ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine BAYSOY

TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un ATPaz AKTİVİTELERİNE METAL (Cr, Pb) ve TUZLULUĞUN ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un ATPaz AKTİVİTELERİNE METAL (Cr, Pb) ve TUZLULUĞUN ETKİLERİ

Emine BAYSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 10/02/2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

…….....	…….....	…….....
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI	Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN	İKİNCİ DANIŞMAN	ÜYE

……..……	……
Doç. Dr. Ramazan BİLGİN	Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF.2010.YL.23

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un ATPaz AKTİVİTELERİNE METAL (Cr, Pb) ve TUZLULUĞUN ETKİLERİ

Emine BAYSOY

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl : 2012, Sayfa: 55
Jüri :Prof. Dr. Mustafa CANLI
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
:Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
:Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
:Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI

Bu çalışmada, tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* sadece tuzluluk (0, 2 ve 8 ppt) ve tuz+metal (1µg/mL Cr ve Pb) etkilerine farklı süreler için (1, 7 ve 14 gün) bırakılmıştır. Etki süreleri sonunda balıkların solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+- ATPaz aktivitesi ölçülerek, sucul ortamlarda metal toksisitesine tuzluluğun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre enzim aktivitesinin farklı tuzluluk, metal, etki süresi ve doku tipine göre değiştiği gözlenmiştir. Metal ve tuzluluk etkisinde kalan balıklarda ortam koşulları ve etki süresine bağlı olarak solungaç ve bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde değişimler gözlenmiştir. Sadece tuzluluk etkisinde kalan balıklarda aktivitedeki eğilim artış yönünde olurken, tuzluluk+metal etkisinde azalma yönünde olmuştur. Metal birikimi sadece tuzluluk grubunda değişmezken, metal+tuz grubunun etkisinde genellikle artış göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Na^+/K^+-ATPaz, *Oreochromis niloticus*, Balık, Tuzluluk, Metal

ABSTRACT

MSc THESIS

THE EFFECTS OF METAL (Cr, Pb) AND SALINITY ON ATPase ACTIVITIES OF FRESHWATER FISH *Oreochromis niloticus*

Emine BAYSOY

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year : 2012, Page: 55
Jury :Prof. Dr. Mustafa CANLI
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
:Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
:Asist. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ
:Asist. Prof. Dr. Gülüzar ATLI

In this study, freshwater fish *Oreochromis niloticus* were exposed individually to salinity concentrations (0, 2 and 8 ppt) alone and salinity+metal (1 µg/mL Cr and Pb) exposures for different periods (1, 7 and 14 days). The aim of this study was to investigate the effects of salinity on metal toxicity by measuring the activity of Na^+/K^+-ATPase in the gill and intestine of *O. niloticus* after the exposure duration.

Results showed that enzyme activity varied depending upon salinity, tissue, metal and exposure duration. Na^+/K^+-ATPase activity changed in fish exposed to both metal and salinity in relation to exposure conditions and duration. In salinity alone group, the increasing trend in enzyme activity was observed, whereas there was declining trend in the metal+salt mixture group. There was no significant metal accumulation in salinity alone group, though there were increases in the metal+salt mixture group.

Key Words: Na^+/K^+-ATPase, *Oreochromis niloticus*, Fish, Salinity, Metal

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyip bana yüksek lisans yapma fırsatı veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya ve bu süreçte çalışmalarımda bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülizar ATLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Ceren Gürler, Zehra Doğan, Ali Eroğlu ve Dilek Arslan'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Sevgi BAYSOY, babam Hatem BAYSOY'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……..... I
ABSTRACT…….... II
TEŞEKKÜR……... III
İÇİNDEKİLER……....IV
ÇİZELGELER DİZİNİ…...……... VI
ŞEKİLLER DİZİNİ…….....VIII
1. GİRİŞ…….. 1
1.1. Kurşun…….……... 3
1.2. Krom…….. 4
1.3. Aktif Transport…….…… 5
1.4. ATPaz Enzimleri……... 6
1.5. Tuzluluk……..9
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……. 11
3. MATERYAL VE YÖNTEM..……... 15
3.1. Materyal……..15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler……15
3.1.1.1. Metaller ve Asitler……... 15
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar……. 15
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar…… 16
3.1.2. Kullanılan Aletler……16
3.2. Yöntem…… 16
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı……17
3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü……18
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini……19
3.2.4. Total Protein Analizi……...….20
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması……..23
3.2.6. Metal Analizi……..……23
3.2.7. Metal Derişiminin hesaplanması…….……24
3.2.8. İstatistik…… 25

