

**T.C.  
NEV EH R HACI BEKTA VEL ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ**

**Ç NKOP R T ONUN *Oreochromis niloticus* ÜZER NDEK  
GENOTOKS K ETK S N N M KRONÜKLEUS TEST İLE  
BEL RLENMES**

**Tezi Hazırlayan  
Nejla ÖZCAN**

**Tezi Yöneten  
Prof. Dr. Erdo an Ç ÇEK**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018  
NEV EH R**



**T.C.  
NEV EH R HACI BEKTA VEL ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ**

**Ç NKOP R T ONUN *Oreochromis niloticus* ÜZER NDEK  
GENOTOKS K ETK S N N M KRONÜKLEUS TEST İLE  
BEL RLENMES**

**Tezi Hazırlayan  
Nejla ÖZCAN**

**Tezi Yöneten  
Prof. Dr. Erdo an Ç ÇEK**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**OCAK 2018  
NEV EH R**

Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK danışmanlığında **Nejla ÖZCAN** tarafından hazırlanan “**Çinko Piritionun *Oreochromis niloticus* Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

19.01.2018

**JÜRİ:**

Başkan : Prof. Dr. Erdoğan ÇİÇEK

Üye : Doç. Dr. Özlem FINDIK

Üye : Yard. Doç. Dr. Hacer YELDAN

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulu'nun **14/2/2018** tarih ve **09/73** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**15/2/2018**

Prof. Dr. Şahlan ÖZTÜRK  
Enstitü Müdürü

## TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nejla ÖZCAN



## TE EKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bilgilerimi benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğinden benden esirgemeyen ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Erdoğan ÇEK'e, tez çalışmam süresince her türlü konuda desteğinden benden esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Sevil SUNGUR BREC KL GL'e, teknik ve idari yardımlarından dolayı Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığına, Biyoloji Bölüm Başkanı'na ve Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmamın Doç. Dr. Ramazan MERT'in yürütücüsü olduğu NEÜBAP-13F40 nolu BAP projesi kapsamında yapılması nedeniyle Doç. Dr. Ramazan MERT'e ve Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım ve tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini hissettiren değerli aileme minnettarlığımı sunarım.

**Ç NKOP R T ONUN *Oreochromis niloticus* ÜZER NDEK GENOTOKSİK  
ETKİSİNİN MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BELİRLENMESİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Nejla ÖZCAN**

**NEVİH R. HACIBEKTAŞ VE LİSANS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ocak 2018**

**ÖZET**

Bu çalışmada sucul ekosisteme evsel, endüstriyel ve genel amaçlı kullanım sonucunda kirletici olarak karışan çinko metal kompleksi olan çinko piritionun (ZnPT) LC<sub>50</sub> de erinin 1/24 (2,5µl/L ) ve 1/12 (5µl/L)'sinin *Oreochromis niloticus* türünün fingerlinglerinde genotoksik etkileri, balık eritrositlerinde mikronükleus testi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda 24 ve 96 saat süreyle ZnPT'a maruz bırakılan bireylerin kontrol grubuna göre mikronükleus ve morfolojik düzensizlik de erlerinde artış görüldü ü tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Tilapia*, LC<sub>50</sub>, Toksikite, nükleus düzensizlikleri

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Erdoğan ÇEK

**Sayfa Adedi:** 35

**DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF ZINC PYRITHIONE  
ON *Oreochromis niloticus* BY MICRONUCLEUS TEST**

**(M.Sc. Thesis)**

**Nejla ÖZCAN**

**NEV ERHACI BEKTA VEL UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**January 2018**

**ABSTRACT**

In this study, zinc pyrithione (ZnPT), which is a zinc metal complex pollutant mixed in domestic, industrial and general purpose use to aquatic ecosystem, has an LC<sub>50</sub> value of 1/24 (2,5µL/L) and 1/12 (5µL/L) of *Oreochromis niloticus*. Possible genotoxic effects in the *Oreochromis niloticus* fingerlings were determined using micronucleus test in fish erythrocytes. As a result of the laboratory studies performed, it was determined that the individuals exposed to ZnPT for 24 and 96 hours showed an increase in micronucleus and morphological irregularities according to the control group.

***Key Words: Tilapia, LC<sub>50</sub>, Toxicity, nucleus irregularities***

**Thesis Supervisor: Prof. Dr. Erdem ÇEK**

**Page Number: 35**



## Ç NDEK LER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEZ B LD R M SAYFASI .....	ii
TE EKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	v
Ç NDEK LER .....	vi
TABLolar L STES .....	viii
EK LLER L STES .....	ix
S MGE VE KISALTMALAR .....	xi
1. BÖLÜM	
G R .....	1
1.1. Çinko Piriton.....	2
1.2. Genetik Toksikoloji.....	3
1.3.Genetik Toksikoloji Testleri .....	4
1.4. Mikronükleus ve Mikronükleus Testi .....	4
1.5. Akuatik Toksikolojide Mikronükleus Testi .....	4
2. BÖLÜM	
ÖNCEK ÇALI MALAR.....	6
3. BÖLÜM	
MATERYAL VE YÖNTEM .....	9
3.1. Materyal .....	9

3.1.1. Akvaryum Suyunun Fizikokimyasal Özellikleri.....	10
3.2.Yöntem.....	10
3.2.1. Balıkların Deneye Hazırlanması .....	10
3.2.2.Kimyasalın Hazırlanması .....	11
3.2.3.Deney Yöntemi ve Uygulama Planı.....	11
3.2.4.Mikronükleus Testi .....	12
3.2.5.Mikronükleus Sayım Kriterleri .....	14
3.2.6.Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi .....	14
4. BÖLÜM	
BULGULAR VE TARTI MA .....	15
4.1. Bulgular.....	15
4.1.1.Biyodeneylere Ait Ara tırma Sonuçları .....	15
4.1.2.Davranı De i imlerine Ait Gözlem Sonuçları.....	22
4.2. Tartı ma.....	22
5. BÖLÜM	
SONUÇLAR VE ÖNER LER .....	25
5.1. Genel De erlendirme .....	25
KAYNAKLAR .....	28
ÖZGEÇM .....	37

## TABLolar L STES

Tablo 1.1. Çinko piritionun fiziksel ve kimyasal zellikleri.....	2
Tablo 3.1. Deney akvaryumlarındaki su kalitesi parametreleri .....	10

## EKLER LİSTESİ

ekil 1.1. Çinko piritinin kimyasal formülü.....	2
ekil 3.1. Nil Tilapyası ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	9
ekil 3.2. Deney düzeneği.....	12
ekil 3.3. Yama preparatlarının hazırlanması.....	13
ekil 3.4. Preparatların boyama kuvvetlerine yerleştirilmesi.....	13
ekil 3.5. Giemsa boyası ile preparatların boyanması.....	13
ekil 4.1. Normal eritrositler.....	16
ekil 4.2. Tomurcuklu nükleus görünümü.....	16
ekil 4.3. Çentikli nükleus görünümü.....	17
ekil 4.4. Binükleus görünümü.....	17
ekil 4.5. Mikronükleus görünümü.....	18
ekil 4.6. Normal kollarında 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	18
ekil 4.7. Pozitif kollarında 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	19
ekil 4.8. Doz1: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	19
ekil 4.9. Doz1: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	20
ekil 4.10. Doz2: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	20

ekil 4.11. Doz2: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları.....	21
ekil 5.1. ZnPt' ye 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan balıkların normal ve pozitif ko ulla göre ortalama mikronükleus frekanslarının de erlendirilmesi.....	26

## S MGE VE KISALTMALAR L STES

Cu	: Bakır
Fe	:Demir
Zn <sup>+2</sup>	: Çinko
Pb	: Kur un
Co	: Kobalt
Mn	: Mangan
Cr	: Krom
Ni	: Nikel
Cd	: Kadmiyum
ZnPT	: Çinko Piriton
O <sub>2</sub>	: Oksijen
S	: Kükürt
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
UV	: Ultraviyole
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
OECD	: Ekonomik birli i ve Kalkınma Örgütü
LC <sub>50</sub>	: Ölüm Konsantrasyonu (%50)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
µg/L	: Mikrogram/litre
EMS	: Etilmetil sülfat
dk.	: Dakika
Sa.	: Saat

## BÖLÜM 1

### G R

Hızlı ve kontrolsüz bir biçimde artan dünya nüfusu, yetersiz beslenme, plânsız şehirleşme, yanlış arazi kullanımı, tehlikeli maddeler, hızla yok olan yeşil alanlar ve ormanlar, bilinçsiz enerji üretimi ve tüketimi, turizm faaliyetleri, sanayileşme gibi birçok antropojenik etkinin yarattığı olumsuzluklar günümüzde ortaya çıkan en önemli çevre sorunlarıdır. Bu gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan kirliliğin boyutlarının hızla artması göstermesi nedeniyle dünyadaki ekosistemlerin dengeleri bozulmakta ve buna bağlı olarak doğal ortamda yaşayan canlıların da bu durumdan olumsuz etkilenmeleri sonucu doğmaktadır. Dünyadaki sucul ekosistemler, hava ve toprak ekosistemlerine göre daha yüksek oranda kirliliğe maruz kalmakta ve kirlilik sucul ekosistemde çok büyük alanlara da yayılarak organizma üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli sorunların başında çevre problemleri gelmektedir, bu sorunlar her geçen gün artarak karşımıza çıkmaktadır. [1, 2].

Doğal dengeyi bozan kirletici elemanlardan bir kısmı organik maddeler, ağır metaller, petrol türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktivite, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddelerdir [3].

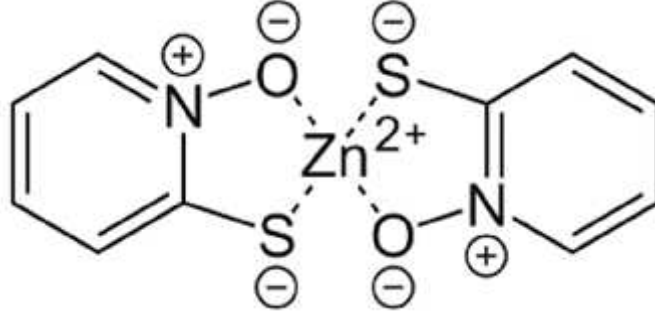
Toksik maddelerin önemli bir grubunu da ağır metaller oluşturmaktadır. Yoğunluğu  $5\text{gr/cm}^3$ 'den büyük olan Cu, Fe, Zn, Pb, Co, Mn, Cr, Ni ve Cd gibi metal gruplarına ağır metaller adı verilmektedir [4]. Ağır metaller doğal yolların dışında jeolojik ayrışma, şehirsel suları, maden tasfiyeleri, endüstriyel maddeler, tarımda tercih edilen gübreler ve ilaçlar, endüstriyel baca gazları, şehir içi ve şehirlerarası araç trafiği, çöp toplama alanlarının sızıntı suları ile sucul ekosistemlere yayılarak ve sucul ortamlarda ciddi kirlenmeler olmaktadır [5-9].

Doğaya bırakılan antropojenik maddeler zamanla ayrışıp çevreye dönmekte ve teknolojinin fazla olarak ürettiği kalıcı toksik maddeler ve ağır metaller ortamda her geçen gün biraz daha artmaktadır. Tehlikeli boyutlarda ağır metal birikimleri sonucunda doğal suların kalitesi bozulmakta ve doğal sularda çözümlü tuzlar halinde bulunan ağır metaller genel olarak her türden su organizmasına akut toksik etkiye sahiptir [10].

