlag.
- Oruç, E. Ö., ve Üner, N.,** 1999. Effects of 2, 4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental pollution*, 105(2), 267-272.
- Özok, N., Oğuz, A. R., Doğan, A., ve Ergöz, B.,** 2017. Oxidative Damage in Some Tissues of Van Fish (*Alburnus tarichi Gldenstadt, 1814*) Having Abnormal Ovary. *YY Tar Bil Derg (Yyu J AgrSci)*, 27 (3): 447, 452.
- ztrk, S.,** 1990. Tarım İlaçları, Hasad Yayıncılık. İstanbul, 552s.

- Panchenko, L. F., Brusov, O. S., Gerasimov, A. M., Loktaeva, T. D., 1975.** Intramitochondrial localization and release of rat liver superoxide dismutase. *Febs Letters*, 55(1-2), 84-87.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., and Raisuddin, S., 2003.** Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. And Schn.). *Science of the total environment*, 309(1-3), 105-115.
- Pennak, R.W., 1989,** Fresh-water invertebrates of the United States, John Wiley & Sons, New York, 628p.
- Pinho, R.A., Andrades, M.E., Oliveira M.R., Pirola, A.C., Zago M.S., Silveira, P.C.L., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2006.** Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise, *Cell Biology International*, 30, 848-853.
- Portakaldalı, M., ve Satar, S., 2015.** Bazı ilaçların laboratuvar koşullarında, tütün beyazsineği parazitoiti *Eretmocerus mundus* Mercet (*Hymenoptera: Aphelinidae*)'a karşı yan etkileri. *Derim*, 32(2), 143-160.
- Rand, G. M., and Petrocelli, S. R., 1985.** Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. FMC Corp., Princeton, NJ
- Reid, M., and Jahoor, F., 2001.** Glutathione in disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 4(1), 65-71.
- Roberts, T. R., Hutson, D. H., Jewess, P. J., Lee, P. W., and Nicholls, P. H., 1999.** Pt. 2: Insecticides and fungicides. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Satar, S., Ada, M., Kasap, İ., ve Çobanoğlu, S., 2013.** Acarina fauna of citrus trees in eastern Mediterranean region of Turkey. *IOBC-WPRS Bulletin*, 95, 171-178.
- Satar, S., Arslan, A., ve Chloridis, A., 2018.** Evaluation of the insecticide sulfoxaflor on important beneficial arthropods in citrus ecosystems in Turkey. *IOBC-WPRS Bulletin*, 132, 132-140.
- Satoh, T., ve Gupta, R. C. (Eds.), 2011.** Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity, and epidemiology. John Wiley&Sons.
- Scheffer, M., 1999.** The effect of aquatic vegetation on turbidity; how important are the filter feeders? *Hydrobiologia*, 408, 307-316.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K. U., Nagel, R., Köhler, H. R., Triebkorn, R., 2006.** Bisphenol A in artificial in door streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (*Amphipoda*). *Ecotoxicology*, 15(2), 143-156.
- Schriver, P. E. R., Bøgestrand, J., Jeppesen, E., Søndergaard, Martin., 1995.** Impact of submerged macrophytes on fish-zooplank phytoplankton interactions: large-scale

enclosure experiments in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 33(2), 255-270.

Serbes, D., 2011. Cyfluthrin, imidacloprid ve karışım uygulamalarının *Cyprinus carpio*'da beyin ve karaciğer dokularında glutasyon, malondialdehit ve protein karbonil düzeylerine etkileri, *Yüksek lisans tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Siems, W. G., vanKuijk, F. J., Maass, R., Brenke, R., 1994. Uric acid and glutathione levels during short-term whole body cold exposure. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(3), 299-305.

Solomon, K. R., Giddings, J. M., Maund, S. J., 2001. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(3), 652-659.

Song, J. H., Narahashi, T., 1996. Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1), 445-453.

Sousa, A. P., Nunes, B., 2020. Standard and biochemical toxicological effects of zinc pyrethrin in *D. magna* and *Daphnia longispina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103402.

Soyöz, M., ve Özçelik, N., 2003. Ziraî mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(1).

Strmac, M., Braunbeck, T., 2002. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(2), 293-304.

Sun, Y., 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(6), 583-599.

Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V., 1998. Biyoistatistik, Hatiboğlu yayınevi, Ankara. 269s.

Tanyolaç, J., 2000. Limnoloji ders kitabı. Hatiboğlu Yayıncılık, Ankara, 294.

Taşdemir, S., 2009. Arsenik (As+3 ve As+5) Uygulanmış *Daphnia magna*'da Lipit Peroksyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Tatarazako, N., ve Oda, S., 2007. The water flea *D. magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, 16(1), 197-203.

Tomlin, C. D. S., 1995. The pesticide manual. BCPC. Crop Protection.

- Türkmenoğlu, Y.**, 2018. Bisfenol A'ya maruz kalan *Gammarus pulex*' de antioksidan yanıtın araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- URL-1**, 2021. Fluvalinate, <http://extoxnet.orst.edu/pips/fluvalin.htm>. Erişim tarihi: 24.03.2021.
- URL-2**, 2021. U.S. EPA, Office of Pesticide Programs, What is pesticide? <http://www.epa.gov/pesticides>. Erişim tarihi: 24.03.2021.
- Ustaoglu, M. R.**, 2004. A Check-list for Zooplankton of Turkish in land Waters. *Su Ürünleri Dergisi*, 21(3).
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P.**, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Vural, N.**, 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73(381), 504-520.
- Vural, N. T.**, 1984. Ankara üniversitesi eczacılık fakültesi yayınları. Ankara 1996; 342, 373.
- Watts, M. M., Pascoe, D., Carroll, K.**, 2001. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research*, 35(10), 2347-2352.
- Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby, A. G., Augustijn-Beckers, P. W. M., Burt, J. P.**, 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 1-155.
- Yalçınkaya, M.**, 2013. Fluvalinate in Lebistes Balıkları (*Poecilia Reticulata*) Üzerine Akut Etkisinin belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Haccettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yazgan, M. S.**, 1997. Türkiye' de pestisit kirliliği. Türkiye' de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II, 571-577.
- Yıldırım, M.**, 2017. *Rheum Ribes L.* Ekstratını içeren sert jelatin kapsüllerin kalite kontrolünün yapılması ve oksidatif stres üzerine etkilerinin incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Young, I. S., and Woodside, J. V.**, 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y.**, 2004. Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of fresh water fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55(2), 167-174.

Zhang, Z. W., Sun, J. X., Chen, S. Y., Wu, Y. Q., He, F. S., 1991. Levels of exposure and biological monitoring of pyrethroids in spraymen. *Occupational and Environmental Medicine*, 48(2), 82-86.