4. BULGULAR ve TARTIŞMA…..……..27
4.1. Bulgular……... 27
4.1.1. Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesi……..….. 27
4.1.1.1. Kontrol Grubu Balıklar……..……... 27
4.1.1.1.(1). Kontrol Grubu……. 27
4.1.1.1.(2). 2 ppt Tuzluluk Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi...27
4.1.1.1.(3). 8 ppt Tuzluluk Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi...28
4.1.1.2. Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi……28
4.1.1.2.(1). 2 ppt Tuzluluk Ortamında Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi …… 28
4.1.1.1.(2). 8 ppt Tuzluluk Ortamında Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi…….…… 28
4.1.1.3. Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi……..... 29
4.1.1.3.(1). 2 ppt Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi… 29
4.1.1.3.(2) .8 ppt Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi….. 29
4.1.2. Toplam Metal Düzeyi……..…… 32
4.1.2.1. Krom Düzeyleri……..…….…….. 32
4.1.2.1.(1). Kontrol Gruplarında Krom Düzeyleri…….. 32
4.1.2.1.(2). Krom ve Tuz Etkisinde Bulunan Gruplarda Krom Düzeyleri……. 32
4.1.2.2. Kurşun Düzeyleri…….…… 33
4.1.2.2.(1). Kontrol Gruplarında Kurşun Düzeyleri…… 33
4.1.2.2.(2). Kurşun ve Tuz Etkisinde Bulunan Gruplarda Kurşun Düzeyleri……..33
4.2. Tartışma……... 36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER……... 43
5.1. Sonuçlar……..... 43
5.2. Öneriler……... 43
KAYNAKLAR……...45
ÖZGEÇMİŞ……..... 55

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art. Ort. ± S.D. N=44)……...17

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri……..……....18

Çizelge 3.3. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi analiz şeması……. 19

Çizelge 4.1. Tuzluluk (2 ppt) ve tuzluluk+metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri (µg/g k.a.)…….. 34

Çizelge 4.2. Tuzluluk (8 ppt) ve tuzluluk+metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri (µg/g k.a.)…… 35

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

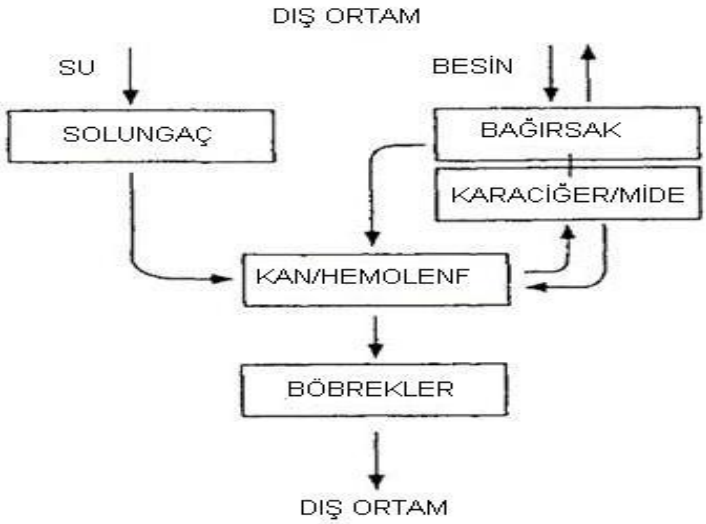
Şekil 1.1. Sucul canlılarda metal alımı, taşınması, depolanması ve atılmasını gösteren genel şema……... 2
Şekil 1.2. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri……..... 6
Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……..20
Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……..…...22
Şekil 3.3. Pb^{+2} derişimi ve absorbansı arasındaki doğrusal ilişki……..…….. 24
Şekil 3.4. Cr^{+2} derişimi ve absorbansı arasındaki doğrusal ilişki……..….24
Şekil 4.1. Normal kontrol ve farklı tuzluluk kontrollerinin etkisinde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi…… 29
Şekil 4.2. Normal kontrol ve farklı tuzluluk kontrollerinin etkisinde *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi …… 30
Şekil 4.3. 1,0 μg/mL metal + 2 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ……30
Şekil 4.4. 1,0 μg/mL metal + 2 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi……..31
Şekil 4.5. 1,0 μg/mL metal + 8 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ……31
Şekil 4.6. 1,0 μg/mL metal + 8 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi……..32