## 1.1. Çinko Pirition

Çinko, do ada birçok mineral ile birle im halinde bulundu undan, ekosistemdeki, ba lıca kayna ını endüstriyel ve madensel atıklar olu turur [11]. Bu atıklardan farklı olarak atmosferik parçacıklar, evsel ve tarımsal atıklar, sucul ekosistemlerde çinko deri imini arttıran nedenlerdendir [5].

Çinko pirition (ZnPT); çinko koordinasyon kompleksidir ve yaygın olarak anti-kepek ampuanı olarak kullanılır [12].



ekil 1.1. Çinko piritionun kimyasal formülü [13]

Tablo 1.1. Çinko piritionun fiziksel ve kimyasal özellikleri [13]

Molekül formülü	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> Zn
IUPAC ismi	bis(2-pyridylthio)zinc1,1'-dioxide
CAS numarası	13463-41-7
Molar hacmi	317,70 g/mol
Erime noktası	240°C
Sudaki çözünübilirli i	8 ppm (Ph 7)

Çinkonun membran bütünlü ünün korunmasında görev yaptı ı gibi antioksidant bir rolünün oldu u da belirtilmi tir [14]. Buna ek olarak çinko hücre bölünmesinde, büyüme, metabolizma ve ba ı klık sisteminde de önemli roller oynamaktadır [15]. Organizmalarda çinkonun reaktif oksijen türleri, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve singlet Oksijen (O<sub>2</sub>) gibi hücreye zarar veren serbest radikallere kar ı koruyucu görev



yaptığı belirtilmektedir [16]. Çinkonun O<sub>2</sub> ve Kükürt (S) dönerleriyle çok kolay kompleks yapabildiği, nükleik asit biyosentezinde görev aldığı ve dokuların düzelmesiyle ilgisinin olduğu belirtilmiştir [17]. Çinkonun yüksek derişimleri ise sucul organizmalar üzerinde toksik etkiye sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir [18].

Balıklarda çinkonun hedef organı solungaç epiteli olup hypoksiya neden olmakta diğer taraftan ozmoregülasyon bozuklukları, asidosis, atardamarlarda düşük oksijen basıncı ve solungaç ve iç organlarda gaz değişimi aksamalarına neden olduğu bildirilmektedir [19]. Bunun yanı sıra çinkonun balıklarda solunum ve kalp fizyolojisinde de işimlere neden olduğu da belirtilmektedir [20]. Çinkonun organizmalarda yaptığı biyokimyasal işimler arasında enzimler üzerinde yer alan diğer metallerin yerini alması, tiyol gurupları ve bazı aminoasitlere bağlanarak polipeptid zincirinde yapısal işimlere neden olması, canlı hücrelerde enerji metabolizmasını etkilemesi, ayrıca metallothionein üretimine neden olması ve tüm membranlarda iyon taşıma kanallarıyla etkileşime girmesi sayılabilir [21].

Birçok organizma için gerekli bir element olan Zn<sup>+2</sup>'nin, subletal derişimlerinde balıklarda büyümeyi geciktirici ve durdurucu etkilere neden olduğu, yüzme hareketlerini, davranış ve kan kimyasını değiştirdiği; doğurganlığı ve osmoregülatör kapasiteyi bozduğu belirtilmektedir [22].

## **1.2. Genetik Toksikoloji**

Genetik toksikoloji, kimyasallar ve radyasyonun kalıtsal materyaller ya da hücreler üzerindeki toksik etkilerini incelemektedir. Genetik toksikoloji ayrıca mikronükleus formasyonunu, kromozomal anomalileri, kromozomal anöplidileri ve memeli hücrelerindeki morfolojik ve neoplastik transformasyonları da kapsamaktadır. Buna ek olarak kimyasal karsinojenleri ve bunların onkogenleri aktivasyonunu, tümör supresör genlerindeki kötü huylu mutasyonları da incelemektedir. Genetik toksikoloji araştırmacılara DNA hasarını, kimyasal karsinojen UV ve iyonize radyasyonun mutajenik ve karsinojenik etkilerini ölçmeye olanak tanımaktadır [23].

### **1.3.Genetik Toksikoloji Testleri**

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, çeşitli mekanizmalarla doğrudan veya dolaylı olarak genetik materyalde hasara neden olan bileşikleri bulmak için geliştirilmiştir. *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar. 1970'lerden bu yana mutajenik ve genotoksik olan maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksikite testi geliştirilmiştir. Genotoksikite testleri birçok fiziksel ve kimyasal ajanın genetik araçtaki etkilerini ve güvenilirliklerini araştırmada geniş kullanım alanlarına sahiptir [24-28].

### **1.4. Mikronükleus ve Mikronükleus Testi**

Mikronükleus; ana çekirdekten ayrı, asentrik kromozom veya kromatid fragmanları veya mitoz sırasında telofazın tamamlanmasında anafazda ayrılma sırasında ipliklerine tutunmadığından çekirdeğe dâhil olmayan DNA parçalarıdır. Dolayısıyla mikronükleus, anafazda asentrik fragmanlara neden olan kromozom kırılmaları gibi klastojenik veya anöjenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir [29].

Mikronükleus sayısındaki artış, ajanların oluşturduğu sayısal ve yapısal olarak kromozom anomalilerinin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. Mikronükleus ara safhalı hücrelerde kolaylıkla saptanabilir. Mikronükleus testi, *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen bir test olmakla beraber sitogenetik hasarı tespit etmede, kromozom analizlerine göre kolay yapılabilir, daha fazla hücre sayımı ve istatistiki açıdan daha uygun sonuç elde etme gibi avantajlardan dolayı yaygın şekilde kullanım alanına sahiptir [30].

### **1.5. Akut Toksikolojide Mikronükleus Testi**

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 1979 yılında 129 maddelik öncelikli çevre kirletici listesi yayınlamıştır [31]. Takip eden yıllarda bu liste yeni maddelerin eklenmesiyle yıldan yıla artış göstermiştir. OECD verilerine göre 1994 yılında mevcut olan 100.000 civarındaki kimyasal maddeye yılda yaklaşık 1.500 yeni kimyasal eklendiği ön görülmektedir. Endüstriyel teknolojinin ilerlemesiyle

birlikte, endüstriyel atık kaynakları daha da karmaşık bir hale gelmekte ve bundan dolayı da atık suların toksisitesi de daha ciddi düzeylere ulaşmaktadır. Havayı ve toprağı kirleten doğal veya antropojenik kirleticiler nihayetinde su ortamına ulaşmakta ve bu atıkların birikimi ve kalıcılığı biyolojik yaşamı tehdit eder hale gelmektedir. Kirleticilerin sucul ekosistemlere atılmasının hem bentozda hem de demersal ve pelajik ortamdaki besin zincirlerinde birikmesine yol açabileceği bilinmektedir. Bu nedenle insanlar kirliliğe maruz kaldığı sucul ortamda yaşayan canlıları besin olarak tükettikleri sürece toksik maddelere ömür boyu maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, kirleticilerin suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi oldukça önemlidir [32].

Suların biyolojik denetimi, kirletici konsantrasyonlarının sucul canlıların dokularındaki tespiti ile gerçekleştirilmektedir. Bu prosedür "doz göstergeleri" ve "etki göstergeleri" olarak isimlendirilen biyolojik parametrelerin muhtemel değişikliklerini ortaya çıkaran biyolojik belirteçlerdir. Doz göstergelerinin kullanılması, nelerin aranması gerektiğini ilkin bilgiyi ima ederken, etki göstergelerinin kullanılması, henüz tanımlanmamış maddeler tarafından üretilen hasarın tespit edilmesine imkan vermektedir. Bu biyolojik göstergeler arasında, muhtemel kanserojenik özelliklere sahip sayısız madde tarafından üretilen hasarın tespit edilmesine izin vermesi için sitogenetik testler özellikle yararlıdır. Stahl [33, 34] endüstriyel atık suların %30'unun genotoksik kimyasallarla kirlendiğini belirtmiştir. Günümüzde bu durumun çok yüksek seviyelere ulaşmış olduğunu tahmin etmek zor değildir.

Mevcut sitogenetik tahlillerde klastojenik ve anevizik ajanların neden olduğu yapısal ve sayısal kromozomal aberasyonların tespitinde sıklıkla mikronükleus testi kullanılmaktadır. Mikronükleus testinin laboratuvar araştırmalarındaksenobiyotiklerin genotoksitesini de erlendirmek ve in situ çalışmaları sırasında su kalitesini de erlendirmek için uygun bir araç olduğu kabul edilmektedir [32].

Bu çalışmada ile toksisitesi yüksek olan çinko piriton ağırlık metalinin canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılmasından hareketle 1/24 ( 2,5µl/L ) ve 1/12 ( 5 µl/L )'sinin maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* türünün fingerlinglerin de oluşacak genotoksik etkilerin, mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEK ÇALI MALAR

Mikronükleus, 19. Yüzyılın sonunda Howell ve Jolly'nin, kedilerden ve sıçanlardan alınan küçük inklüzyonları bulmasıyla tanındı. Howell-Jolly cisimleri olarak adlandırılan küçük inklüzyonlar, iddetli anemi hastalarının periferik kan eritrositlerinde de görülmektedir [35].

Countryman ve Heddle [36] kültürde insan lenfositlerinin kullanıldı ı bir yöntem bildirmi lerdir. Bu yönleme Fenech ve Moley [37] tarafından sitokalazin B kullanılarak de i iklikler yapılmı ve bu de i iklikler insanlar tarafından kullanılarak günümüze kadar ula mı tır.

Lahdetie ve çalı ma arkada ları [38] ile Tates ve çalı ma arkada ları [39] erkek germ hücreleri kullanan bir yöntem bildirmi lerdir. Sundukları raporlarda, kimyasalların kalıtsal yan etkilerinin potansiyelini saptamak için mikronükleus testinin kullanılabilce ini ileri sürmü lerdir.

Mikronükleus testi normalden büyük boyuttaki nükleusları da tespit etmektedir [40]. Mitotik aparatın bozulmasına neden olan kimyasalları tespit etmek için antikoru kullanarak kinetokora spesifik boyama ba latılmı tır [41]. Hayashi ve çalı ma arkada ları, periferik kandan mikronükleus izole etme yöntemi ve sentromere sahip olmayan mikronükleusları ayırt etme yöntemini bildirmi lerdir [42].

Balıklar sudaki genotoksikoloji alanında en çok kullanılan hayvanlardır. Balıklarla ilgili biyolojik izlenme tekniklerinin geli tirilmesi, dü ük konsantrasyonda bile etki eden toksikantları kontrol etme imkânı sunmaktadır. Balıklar üzerine yapılmı olan ZnPT ile ilgili çalı malara ve mikronükleus testine örnek olarak a a ıdaki çalı malar gösterilebilir.

Clearwater ve çalı ma arkada ları [43] balıklar için besinlerde belirli oranlarda çinko bulunmasının art oldu u bildirilmektedir ve bu oran ço unlukla kuru yemde 20 mg/kg civarındadır. Borovansky [44], Chukhlovın [45] ve Wood [46] adlı ara tırcılar da çinkonun nispeten non-toksik bir element oldu unun kabul edilmesine ra men, di er

tüm a ır metaller de oldu u gibi canlının yüksek dozlara maruz kalması durumunda toksik etki gösterdi ini bildirmektedirler.