1. GİRİŞ

Sucul ortamlar, insanoğlunun yol açtığı çeşitli aktiviteler sonucu ksenobiyotik kirliliğinden etkilenmektedir. Bunlardan ağır metaller ve pestisitler oldukça zararlı etkiler göstermekte olup bu etkileri biyolojik birikimleri ile artış gösterebilmektedir (De la Torre, 2000). Endüstri, ziraat ve madencilikte yaygın olarak kullanılan ve ekolojik tehlike oluşturan bakır, civa, kurşun, kadmiyum vb. ağır metalleri içeren çeşitli kimyasalların kullanımlarındaki artışın çevreyi kirlettiği bilinmektedir. Atmosferik depozisyon, atıklar, aerosol presipitasyonu ve yağmurların yıkayıcı etkisi ve diğer kaynaklar aracılığı ile çevreye yayılan ağır metallerin çoğu için son durak olması nedeniyle sucul ortamlar hassas olarak kontrol edilmesi gereken biyotoplardır. Metallerin toksik etkileri iki genel kategoriye ayrılabilir. Akut toksisite (kısa sürede yüksek doz) genellikle letal etki gözlenmektedir (Canlı, 1995). Kronik toksisite (uzun sürede düşük doz) letal ya da subletal olabilmektedir.

Kurşun, nikel, kadmiyum, çinko, bakır, civa, organoklorin pestisitler, herbisitler, çözücüler, petrol hidrokarbonları, formaldehitler, klor, amonyak, methan, asitler ve alkaliler toksik kirleticilerdir. Metaller gibi bazı potansiyel toksik bileşikler kötü hava koşullarında kayalardan aşınma ve volkanik aktivite gibi doğal işlemlerden kaynaklı su ortamına karışmaktadır.

Balıklarda sudan veya besin yoluyla alınan metallerin düşük trofik düzeylerde birikiminin, su ortamında besin zincirinin yüksek seviyelere ulaşmasında önemli bir basamak olduğu belirtilmiştir (Heath, 1987; Liang ve ark., 1999; Webb ve Wood, 2000). Aktif ya da pasif yolla alınan metallerin balık dokularındaki birikiminin vücuda alınma, depolanma ve vücuttan atılma oranına bağlı olduğu bilinmektedir. Vücuda alınan metallerin toksik etkileri, metabolik, depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının alınım oranına yetemedikleri durumda ortaya çıkmaktadır (Heath, 1987; Ay ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Sucul canlılarda metal alımı, taşınması, depolanması ve atılmasını gösteren genel şema.

Balığın biyolojik sistemlerinde civa, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metallerin herhangi bir rolü olmamasına karşın, bakır, çinko ve demir gibi ağır metallerin balık metabolizması için gerekli olduğu bilinmektedir. Laboratuar çalışmaları ve doğal çalışmalar ile dokulardaki ağır metal birikiminde, metallerin sudaki derişimleri, etkide kalma süresi, tuzluluk, pH, sertlik ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Heath, 1987; Canli ve Atli, 2003). Tuzluluğun etkisi büyüme için farklı ve özgün optimal tuzluluk değerlerine sahip çeşitli türler arasında değişiklik göstermektedir. Balığın çevresel tuzluluk değişimleri sırasında osmotik ve iyonik homeostazisi düzenleme yeteneği dokuların göstereceği tepkiye bağlı olarak gelişmektedir. Tuzluluk genel olarak osmotik ve iyonik düzenlemeler için gerekli enerji ihtiyacını, besin alımını, metabolik düzenleme ve büyümeyle ilişkili osmoregülatör hormonların uyarılmasını etkilemektedir (Laiz-Carrion ve ark., 2005). Balıklar ortamdaki metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Viarengo, 1989). Solungaçlar gaz alış verişi, asit baz dengesi, iyon (Na^+, Cl^- ve Ca^{+2}) taşınması ve nitrojenli atıkların atımında görev alan çok fonksiyonlu bir organdır.

Metal toksisitesinin sudaki etilen daimin tetra asetik asit (EDTA), hidroksit, karbonat ve humik asit gibi şelat

oluşturucu ajanların varlığında azaldığı ve aynı zamanda sert sulara göre yumuşak sularda da artış gösterdiği bilinmektedir (Meinelt ve ark., 2001).

Ağır metaller, metal tipi ve derişimine, balığın biyolojisine, suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak enzim aktivitelerinde artışa veya azalışa neden olabilmektedir (Heath, 1987). Tuzluluk, balığın osmoregülatör ve iyonoregülatör fizyolojisi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Teleostların iyon ve osmolarite dengesinin sağlanması için tuzların solungaçlardan böbreklere geçip burada tekrar emilmeleri gerekir. Tuzlu su teleostlarında ise böbreğin suyu absorblaması ve solungaçlardan tuzların atıldığı dikkate alındığında, teleostlarda tatlı suya adaptasyonun tuzlu suya adaptasyona benzemediği bilinmektedir. Örihalin balıkların tatlı veya tuzlu suya adaptasyon sistemleri iyi bilinmektedir (Kato ve ark., 2005). Bu bilgiler ışığında ATPazlar gibi osmoregülatör enzimler üzerinde ağır metallerin inhibitör etkileri sucul organizmalarda yararlı belirteçler olarak kullanılabilmektedir (Blanchard ve Grosell, 2006).

Sucul organizmalarda metal birikiminin incelenmesi, metallere karşı duyarlılığı yüksek türlerin belirlenmesinin yanı sıra organizmada meydana gelen yapısal ve işlevsel bozuklukların belirlenmesi bakımından da önem taşımaktadır (Canlı ve Atlı, 2003; Kayhan, 2006).

1.1. Kurşun

Kurşun periyodik tabloda IV A gurubunda yer alan bir metaldir. Organizmalarda herhangi bir biyolojik işlevi bulunmayan kurşun yer kabuğunda, kayalarda, toprakta ve suda doğal olarak bulunmaktadır. Doğal sularda normal kurşun düzeyleri 0.0006-0.12 mg/L arasındadır. Kurşun su ortamına, madencilik, kömür ve petrol yakıtlarından, çeşitli yapıştırıcı maddelerin üretiminden, kauçuk sanayinden, benzin katkı maddesi olarak, akü, boya ve pil yapımı gibi insan aktiviteleri sonucu girmektedir (Rogers ve ark., 2003).

Organizmalarda biyolojik rolü olmadığı bilinen kurşunun düşük düzeyleri üreme, büyüme ve davranış değişikliklerine neden olmaktadır (Burden ve ark., 1998). Kurşunun balıklarda büyüme ve eritrositlerde “hem” grubu sentezinde görev

alan delta aminolevulinik asit dehidrataz, lipid peroksidasyon enziminin inhibisyonuna ve ayrıca anemiye neden olduğu belirtilmiştir. Kurşun solungaçlarda oksijen alımını azalttığı gibi, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde de artışa neden olabilmektedir (Torreblanca ve ark., 1989). Yüksek miktarlarda lipit çözülmesi nedeni ile fazla miktardaki organik kurşun sinir hücrelerine geçebilmektedir. Kurşun organizmada genellikle organik bileşikler halinde bulunmakta, ayrıca karaciğer ve böbrek hücrelerinde protoplazmadaki protein moleküllerine bağlanabilmektedir. Kurşun karaciğer ve böbrek gibi organlarda en yüksek birikim düzeyine ulaşırken bir miktar da kemik içerisinde depolanmaktadır.