Thorp ve Lake bir tatlı su karidesi olan *Paratya tasamaniensis* için ZnPt'nin 96 saatlik LC<sub>50</sub> de erini 1,1 mg/l olarak bulmu tur [47] .

Burton ve Fisher; *Palaemonetes pugio* adlı karides türünde yapılan bir çalı mada çinko için 48 saatlik LC<sub>50</sub> de eri 11,3 mg/l olarak bildirilmi tir [48] .

Matthiesen, yaptı ı çalı mada *Gastrosteus aculeatus*'un distile suda 0,5-1,0 mg Zn<sup>+2</sup>'ya maruz bırakılmasının balıkların 1-3 gün içerisinde ölümüne yol açtı ını ancak sert suda 2.0-2.6 mg Zn<sup>+2</sup>'nın 700 saatlik bir süre boyunca balıklarda herhangi bir toksik etki göstermedi ini kaydetmi tir [49] .

*Phoxinus phoxinus* ile yapılan bir çalı mada [50] 0,05-0,20 ppm Zn<sup>+2</sup>'ya maruz bırakılan balıkların 150 günlük süre sonunda kontrol grubuna oranla çok daha yavaş büyüme gösterdi ini tespit etmi tir. Ara tırmacı aynı zamanda juvenillerin, erginlere oranla çinkoya daha duyarlı oldu unu vurgulamı tur. Brungs [51], Crandall ve Goodnight [52], Çinkonun sub-lethal konsantrasyonlarının uzun süreli uygulanmasının *Poecilia reticulatus*, *Pimaphales promelas* ve *Lebistes reticulatus* gibi balık türlerinde de büyüme olumsuz etkiledi i bildirilmi tir. Bu durumun çinko verilen balıklarda i tahın azalmasına ve/veya tat reseptörlerinin bozulmu olmasına ba lı olabilece ini öne sürmü tür. Ancak di er taraftan çinkonun, karaci er mitokondrisinde inorganik fosfatın organik fosfata dönü türülmesini bozdu u ve dokulara oksijen alınımını inhibe etti i bulunmu tur [53] .

Watson ve McKeown [54] 0,21-1,12 ppm çinkoya maruz bıraktıkları *Oncorhynchus mykiss*'de Zn uygulamasının balıklarda 7. güne kadar glukoz seviyesini arttırdı ını, ancak sonraki dönemde glukoz seviyesinin tekrar normale döndü ünü tespit etmi lerdir.

Mishra ve Srivastava [55] ise 100 ppm çinkoya 90 saat süreyle maruz bırakılan *Colisa fasciatus*'da alyuvar ve akyuvar sayısı, hematokrit ve lökokritin dü tü ünü, trombosit sayısı, pıhtıla ma süresi ve hemoglobin seviyesinin de i medi ini, sedimantasyon oranının ise arttı ını bulmu lardır.

Grobler ve çalı ma arkada ları [56] *Tilapia sparrmanii*'de yaptıkları çalı mada çinkoya (98 mg/l) maruz bırakılan balıkların oksijen tüketim oranının dü tü ünü tespit etmi lerdir. Aynı alı mada bu durumun solungaçlarda mukus birikimi ve/veya solungaçlarda meydana gelen yapısal hasar sonucu geli mi olabilece i vurgulanmı tır. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda çinkoya maruz bırakılan balıklarda laktik asit seviyesinin de yükseldi i bildirilmi tir [57].

Öner ve çalı ma arkada ları [58] 5, 10, 20 ve 30 gün süreyle  $ZnCl_2$ 'e maruz bıraktıkları *O. niloticus* serum total protein seviyesinin de i medi ini tespit etmi lerdir.

Fırat ve Kargın [59] 0,5 mg/l'lik çinkoya 7 ve 14 gün süreyle maruz bıraktıkları *O. niloticus* albümin, seruloplazmin, plazma glukoz ve total protein seviyesinin her iki deneme süresinde de kontrol grubuna oranla yüksek oldu unu bulmu lardır.

Kurihara ve çalı ma arkada ları [60] tarafından *Umbra limi* ve *Carassius auratus* türlerinde kromozomal aberasyonları ve mikronükleusu incelenmi , yine Ueda ve çalı ma arkada ları [61] tarafından ise *Rhodeus ocellatus* ve *C. auratus* türlerinde mitomisin C'nin etkileri mikronükleus testi ile belirlenmi tir.

Al-Sabti [62] tarafından ise *Carassius gibelio* türünde dü ük konsantrasyonda selenyum, civa, metil civa ve bunların karı ımının mikronükleus indüksiyonunu genotoksik etkileri belirlenmi tir.

Arkhipchuk ve Garanko [63] *Cyprinus carpio*, *C. gibelio* ve *Tilapia (Saratherodon) mossambica* türlerinde bakır, kadmiyum iyonları ve kloral hidratın balık yüzgelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini ara tırmı lardır.

ava ve Adıgüzel [64] mikronükleus testi ile *C. auratus* türünde glifosatın periferik eritrositlerde sitogenetik ve DNA hasarını tespit etmi lerdir.

Gül ve çalı ma arkada ları [65] malathiona maruz kalan *Oxyaemacheilus angorae* türünün periferik eritrositlerindeki mikronükleuslarını incelemi lerdir.

Winter ve çalı ma arkada ları [66] *Pimephales promelas* türünün eritrositlerinde mitomisin C ve siklofosfamid akut tedavisi sonrası mikronükleus olu umu ile ilgili bir çalı ma yürütmü lerdir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

*Oreochromis niloticus* son yıllarda sucul ekosistemdeki kirleticilerin biyolojik etkilerini incelemek için gösterge organizma olarak yo un bir ekilde kullanılmaktadır ( ekil 3.1). Bir sıcak su türü olan Nil tilapyası olumsuz çevre artlarında kolaylıkla ya ayabilen bir balık olmakla birlikte organizmanın biyolojik yapısı incelendi inde di er balık türlerine oranla kötü çevre ko ullarına daha dirençli oldukları görülmektedir [67].



ekil 3.1. Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*)

Bu çalı mada da ZnPT'nin eritrositler üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, klinik olarak sa lıklı ve herhangi bir toksik maddeye maruz kalmamı olan *O. niloticus* fingerlingleri kullanılmı tır. Deney materyali olarak kullanılan *O. niloticus* bireyleri, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dr. Nazmi Tekelio lu Tatlı Su Balı 1 Uygulama ve Ara tırma Merkezi'nden temin edilmi tır. Kullanılan bireylerin ortalama a ırlıkları  $37,08 \pm 0,02$  g ve total boyları ise  $13,26 \pm 1,1$  cm oldu u belirlenmi tır. Balıkların deneylerde kullanılması Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13.06.2012 tarih ve 06 sayılı toplantısı ile onaylanmı tır.

### 3.1.1. Akvaryum Suyunun Fizikokimyasal Özellikleri

Ara tırmada deney suyu olarak 24 saat bekletilen ve havalandırılarak kloru giderilmi musluk suyu kullanılmı tır. Biyodeneyle sırasında hacmi 60 litre olan akvaryumlar 50 litre su ile doldurulmu tur. Akvaryum suyunun fizikokimyasal analizi günlük olarak portatif çoklu ölçüm cihazı (YSI Professional Plus) ile yapılmı tır. Deneyde kullanılan akvaryum suyunun su kalitesi de erleri Tablo 3.1. de gösterilmi tir.

Tablo 3.1. Deney akvaryumlarındaki su kalitesi parametreleri

Parametre	De er
pH	8,6
Çözünmü Oksijen (mg/L)	5,7
Sıcaklık (°C)	22,8
Elektriksel letkenlik (mS/cm)	609
Tuzluluk (ppt)	0,29
TDS (mg/L)	0,3914

### 3.2.Yöntem

#### 3.2.1. Balıkların Deneye Hazırlanması

Çalı ma için deney düzene i Nev ehir Hacı Bekta Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Hidrobiyoloji Ara tırma Laboratuvarında kurulmu tur. Deneyde kullanılan balıklar biyodeneyle önce dinlendirilmi su ile dolu 50 litrelik tanklara konulmu ve tanklar havalandırılmı tır. Balıklar deney öncesi 15 gün süre ile ortama uyum sa laması için bu tanklarda bekletilmi tir. Uyum periyodu boyunca balıklar her gün bir kez a ırlıklarının % 2'si oranında granüllü alabalık yemi ile beslenmi lerdir ve deneyler ba lamadan 48 saat önce yemlenme kesilmi , bu süreç içerisinde balıkların hastalanma ve ölüm oranının % 5'ten fazla olmamasına dikkat edilmi tir [68]. Deney ortamındaki ı ıklandırma, do al periyoda uygun olarak 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık olacak ekilde ayarlanmı tır. Deney tanklarında aynı uyum periyodundaki tanklar gibi deklorize edilmi ebeke suyu kullanılmı ve deney süresince tank suyunun sıcaklı ı  $22,8\pm 0,7^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmu tur. Kontrol grubu olarak ayrılan akvaryumlarda ki



bireylerde ölüm oranının %10'u geçmemesine ve %90'ının sağlıklı olmasına dikkat edilmiştir [68].

### **3.2.2. Kimyasalın Hazırlanması**

Çinko piriton, dimetilsülfoksit (DMSO) (oadine powder, Arch Biocides, UK) içinde çözülerek hazırlanmıştır, saf su ile seyreltilerek 2,5 ml/L ve 5,0 ml/L olmak üzere iki farklı doz hazırlanmıştır ve uygulama süresince karanlık ortamda depo edilmiştir.

### **3.2.3. Deney Yöntemi ve Uygulama Planı**

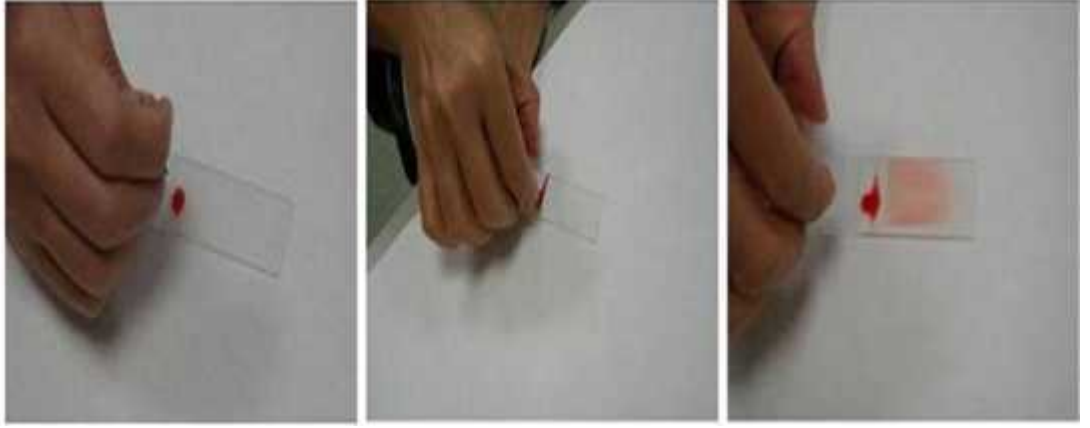
Balıklar rastgele olmak üzere kontrol ve deney gruplarına ayrılmıştır. Deney grubu (4 akvaryum) ve kontrol grupları (2 akvaryum) için toplam 6 adet akvaryum kullanılmıştır ve her birine 12 birey yerleştirilmiştir (ekil 3.2). Deney gruplarına Doz1: 2,5 µl/L ve Doz2: 5 µl/L olmak üzere iki farklı doz uygulanmıştır. Deney iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Akvaryumların üzeri çalışması süresince plastik bir örtü ile kapatılmıştır. Akvaryumlarda doz uygulamasından önce ve deney süresince balıkların olası davranış değişiklikleri takip edilmiştir. Deney doz uygulamasından itibaren 24 ve 96 saat süre devam ettirilmiştir. Bütün bireylerden 24 ve 96 saat sonunda kalp ve kuyruk bölgelerinden kan alınmıştır.