1.2. Krom

Endüstriyel yolla ortama salınan krom kirliliğinin en önemli kaynaklarından biri krom tabaklama endüstrisidir. Krom ayrıca balıkların bağışıklık sistemi üzerine toksik etki gösterebilmektedir. O'Neill (1981), Cr^{+6}'nın viral mücadelede balığın humoral bağışıklık cevabını baskıladığını göstermiştir. Metalle indüklenen bağışıklık sistemindeki değişiklikler, metallerin doğrudan biyolojik aktif moleküllerin tersiyer yapılarına bağlanmaları veya dolaylı olarak balıkta kortikosteroid düzeylerini değiştirmeleri sonucu gözlenmektedir.

Yer kabuğunda yaygın olarak bulunan bir element olan krom, +2'den +6'ya kadar çeşitli formlarda bulunmakla birlikte bu metalin biyolojik olarak önemli olan ve doğada en stabil formları Cr^{+3} ve Cr^{+6}'dır. Cr^{+3} gerekli bir eser elementken, Cr^{+6} esansiyel olmayan, toksik ve kanserojen özellikte olup, alerjik reaksiyonlara, dermatite, sindirim kanalı, karaciğer ve böbrek hasarına yol açmaktadır. Cr^{+6}'nın sulu çözeltilerdeki dominant formu olan iyon kromat $(CrO_4)^{-2}$, spesifik anyon kanalları aracılığıyla hücre zarlarından hızla girerek intraselüler olarak trivalent forma (Cr^{+3}) indirgenmektedir (Tagliari ve ark., 2004). Bununla birlikte Cr^{+6}, antikor üretiminden sorumlu lenfositlere yüksek düzeyde toksik etki göstermekte ve buna bağlı olarak antikor cevabın baskılanmasına yol açmaktadır. Cr^{+6}'nın, Cr^{+3} ile karşılaştırıldığında daha toksik olması biyolojik olarak aktif Cr^{+6}'nın daha hızlı alımından kaynaklanmaktadır. Cr^{+6} ayrıca DNA yapısında çeşitli lezyonlara neden

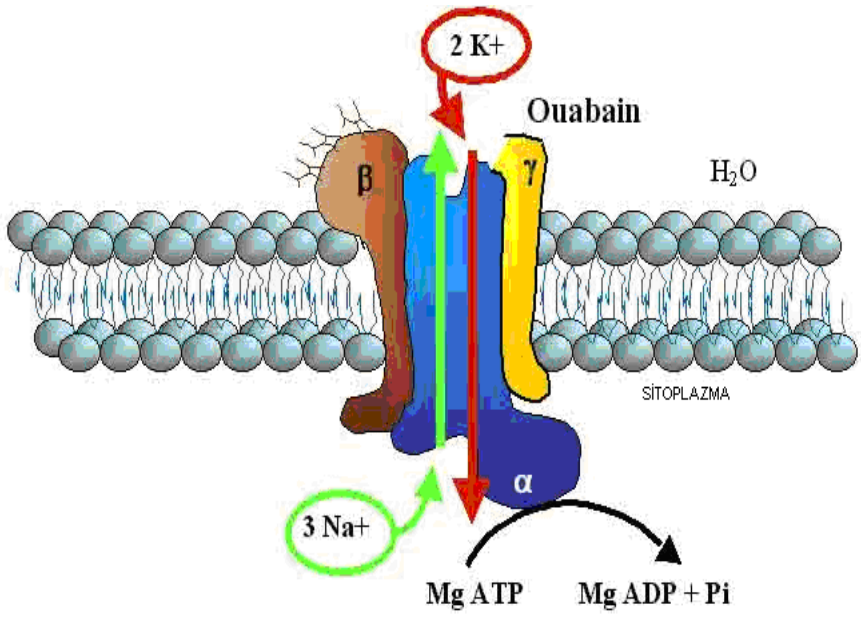
olabilmektedir (Arunkumar ve ark., 2000). Boge ve ark. (1989), alkalen fosfataz ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinin Cr^{+6} toksisitesinde gösterdikleri duyarlılıktan dolayı önemli belirteçler olarak kullanılabileceğini belirtmiştir. Cr^{+6}'nın glukoz toleransı, hiperglisemi, glikozuri ve hipoglisemiye neden olarak karbohidrat metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (Pan ve ark., 2003). Atlı ve ark. (2006) Cr^{+6}'nın farklı derişimlerinin *in vitro* etkisinde kalan *O. niloticus* dokularında katalaz aktivitesinin inhibe olduğunu, *in vivo* Cr^{+6} etkisinde ise karaciğer dokusundaki artışa karşın böbrek, solungaç ve bağırsak katalaz aktivitesinde ise azalış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte C*yprinus carpio*'da Cr^{+6}'nın hematokrit düzeyinde bir etkisinin olmadığı, serum glukoz ve kolesterol düzeylerini ise önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Canlı, 1995).