ekil 3.2. Deney düzene i

#### **3.2.4. Mikronükleus Testi**

Mikronükleus analizleri periferel kırmızı kan hücrelerinde gerçekte tirilmi tir. Bunun için kullanılan balıkların kalp ve kuyruk kısımlarından alınan kanlar, her örnek için hazırlanmı olan üç temiz lama ince bir tabaka ekilde yayılmı tır ( ekil 3.3). Hazırlanan preparatlar havada kurutulduktan sonra %95'lik etanolde 20 dk. süresince sabitlenmi tir ( ekil 3.4). Sabitlenen bu preparatlar tekrar havada kurutulduktan sonra %5'lik Giemsa solüsyonunda 20 dk. süresince boyanmı lardır ( ekil 3.5). Boyama i leminden sonra preparatlar, saf sudan geçirilerek fazla boya uzakla tırılarak, sayımları yapılmak üzere mikroskop altında incelemeye alınmı tır [69].



ekil 3.3. Yayma preparatlarının hazırlanması



ekil 3.4. Preparatların boyama küvetlerine yerle tirilmesi



ekil 3.5. Giemsa boyası ile preparatların boyanması

### 3.2.5. Mikronükleus Sayım Kriterleri

Her bireyden 6 preparat hazırlanmış olup her preparattan 1000 hücre sayılarak mikronükleus de erlendirilmesi yapılmıştır. Hazırlanan preparatlarda mikronükleus ile karıştırılabilen yapılarla karışılabilir için mikronükleus sayımlarında genel olarak standardize edilmiş ölçütler göz önüne alınmaktadır. Bu ölçütleri şöyle sıralayabiliriz.

Mikronükleuslar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır,

Mikronükleuslar ana nükleus 'la aynı mikroskopla görülebilecek görüntüyü vermeli,

Mikronükleuslar ana nükleus'un ile boyama tonları benzer olmalı,

Mikronükleuslar ana nükleus'un çevresine yakın durumda bulunmalı,

Mikronükleuslar boyut olarak ana nükleus'un 1/3'ünden küçük olmalıdır.

### 3.2.6. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Analizi

Morfolojik nükleus düzensizlikleri periferik yayma ile kırmızı kan hücrelerinde de erlendirilmiştir. Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco ve çalıma arkadaşlarına göre [70]; çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve binükleus olmak üzere dört gruba ayrılarak de erlendirilmiştir. De erlendirmeler için her preparattan 1000 hücre sayılmıştır.

**a) Çentikli nükleus:** Hücre zarında çekirdek içerisine doğru olan ve girintilere sahip çekirdek yapısıdır.

**b) Tomurcuklu nükleus:** Hücre zarından dışarı doğru küçük tomurcuklanmalara sahip çekirdek yapısıdır.

**c) Loblu nükleus:** Tomurcuklu nükleuslara göre büyük ve çok sayıda sayıda loblar içeren çekirdek yapısıdır.

**d) Binükleus:** Bir hücre içerisinde iki adet çekirdek bulunma durumudur.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR VE TARTI MA

#### 4.1. Bulgular

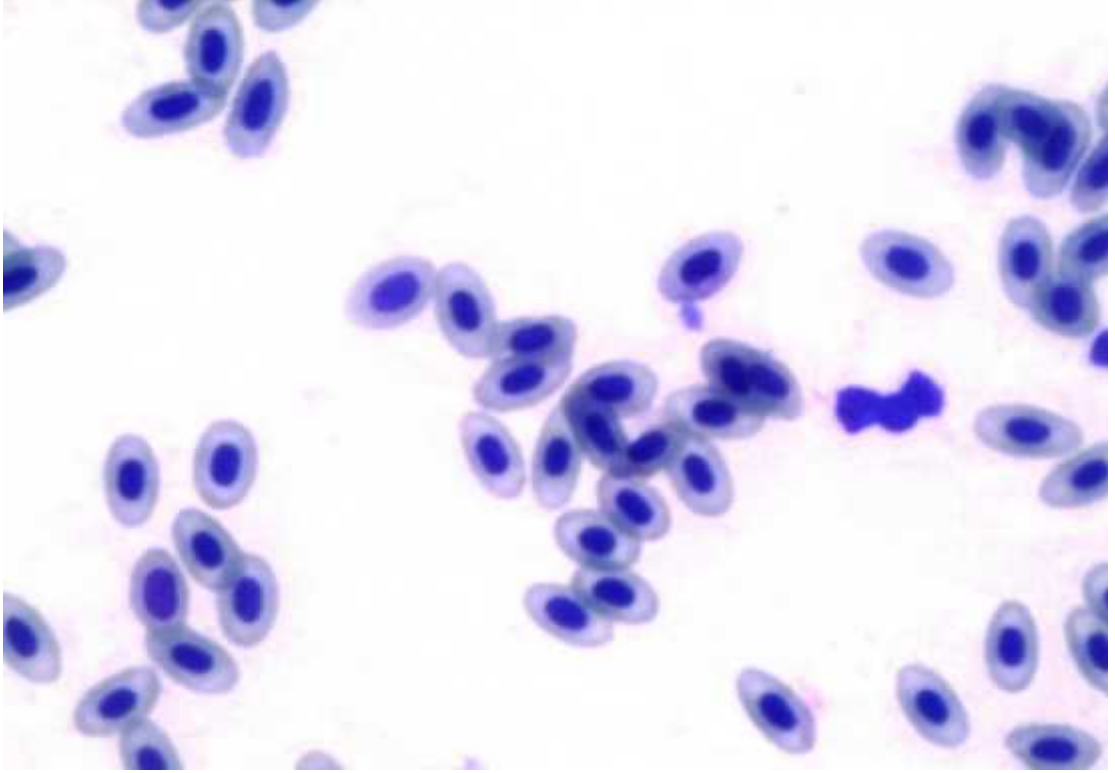
##### 4.1.1. Biyodeneylere Ait Ara tırma Sonuçları

Bu ara tırmada sucul ekosistemin indikatör organizmalardan birisi olan balıklara (*O. niloticus*) toksisite gösterdi i dü ünülen ZnPT kullanılmı tır. Ara tırmanın hipotezi akut LC<sub>50</sub> de erinin 1/24 ve 1/12'si olan 2,5 ve 5 µl/L sublethal doz seviyesinde ZnPT 'ye, çevresel kirleticilere ergin balıklardan daha hassas oldu u bilinen Nil tilapyası fingerlingleri, maruz bırakıldıklarında mortalite (ölüm) görülmeden ve davranı de i ikleri olmadan genotoksik hasarların mikronükleus testi ile belirlenmesi amaçlanmı tır.

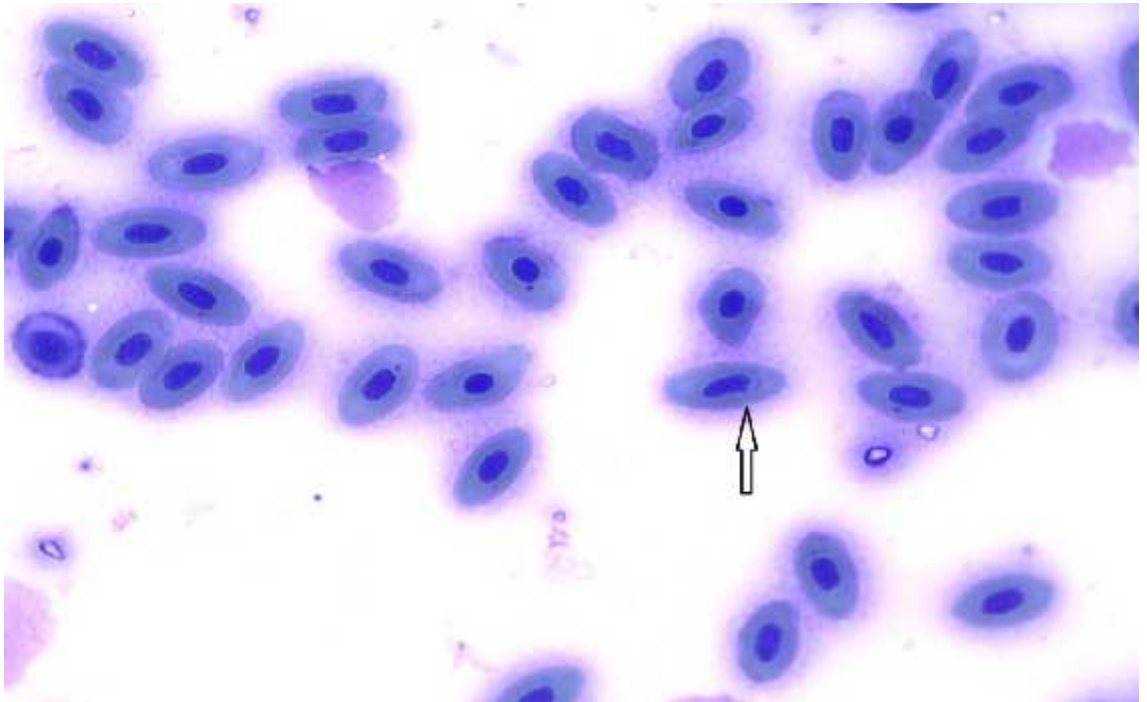
Bu amaçla laboratuvar artlarında Nil tilapyası fingerlingleri 15 gün adaptasyon süresinin sonunda hesaplanan 2,5 ve 5 µl/L ZnPT konsantrasyonlarına 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılarak bu sürenin sonunda balıklardan alınan kanlar ile preparatlar hazırlanmı ve ık mikroskobu altında mikronükleus sayımları yapılp, de erlendirilmı tır.

Boyaması yapılmı olan preparatların mikroskop altında incelenmesi sonucunda mikronükleus frekansları ile kromozom anomalilerinden tomurcuklu nükleus, çentikli nükleus, loblu nükleus ve binükleus frekansları belirlenmi tır.

Mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri kırmızı kan hücrelerinde incelenmi tır. Mikroskopta incelenen eritrosit hücrelerinin foto rafları 100'lük objektifte immersiyon ya ı kullanarak çekilmı tır ( ekil 4.1- ekil 4.5 )



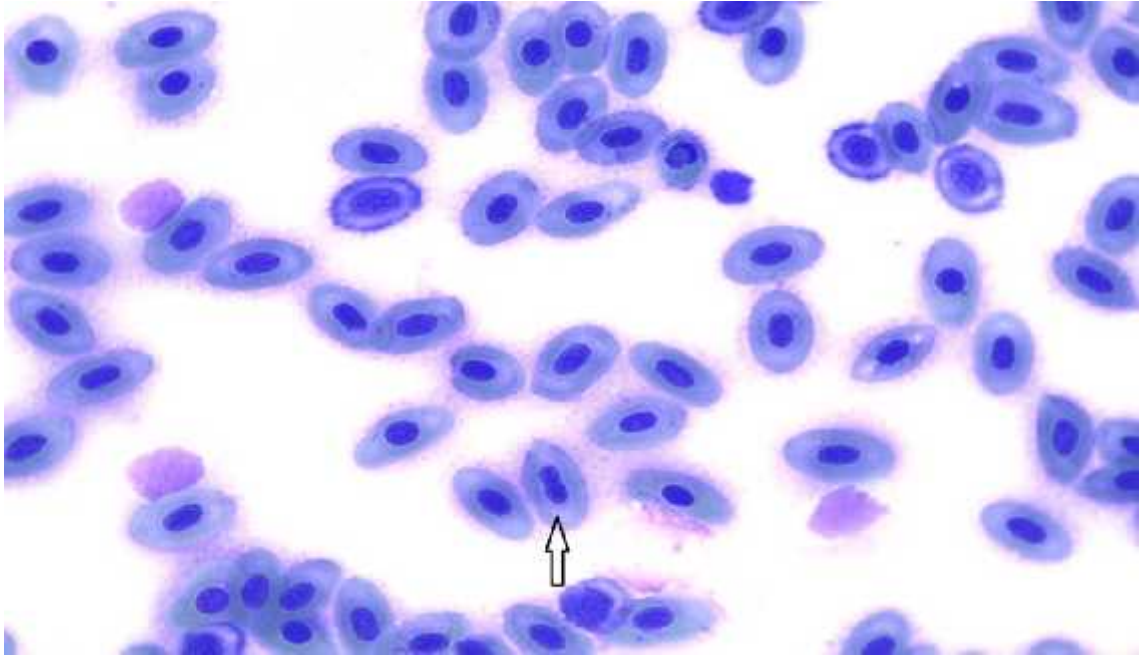
ekil 4.1. Normal eritrosit



ekil 4.2. Tomurcuklu nükleus görünümü

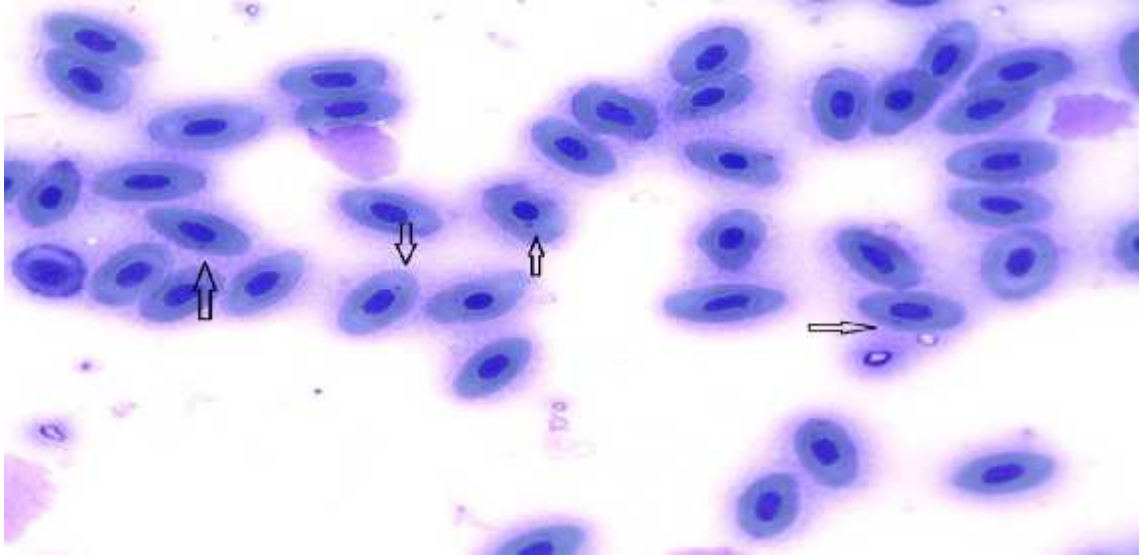


ekil 4.3. Çentikli nükleus görünümü



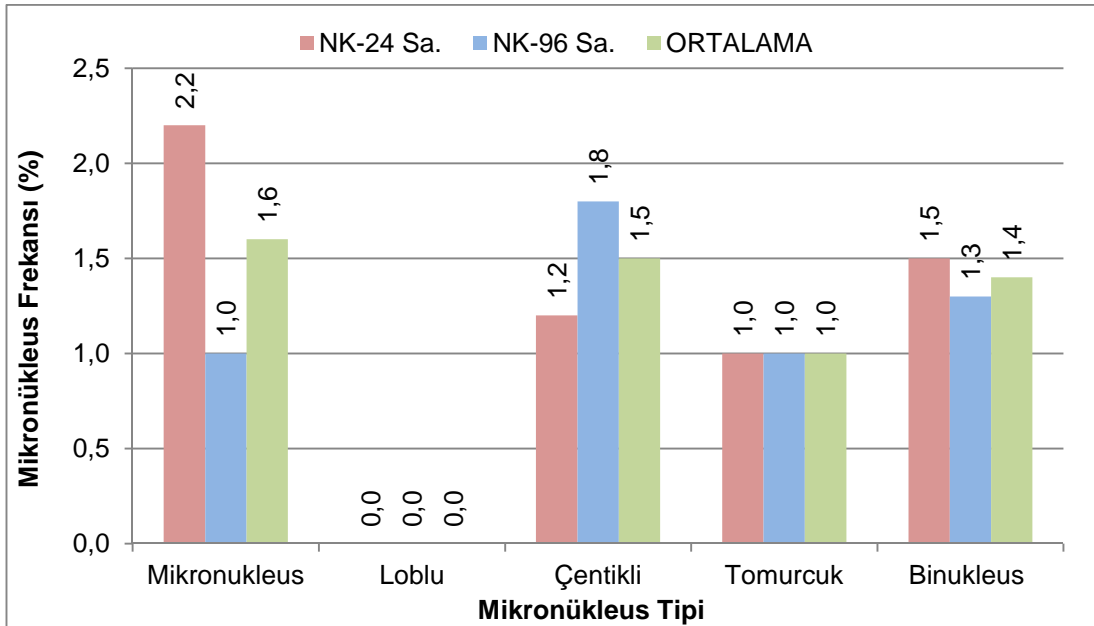
ekil 4.4. Binükleus görünümü





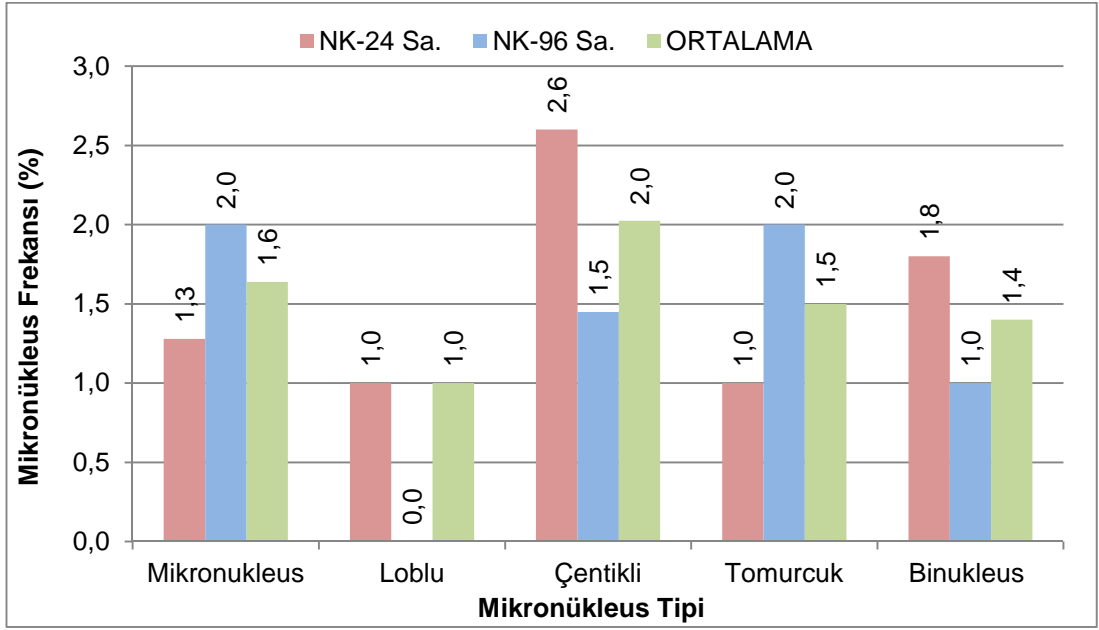
ekil 4.5. Mikronükleus görünümü

Belirtilen dozlarda ZnPT'a maruz kalan tilapialarda deney sonrası alınan kanlar ile kontrol grupları arasındaki genotoksik hasarlar mikronükleus testi ile incelenmiştir. Etil Metan Sülfat (EMS) yalnızca genotoksikite testinin pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır. İçin deney sonuçlarında kıyaslama yapabilmek için bu gruptaki balıklardan da kan alınmıştır ve mikronükleus testi yapılmıştır.

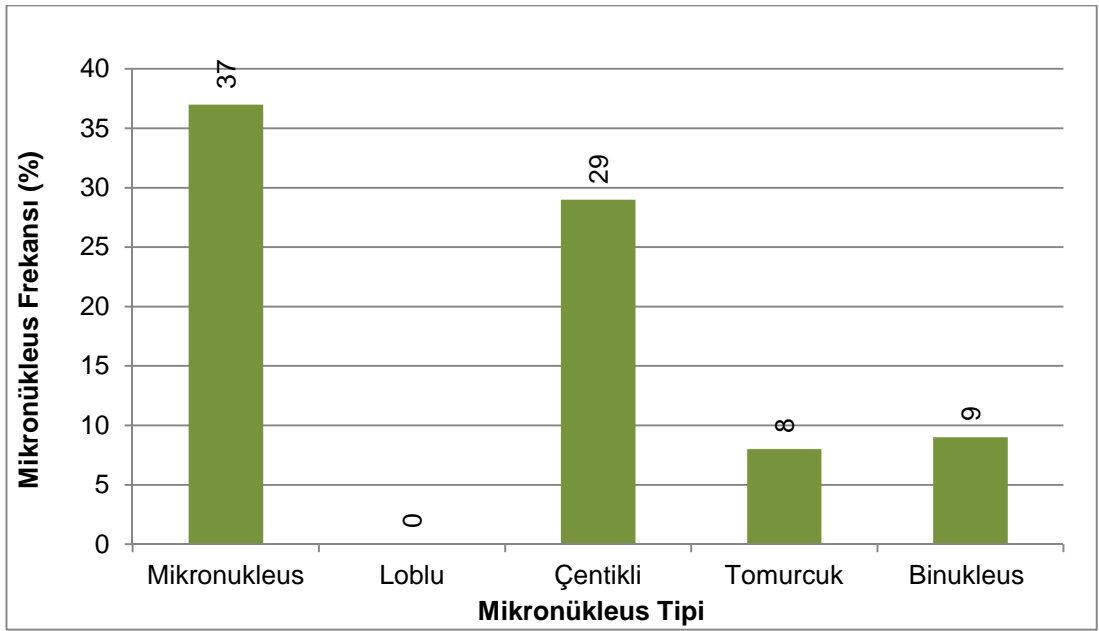


ekil 4.6. Normal kollarında 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları

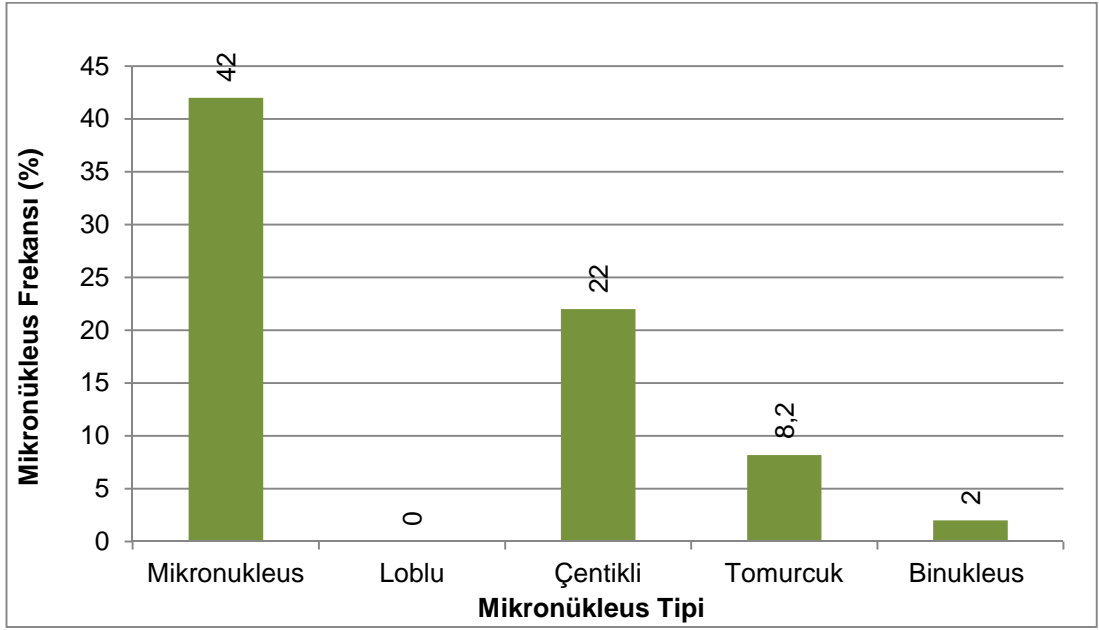




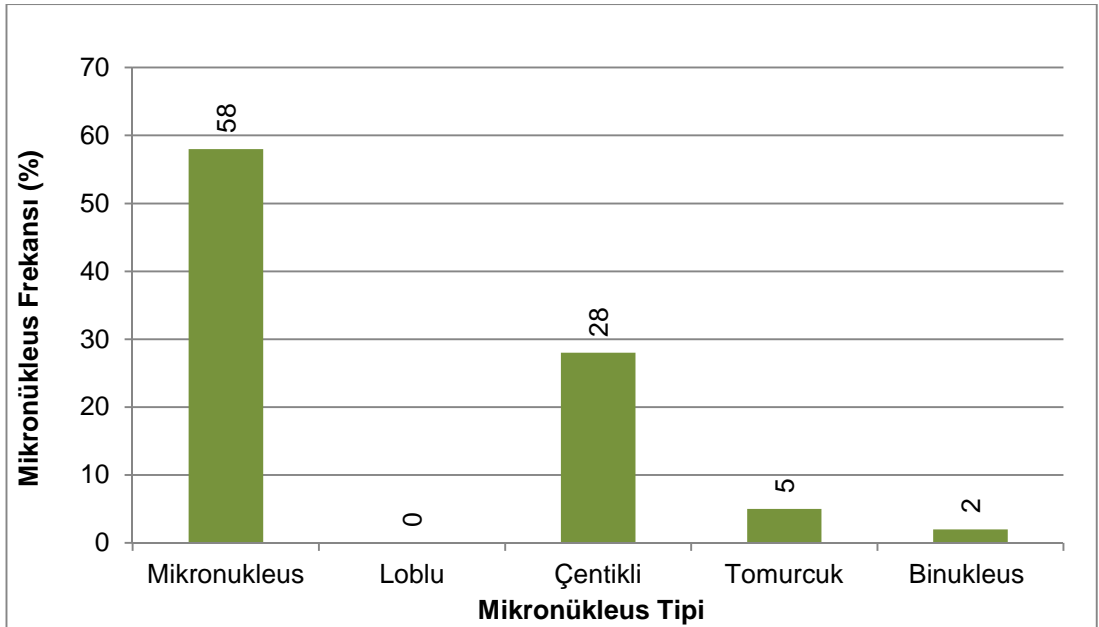
ekil 4.7. Pozitif ko ullarda 24 ve 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



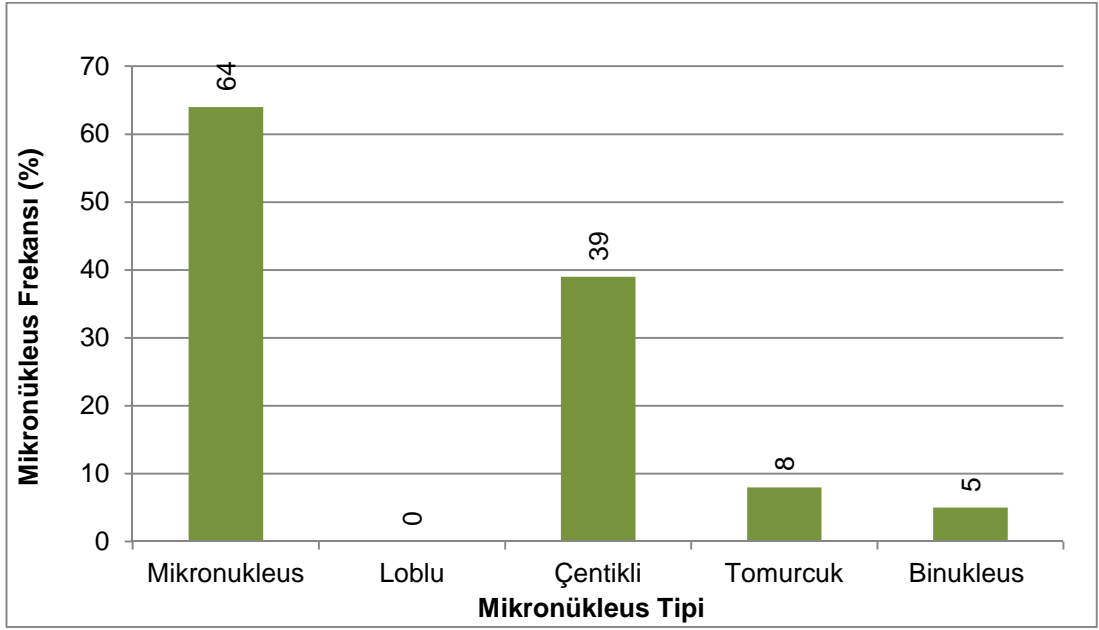
ekil 4.8. Doz 1: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



ekil 4.9. Doz 1: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



ekil 4.10. Doz 2: 24 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları



ekil 4.11. Doz 2: 96 saat boyunca izlenen balık eritrositlerinin ortalama mikronükleus frekansları

Kontrol grubundaki balık materyallerinden elde edilen 1000X6 eritrosit hücresi sayımı sonuçlarına göre ortalama mikronükleus sayısı %6, toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %1,3 olarak belirlenmiştir.

Doz1 için; 2,5 µl/L 24 ve 96 saat boyunca ZnPT 'ye maruz bırakılan balık materyallerinden elde edilen 1000X6 eritrosit hücresi sayımı mikronükleus ortalaması %39,5 toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %13,03 olarak belirlenmiştir.

Doz2 için; 5 µl/L 24 ve 96 saat boyunca ZnPT' ye maruz bırakılan balık materyalinden elde edilen 1000x6 eritrosit hücresi sayımı mikronükleus ortalaması %61 toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri ortalaması %14,49 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler sonucunda uygulanan ZnPT'nin doz artışı ve zamana bağlı olarak mikronükleuslu eritrosit frekansında kontrol grubuna göre artış olduğu saptanmıştır.

#### 4.1.2. Davranı De i imlerine Ait Gözlem Sonuçları

Belirli konsantrasyonların üzerinde do rudan organizmanın ölümüne neden olan a ır metallere öldürücü dozun altındaki yüksek konsantrasyonlarda davranı de i imlerine ve genetik yapıda bozulmalara neden olabilmektedir [18].

Sucul organizmalar stres faktörlerinde kaldıklarında beslenme, büyüme ve üreme davranı larını de i tirerek tepki gösterirler [18].

Kontrol grubundaki balıklarda davranı ve yüzme hareketleri normal olup deney süresince ölüm görülmemi tir. Belirlenen süre ve deri imlerde denenen ZnPT'nin etkisinde balıklarda mortalite gözlemlenmemi tir. Ancak deney süresince ZnPT'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıklarda;

- ❖ Ani irkilme,
- ❖ Ba a a ı ve dikey yüzme,
- ❖ Yüzme hareketlerinde koordinasyon bozuklukları,
- ❖ Akvaryumun dip kısımlarında toplanarak hareketsiz durma,
- ❖ Su içerisinde ters dönme,
- ❖ Su yüzeyinde toplanma,
- ❖ Solunum güçlü ü ve hareketlerinde yava lama,
- ❖ Suyun dı ına kaçma,
- ❖ Deney sonuna do ru tamamına yakınında renklerinde koyula ma gibi de i imler gözlemlenmi tir.

#### 4.2. Tartı ma

Su kirlili ine neden olan kimyasal maddelerin bir kısmının kanserojen özellikte olması, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olması, kirlili in imdeki ve daha sonraki bireyler üzerinde yarataca ı olumsuz etkilerin dü ünülmesi açısından, kirlili e sebep olan kimyasallar üzerine yapılan sitogenetik ve sitotoksisite çalı malarının önemini her geçen gün arttırmaktadır [71].

Çinko, sucul ortamlarda çok az miktarlarda bulunur. Fakat do al ya da endüstriyel, madencilik ve tarımsal aktiviteler gibi temelde antropojenik kaynaklı faktörlerin etkisi

ile giderek artan deri imlerde bulunmaktadır. Sonuç olarak balıkların da içinde bulundu u suçul organizmalar metallerin artan miktarlarının etkisinde kalmaktadırlar [72].

Çetinkaya (1998),  $Zn^{+2}$  zehirlilik oranının organizmanın türüne ve ya ına, özellikle suyun fizikokimyasal özelliklerine, yo unlu una ba lı oldu unu, ayrıca su sertli indeki artı ın  $Zn^{+2}$  zehirlili inde azaltmalara neden oldu u ve çinkonun subletal yo unlu unda organizmada üreme, geli me ve immunitiyi azalttı ı ve davranı larını de i tirdi ini ortaya koymu lardır. Suda tolere edilebilir maksimum  $Zn^{+2}$  alabalıkgillerde (Salmonidae) 0,03-0,5 mg/L, sazangiller (Cyprinidae) için 0,3-2,0 mg/L oldu unu bildirmi tir. Sazanda  $Zn^{+2}$  için öldürücü dozun altındaki yo unluklarda 0,4 mg/L, zehir yo unlu unun 2 mg/L,  $LC_{50}$  ise 0,78 mg/L oldu unu bildirmi tir. Ayrıca  $LC_{50}$  de erinin su sertli inin artı ıyla yükseldi ini, sırasıyla 160, 385 ve 768 mg/L sertlikte  $LC_{50}$  de erinin 3,82, 9,40 ve 12,32 mg/L oldu unu bildirmi tir [73].

Sharma ve Sharma (1995), tatlı su balı ı olan *Cirrhinus mrigala*'nın geli me a amalarına çinkonun akut toksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalı mada *C. mrigala*'nın yumurtalarının ileri geli me safhalarına (larva, yavru, ergin) göre çinkoya dayanıklı oldu unu ileri sürmü lerdir. Deney süresince organizmanın solunum sayısında artı , kıvrılma hareketi ve denge kaybı gibi balık davranı larındaki de i ikleri gözlemlenmi lerdir. Yumurta için çinkonun 24 saat  $LC_{50}$  de erini 10 mg/L, yavru için 96 saat  $LC_{50}$  de erini 7 mg/L, fingerlingler için 96 saat  $LC_{50}$  de erini 0,35 mg/L olarak bildirmi lerdir [74].

Balıklarda a ır metallerin birikim göstermesi ve toksik etkileri di er bir taraftan suyun fizikokimyasal özelliklerine göre de de i im göstermektedir [75]. *Cyprinus carpio*'da dokulardaki kadmiyum birikiminin su sertli i ve alkanitesine ba lı olarak de i im gösterdi i [76] *T. zilli* ve *C. lazera*'da ise çinko birikiminin sıcaklı a ba lı olarak de i im gösterdi i belirlenmi tir [77]. *n vitro* ko ullarında *O. niloticus* ile yürütülen bu ara tırmada deney suyunun fizikokimyasal özellikleri Tablo 3.1' de verilmi tir.

*Oreochromis niloticus* ile yapılan bu çalı mada kontrol gruplarında izlenen balıklarda herhangi bir de i im olmazken,  $ZnPT$ 'nin doz artı ına ve zamana ba lı olarak balıkların davranı ve yüzey ekilerinde farklılıklar gözlenmi tir. Ayrıca yapılan mikronükleus

testleri sonucunda mikronükleus sayılarında artı ve morfolojik nükleus düzensizlikleri gözlemlenmiştir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

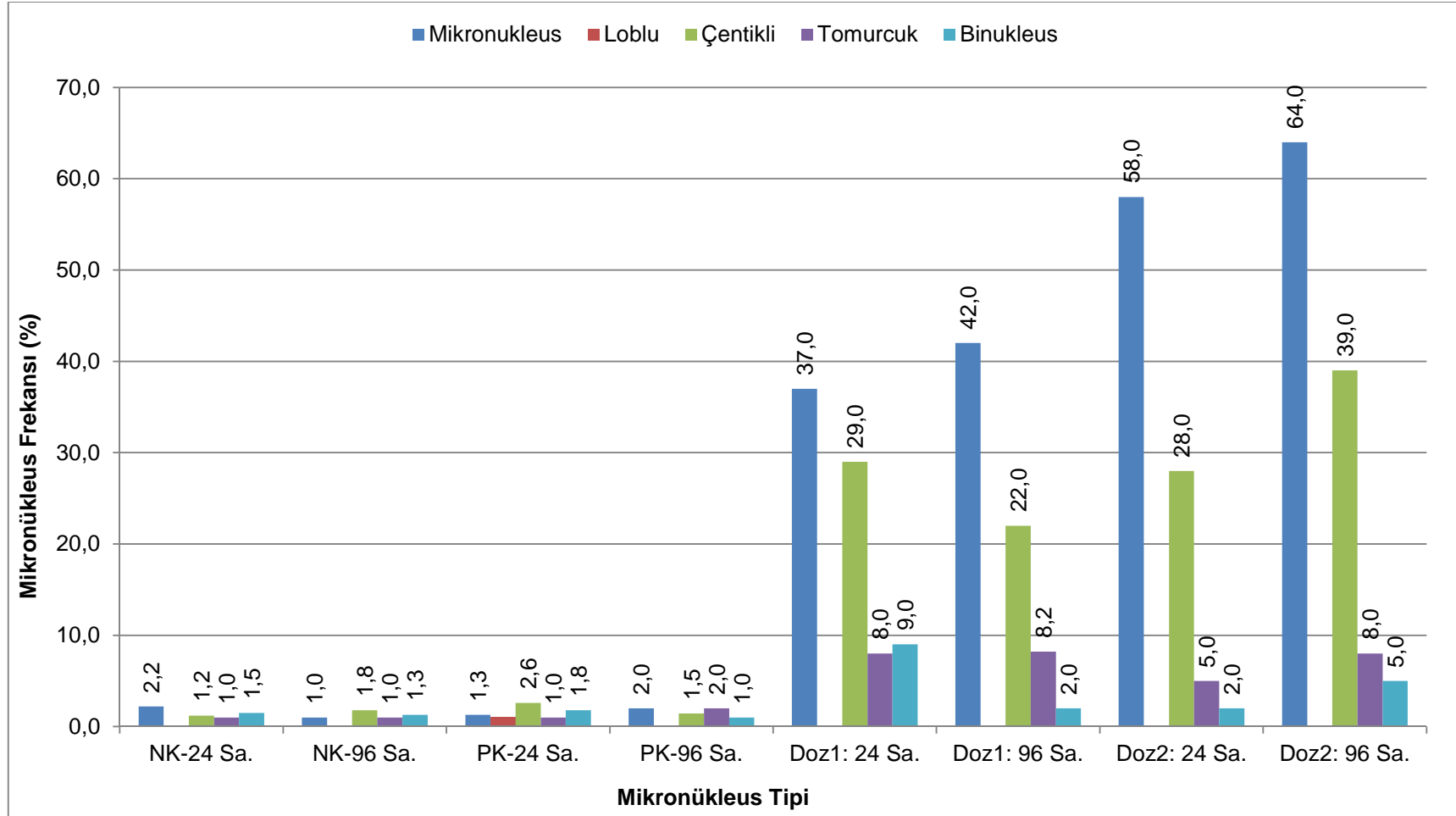
#### 5.1. Genel Değerlendirme

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dr. Nazmi Tekelioğlu Tatlı Su Balık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden getirilen *O. niloticus* bireyleri üzerine ZnPT'nin genotoksik hasarları mikronükleus testi ile incelenmiştir. Deney süresince hiçbir balık ölümü kaydedilmemi olup, ZnPT uygulanan gruplarda ise; balık davranışlarında ve yüzme eylemlerinde de değişiklikler gözlenmiştir. Balıklar morfolojik olarak incelendiğinde ise ciltte ve yüzgeçlerdeki kılcallarda kanamalar tespit edilmiştir.

Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır ve mikronükleus sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. mikronükleus testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir.

Bu çalışmada ile ZnPT'nin *in vitro* koşullarda *O. niloticus* türleri üzerine olan toksik etkileri mikronükleus testi ile belirlenmiştir.

Farklı dozlarda (Doz1: 2,5 µl/L ve Doz2: 5 µl/L) balıklara uygulanan ZnPT'nin bireyler üzerinde olumsuz etkileri gözlenmiştir. Dozların oranı ve süreleri arttıkça eritrositlerde görülen mikronükleus sayılarında ve çeşitlerinde artış görülmüştür.



ekil 5.1. ZnPT 'ye 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan balıkların normal ve pozitif ko ullara göre ortalama mikronükleus frekanslarının de erlendirilmesi



Sonuç olarak; yaptığımız bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular ZnPT'nin LC<sub>50</sub> dozunun 1/24 ve 1/12'si şeklinde uygulanan dozlarda mikronükleus sayılarında artış olduğunu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada bulgularına göre ZnPT diğer ağır metal bileşikleri gibi sucul ekosistemin kirlenmesinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sucul ortamda toksik madde kirliliğini engellenebilmesi için, ZnPT'nin mümkün olduğunca ampun, merhem ve pudraların içinde, antifouling boyalarda, balık aletlerinde, plastik ve kauçuk malzemelerin yapımında kullanılmaması, ZnPT yerine çevreye zarar vermeyen veya daha az zararlı kimyasalların tercih edilmesi sağlanmalıdır.

Yapılan araştırmalar, çevremizde her geçen gün sayıları artan birçok kimyasal maddelerin eser miktarlarının bile genotoksik ve mutajenik olabileceğini ortaya koymaktadır. Bunun için, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan fiziksel ve kimyasal ajanların başlıca insan genomu için mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Çünkü genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin aynı zamanda karsinojenik de olduğunu göstermektedir.

Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilen ve kolay uygulanabilen *in vivo* ve *in vitro* mikronükleus testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için güvenle kullanılacak bir genotoksisite testidir.

## KAYNAKLAR

1. Kaya, S., Pirinççi, ., Bilgili, A., “Çevre Bilimi ve Çevre Teknolojisi”, Medisan Yayın Serisi, Yayın No, 36, Ankara, 1998.
2. Köse, E., Uysal, K., “Cinsi olgunlu a eri memi Pullu Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758)’ların kas, deri ve solungaçlarındaki a ır metal akümüasyon oranlarının kar ıla tırılması”, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17, 19-26, 2008.
3. Köse, E., “Enne Barajı’nda ya ayan balıklarda a ır metal birikiminin ara tırılması” *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Kütahya, 2007.
4. Özdemir, H. ., “Genel Anorganik ve Teknik Kimya”. *Matbaa Teknisyenleri Basımevi*, stanbul, s. 1046, 1981.
5. Nussey, G., “Metal ecotoxicology of the Upper Olifants River at selected localities and the effect of copper and zinc on fish blood physiology.” *Ph. D-thesis*, Rand Afrikaans University, South Africa, s. 158, 1998.
6. Haktanır, K., “Çevre Kirlili i Ders Notu.” Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Teksir no. 107, s. 82-99, Ankara, 1983.
7. Tok, H.H., “Çevre Kirlili i.” Anadolu Matbaa Ambalaj San. Tic. Ltd. ti., stanbul, s. 266-283, 1997.
8. Uzuno lu, O., “Gediz Nehrinden alınan su ve sediment örneklerinde bazı a ır metal konsantrasyonlarının belirlenmesi”, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, s. 2-12, 26-73, Manisa, 1999.
9. Bryan, G., “Heavy metal contamination in the sea in: R. Johnston” *Marine Pollution Academic Press*, London, s. 185-302, 1976.
10. Bilgili, A., Sa manlıgil, H., Çetinkaya, N., Yersan, E., Türel, ., “Van Gölü suyunun do al kalitesi ve buradan avlanan inci kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas 1811) örneklerinde bazı a ır metal düzeyleri”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (42), 445-450, 1995.
11. Hellawell, J.M., “Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management”, *Elsevier Applied Science Publishers Ltd.*, London and New York. s. 546, 1986.
12. Shuster, S., “The etiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents”, *British Journal of Dermatology*, 111, 235-342, 1984.