1.3. Aktif Transport

Aktif transport, moleküllerin termodinamik dengeden uzağa yani derişim veya elektrokimyasal gradientin zıt yönünde taşınmaları açısından difüzyondan farklıdır; bundan dolayı enerji gerektirir. Aktif transport için gereken enerji, ATP'nin hidrolizinden, elektron hareketinden veya ışıktan sağlanabilir. Aktif transport ile biyolojik sistemlerde elektrokimyasal gradientlerin devamlılığı sağlanır. Biyolojik sistemlerde elektrokimyasal gradientlerin devamlılığının sağlanması o derece önemlidir ki belki de bu olay bir hücreye ait toplam enerji tüketiminin %30-40'ını oluşturur. Genellikle hücreler, hücre içi ortamda net bir negatif elektriksel potansiyel ile bir arada düşük bir intrasellüler Na^+ derişimi ve yüksek bir hücre içi K^+ derişimi sağlarlar. Hücrenin içi ve dışı arasında iyon gradientlerini düzenleyen membrana bağımlı Na^+/K^+-ATPaz pompası, her ATP molekülünün ADP'ye hidrolizi sırasında 3 Na^+ iyonunun hücre içinden dışarıya ve 2 K^+ iyonunun dışarıdan hücre içine hareketini sağlar.

1.4. ATPaz Enzimleri

İyon dengesinin korunması için gerekli olan ve ATP tarafından sağlanan enerjiye gereksinim duyan Na^+/K^+-ATPaz, balıkların osmoregülatör dokuları olan solungaç, böbrek ve bağırsak epitelinde anahtar rolü üstlenen önemli bir enzimdir. Bu enzim, 3 Na^+ iyonunu hücre dışına, 2 K^+ iyonunu ise hücre içine transfer etmek için ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır. Bu sayede hücrede veya hücre ile hücre dışı ortam arasında iyon taşınımı ve elektrokimyasal gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir (Şekil 1.2.). Na^+/K^+-ATPaz'ın ağır metallerin hem *in vivo* hem de *in vitro* etkilerine çok duyarlı olduğu gösterilmiştir (Canli ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003; Atlı, 2009). Metaller, moleküler yapı ve enzimlerin fonksiyonel gruplarının etkinliğine bağlı olarak enzim sistemlerine bağlanabilmektedir. Enzim molekülü üzerindeki aktif bölgelere metallerin bağlanması, enzim aktivitelerinde inhibisyon veya uyarılma ile sonuçlanmaktadır (Watson ve Beamish, 1981).



Şekil 1.2. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri
(http://www.bioscience.org/2001/v6/d/watson/figures.htm'den)

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan ve toksisitede duyarlı belirteç olan bir grup enzimdir. Membrana bağlı enzimler olan ve dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, membran geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimlerinin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine hassas olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Bununla birlikte ATPaz'ların tuzluluk, sıcaklık gibi çeşitli faktörler tarafından da etkilendiği kanıtlanmıştır (Inman ve Lockwood, 1977; Diaz ve ark., 1998). İyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar, Na^+/K^+-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'dır. ATPaz'ların çevresel kirleticiler tarafından osmoregülatör hasardan önce gerçekleşen inhibisyonu, ATPaz'ların iyonik ve osmoregülatör sistemlerdeki bozuklukların erken uyarılmasındaki kullanımlarını işaret etmektedir (Stagg ve ark., 1992; Sancho ve ark., 2003). Na^+/K^+-ATPaz ile ilgili yapısal ve fonksiyonel ilişkilerin incelendiği çalışmalar, solungaç epitelyumunun taşıma sistemlerinde ve dolayısıyla hücresel homeostazisinin dengelenmesinde görevli Na^+/K^+-ATPaz enzimleri açısından zengin olduğunu göstermiştir. İmmunositokimyasal çalışmalar ise Na^+ iyonlarının atılması ve K^+ iyonlarının hücre içine alınmasında görevli Na^+/K^+-ATPaz enziminin kemikli balıkların solungaç epitellerinde çoğunlukla mitokondrice zengin hücrelerde yer aldığını göstermiştir.