13. Thomas, K.V., "Determination of the antifouling agent zinc pyrrhione in water samples by copper chelate formation and highperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry" *Journal of Chromatography*, s. 833, 105-109, 1999.
14. Bray, T.M., Bettger, W.J., "The physiological role of zinc as antioxidant", *Free Radical Biology and Medicine*, s. 8, 281-291, 1990.
15. Cousins, R.J., "Absorbtion, transport and hepatic metabolism of copper and zinc special reference to metallothionein and ceruloplasmin", *Physiological Reviews*, s. 65, 238-308, 1985.
16. Coudray, C., Rachidi, S., Favier, A., "Effect of zinc on superoxide dependent hydroxyl radical production in vitro", *Biological Trace Element Research*, 38, 273-287, 1993.
17. Cuvin-Aralar, M.L.A., "Survival and heavy metal accumulation of two *Oreochromis niloticus* (L.) strains exposed to mixtures of zinc, cadmium and mercury", *The Science of the Total Environment*, s. 148, 31-38, 1994.
18. Kargin, F., Erdem, C., "Bakır-Çinko etkile iminde *Tilapia nilotica* (L.)'nin karaci er, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi", *Turkish Journal of Zoology*, s. 16, 343-348, 1992.
19. Spear, P.A., "Zinc in the aquatic environment, chemistry, distribution and toxicology", *National Research Council of Canada, Publication NRCC* s. 17589, 145, 1981.
20. Hughes, G.M., Tort, L., "Cardio-Respiratory responses of rainbow trout during recovery from zinc treatment", *Environmental Pollution Series A*, 37 (3), s. 225-66, 1985.
21. Gabryelak, T., Akahori A., Przybylska, M., Jó wiak, Z., Brichon, G., "Carp erythrocyte lipids as a potential target for the toxic action of zinc ions", *Toxicology Letters*, s. 132, 57-64, 2002.
22. Watson, T.A., Beamish, F.W.H., "The effects of zinc on branchial adenosine triphosphatase enzymes in vitro from rainbow trout, *Salmo gairdneri*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 167-173, 1981.
23. Landolph Jr.J.R., "Genetic toxicology", *Encyclopedia of Toxicology* 3rd ed., *Academic Press, Oxford*. s. 715-725, 2014.

24. Choy, W.N., "Genetic toxicology and cancer risk assessment", *Marcel Dekker Inc.*, 390 p., New York, USA. 2001.
25. Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.G., Alvur, M., "DNA hasarı analizinde  $\mu$ -Fadu ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103, 2004.
26. Zeiger, E., "History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, s. 44, 363-371, 2004.
27. Üstün, F., 'Albendazol'un olası genotoksitesisi üzerine askorbik asitin etkisi.' *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, s. 100, İstanbul, 2007.
28. Atlı Gekero lu, Z., Gekero lu, V., "Genetik toksisite testleri", *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4 (3), 221-229, 2011.
29. Doherty, A.T., "The In Vitro Micronucleus Assay, Genetic Toxicology, Principles and Methods", *Springer*, New York, s. 121-141, 2012.
30. Gekero lu, V., Atlı Gekero lu, Z., "Genetoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4), 241-252, 2011.
31. Environmental fate of 129 priority pollutants, *U.S. Environmental Protection Agency.*, EPA-440/4-79-029, 1979.
32. Udriou, I., "The Micronucleus Test for Aquatic Toxicology", *Aquatic Toxicology Research Focus*, Svensson, E.P., *Nova Publishers*, s. 145-160, 2008.
33. Tucker, J.D., Preston, R.J., "Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment", *Mutation Research*, 365, 147-159, 1996.
34. Stalh, R.G., "The genotoxicity of organic compounds in natural waters and waste waters", *Ecotoxicology Environmental Safety*, 22, 94-125, 1991.
35. Hayashi, M., "The micronükleus test-most widely used in vivo genotoxicity test", *Genes and Environment*, 38 (1), 2016.
36. Coutryman, P.I., Heddle, J.A., "The Production of micronuclei from Chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes", *Mutation Research*, 41 (321), 1976.

37. Fenech, M., Morley, A.A. "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutation Research*, 147 (1-2), 29-36, 1985.
38. Lahdetie, J., Parvinen, M., "Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat", *Mutation Research*, 81, 103-115, 1981.
39. Tate, A.D., Dietrich, A.J.J., de Vogel, N., Newteboom, I., Bos, A., "A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals," *Mutation Research*, s. 121, 131-8, 1983.
40. Thomson, E.J., Perry, P.E., "The identification of micronucleated chromosomes, a possible assay for aneuploidy", *Mutagenesis*, 3, 415-418, 1988.
41. Degrossi, F., Tanzarella, C., "Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei, a new assay for the detection of aneuploidy", *Mutation Research*, 203, 339-45, 1988.
42. Hayashi, M., Maki-Paakkanen, J., Tanabe, H., Honma, M., Suzuki, T., Matsuoka, A., Mizusawa, H., Sotuni, T., "Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence in situ hybridization with a mouse centromeric DNA probe", *Mutation Research*, 307, 245-51, 1994.
43. Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., "Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish", *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology*, 132 (3), 269-313, 2002.
44. Borovansky, J., Blasko, M., Siracky, J., Schothorst, A.A., Smit, N. P.M., Pavel, S., "Cytotoxic interactions of Zn in vitro, melanoma cells are more susceptible than melanocytes", *Melanoma research*, 7, 449-453, 1997.
45. Chukhlovin, A.B., Tokalov, S.V., Yagunov, A.S., Westendorf, J., Reincke, H., Karbe, L. "In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal rich complex environmental mixtures, potential role of zinc and cadmium excess", *Science of the Total Environment*, 281, 153-163, 2001.
46. Wood, C.M. "Toxic responses of the gill", In, Schlenk, D., Benson, W.H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Taylor&Francis, London, s. 1-87, 2001.
47. Thorp, V., Lake, P., "Toxicity bioassays of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp, *Paratya tasmaniensis*", *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 25, 97-104, 1974.

48. Burton, D.J., Fisher, D.J., “Acute toxicity of cadmium, copper, zinc, ammonia, 3,3 - dichlorobenzidine, 2,6-dichloro-4-nitroaniline, methylene chloride, and 2,4,6-trichlorophenol to juvenile grass shrimp and killifish”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 776-783, 1990.
49. Matthiesen, P., “The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gastrosteus aculeatus*”, *Journal of Fish Biology*, 5 (5), 607-613, 1973.
50. Bengtsson, B.E., “Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*”, *Oikos*, 25, 370-373, 1974.
51. Brungs, W.A. “Chronic toxicity of zinc to the fathead minnow, *Pimaphales promelas*”, *Transactions of the American Fisheries Society*, 98, 272-279, 1969.
52. Crandall, C.A., Goodnight, C.J., “Effects of sub-lethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy *Lebistes reticulatus*”, *Limnology and Oceanography*, 7, 233-239, 1962.
53. Hiltibran, R.C., “Effects of cadmium, zinc, manganese and calcium on oxygen and phosphate metabolism of bluegill liver mitochondria”, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 43, 818-823, 1971.
54. Watson, T.A., McKeown, B.A. “The effect of sublethal concentrations of zinc on growth and plasma glucose levels in rainbow trout”, *Journal of Wildlife Diseases*, 12, 263-270, 1976.
55. Mishra, S., Srivastava, A.K., “Hematology as index of sub-lethal toxicity of zinc in a freshwater teleost”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22, 695-698, 1979.
56. Grobler, E., Preez, H.H., Van Vuren, J.H.J., “Toxic effects of zinc and iron on the routine oxygen consumption of the *Tilapia sparrmanii*”, *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology*, 94(1), 207-214, 1989.
57. Grobler, E., “The effect of atrazine, zinc and iron on the hematology and oxygen consumption of *Tilapia sparrmanii*”, *M.Sc. Thesis. Rand Afrikaans University, South Africa*, 118pp, 1988.
58. Öner, M., Atlı, G., Canlı, M., “Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (2), 360-366, 2008.

59. Firat, O., Kargin, F., “Effects of zinc and cadmium on erythrocyte antioxidant systems of a freshwater fish *Oreochromis niloticus*”, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24 (4), 223-229, 2010.
60. Kurihara, Y., Rienkarn, M., Etoh, H., “Cytogenetic adaptive response of cultured fish cells to low doses of X-rays”, *Journal of Radiation Research*, 33, 267-274, 1992.
61. Ueda, T., Hayashi, M., Ohtsuka, Y., Nakamura, T., Kobayashi, J., Sofuni, T., “A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells”, *Water Science and Technology*, 25, 235-240, 1992.
62. Al-Sabti, K., “Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells”, *Mutation Research*, 320, 157-163, 1994.
63. Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., “Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 42-55, 2005.
64. Çava, T., Konen, S., “Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay”, *Mutagenesis*, 2007.
65. Gül, S., Nur, G., Kaya, T.Ö., Kamber, U., Gürdegin, B., “Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Orthrias angorae* (Steindachner, 1987) exposed to malathion”, *Fresenius Environ Bulletin*, 16, 472-476, 2007.
66. Winter, M.J., Ellis, L.C., Hutchinson, T.H., “Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide”, *Mutation Research*, 629, 89-99, 2007.
67. Tekelio lu, N., “Ç Su Balıkları Yeti tiricili i”, *Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*. Yayın No, 2, Adana, 2000.
68. Anonymous, “Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater”, *APHA, AWWA, WPCF*, Washington, D.C., 1971.
69. Arslan, P., Ali Dalgıç, M., Sarıçakmak, S., Sarıgil, N., Ülker, ., Koçak Memmi, B., “Çama ır suyu ve bula ık deterjanının Lepistes (*Poecillia reticulata* Peters, 1859) balıkları üzerindeki genotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak ara tırılması”, *Mehmet Akif Ersoy Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, s. 34, 2011.

70. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., “An assessment of the piscine micronucleus test as an in-situ biological indicator of chemicals contaminant effects”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2723-2136, 1990.
71. Toguyeni, A., Fauconneau, B., Boujard, T., Fositer, A., Kuhun, E.R., Mol, K.A. and Baroiller, J.F., “Feeding behaviour and food utilization in Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effect of sex ratio and relationship with the endocrine status”, *Physiology Behavior*, 62, 273-279, 1997.
72. Gül, S. “Kura-Aras havzasında yaygın olarak bulunan *Orthrias angorae* (Steindachner, 1897), *Orthrias panthera* (Heckel, 1843) ve *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)’de kromozomal çalı malar” <http://uvt.ulakbim.gov.tr>, 2008.
73. Cicik, B., “Bakır-çinko etkile iminin sazan (*Cyprinus carpio*)’nın karaci er, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri”, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12 (48), 32-36, 2003.
74. Çetinkaya, O., “Balıklarda Çinko (Zn) htıyac ve Toksisitesi”, *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9 (1-2), 83-88, 1998.
75. Sharma, A., Sharma, MmS., “Acute toxicity of zinc certain developmantal stages of *Cirrhinus mriagala* (Hamilton)”, *Journal of Environmental Biology*, 16 (2), 157-162, 1995.
76. Witeska, M., Jezierska, B., “The effects of environmental factors on metal toxicity to fish”, *Fresenius Environmental Bulletin*, 12 (8), 824-829, 2003.
77. Hollis, L., Mcgeer, J.C., Mcdonald, D.G., Wood, C.M., “Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout”, *Aquatic Toxicology*, 46, 101-119, 1999.



## ÖZGEÇM

Nejla ÖZCAN 1991 yılında Bartın'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Karabük'te tamamladı. Karabük Fevzi Çakmak Lisesi mezunu olup, 2009 yılında kazandı ı Nevşehir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2015-2017 yılları arasında İstanbul Özel Bahçelievler Tekden Hastanesinde çalıştı.

Adres: Yıldırım Beyazıt Cad. Zafer Mah. Mühürdar sok. No:10 Bahçelievler / STANBUL

E-posta: nezo.unal@hotmail.com