İyon akışının düzenlenmesi, iyonik ve osmotik homeostazisin dengelenmesi ile ilişkilidir. Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+-ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. Na^+/K^+-ATPaz enzimlerinin büyük bir bölümünün kemikli balıkların solungaç epitelyumunda klorit hücrelerde yerleştiği ve metallerin solungaç ATPaz aktiviteleri üzerinde farklı tepkileri olduğu belirtilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007).

Osmoregülasyon, dış ortamın osmolaritesine (tuzluluk) rağmen hücre dışı sıvılardaki osmotik derişimlerin aktif olarak düzenlenmesidir ve su ortamındaki canlılar için gerekli bir fizyolojik adaptasyondur. Osmoregülasyonda önemli görevi olan enzimlerden biri olan Na^+/K^+-ATPaz, solungaç ve bağırsak gibi tuz

taşınmasının gerçekleştiği dokularda yüksek düzeylerde bulunmaktadır ve transepitelyal tuz hareketleri için gerekli iyonik ve elektriksel gradienti düzenlemektedir. McGeer ve Wood (1998), akut metal toksisitesinin kilit mekanizmasının solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkili osmoregülatör hasar olduğunu bildirmiştir. Cu^{+2}, Ag^+, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2} tatlı su ve deniz balıklarında Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonu ile bağlantlı osmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller arasındadır (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004, 2006).

Metal varlığında solungaç ATPaz aktiviteleri inhibe olabilmekte veya uyarılabilmektedir (Watson ve Beamish, 1980; Watson ve Benson, 1987; Alves ve Wood, 2006). Kuhnert ve ark. (1976), *in vivo* Cr^{+6} etkisindeki alabalık *Salmo gairdneri*'nin solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlerken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlememişlerdir. Bunun dışında Zn^{+2}'nin alabalığın solungaç dokusunda *in vitro* Mg^{+2}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Watson ve Beamish, 1980).

Ağır metallerin ATPaz enzimleri üzerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Atlı and Canlı, 2007, Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Özellikle bakır, gümüş, kadmiyum, çinko ve cıva gibi ağır metallerin teleost balıklarda ATPaz inhibisyonuna neden olarak osmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları görülmüştür (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2006). Na^+/K^+-ATPaz dışında diğer ATPaz'lardan Mg^{+2}-ATPaz, Na^+/NH_4-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz, farklı türlerdeki balıkların solungaçlarında çalışılmış ve iyon düzenleyici rolleri vurgulanmıştır (Watson ve Beamish, 1980). Bu enzim aktivitelerinin Cr^{+6}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller tarafından etkilendiği belirtilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978; Watson ve Beamish, 1980). 14 gün boyunca Cd^{+2} (1.6 mg Cd/L) etkisinde kalan *Cyprinus carpio*'nun solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin % 30 inhibe olduğu, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 70 oranında arttığı gösterilmiştir. Balıklar Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün bekletildiğinde sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol düzeyine yaklaştığı gözlenmiştir (De la Torre ve ark. 2000). Benzer şekilde, Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0.5-4.0 mg/L)

etkisinde 14 gün kalan *Tilapia zillii*'nin solungacında Na^+/K^+-ATPaz enzim aktivitesinin önemli oranda azaldığını göstermiştir. Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 μM derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkileri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğu, yalnızca solungaçta 20 μM Pb^{+2} etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2}-ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir.

1.5. Tuzluluk

Örihalinler de yapılan birçok çalışmalar göstermiştir ki düşük tuzluluğun bulunduğu ortamlardaki ağır metal birikimi artma eğilimindedir. Kirliliğin geldiği kaynağa bağlı olarak tuzlulukla ilişkili olan diğer faktörler birçok kimyasalın biyolojik kullanımını önemli derecede etkileyen organik karbondur. Birçok metalin toksisitesi düşük tuzlulukta artar. Balıklar tarafından metal birikiminde tuzluluğun etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, birikimde hem biyolojik hem kimyasal faktörlerin etkileri olduğunu göstermiştir (Health, 1987). Organın fizyolojisi metal alınımını ve birçok yoldan toksisiteyi etkileyebilir. Örihalin türler tuzluluğa geniş ölçüde toleranslı olmasına rağmen, en optimum tuzluluk türden türe değişir.

Teleostlar, osmolarite ve iyon dengesini korumak için tuzları tatlı sudan solungaçlar aracılığıyla ve böbrekten geri emilim ile alırlar. Buna karşı deniz teleostları tuzu solungaçlar aracılığıyla dışarı atarlar ve böbrekten suyu geri emerler. Teleostlar tatlı suya ya da tuzlu suya adaptasyonda farklı yöntemler kullanılır. Örihalin balıklar tatlı su ya da tuzlu suya osmoregülasyon sistemlerin değişimiyle adapte olurlar (Kato ve ark., 2005).

Oreochromis niloticus, Afrika kökenli bir balık türü olup, kültür koşullarında bakım ve üremesinin kolay olması, besin maddelerini iyi değerlendirmesi, kirlenmeye ve çeşitli hastalıklara dirençli olması bu türün kültür balıkçılığındaki önemini her geçen gün arttırmaktadır (Erdem, 1990; Canlı ve Erdem, 1994; Kalay,

1999). Tatlı su orjinli olan tilapialar değişik tuzluluklara gösterdikleri toleransla dikkat çekmektedirler (Genç, 1996).

Bu çalışmada, tatlısu balığı *O. niloticus*, 2 ve 8 ppt tuz derişimlerinin uygulandığı ortamlarda farklı sürelerde (1, 7 ve 14 gün) metal (Cr, Pb) etkisine bırakılarak, solungaç ve bağırsak dokularındaki Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ile bu dokulardaki metal düzeyleri ölçülmüştür. Böylece tuzluluğu arttırılmış sularda yaşayan balıkların metal toksisitesine verdikleri tepkiler belirlenerek, doğal koşullarda sucul organizmaların metal toksisitesi dışında, suyun diğer kimyasal özellikleri tarafından da stres altında olup olmadıkları incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Karakoç (1994), bir tatlı su balığı olan *O. niloticus*'un farklı tuz ve farklı metal etkileşiminin birikim üzerine etkilerini incelemiştir. Bu metalin alınımı, dağılımı ve eliminasyonu üzerine yaptığı çalışmalarda, tuzluluğun solungaç ve kas dokularında Cu^{+2} birikimini engellediğini, karaciğer dokusunda artan tuzluluk derişimine bağlı olarak Cu^{+2} birikimini azaldığını belirtmiştir.

Fuentes ve ark. (1996), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss'*in iki farklı boy grubuna sahip bireyleri üzerinde farklı tuzluluğa sahip ortamlarda ATPaz enzim aktivitelerini nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Küçük balıkların böbrek dokularında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin tuzlu suya transferinden sonra arttığı buna karşın, büyük balıkların bu transferden etkilenmediğini gözlemlenmiştir.

Gjevre ve Naess (1996), örihalin bir balık olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss walbavm)* ve Atlantik salmonun *(Salmo salar L.*) bağırsak ve solungaç dokularındaki Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi için uygun koşullar denenmiş ve sonuçta Salmo salar'ın bağırsak dokusundaki Na^+/K^+-ATPaz'ın özelliklerinin solungaç dokusundakilerden çok farklı olmadığını, fakat Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin bağırsak dokusunda solungaç dokusuna göre daha yüksek miktarda substrata gereksinim duyduğunu ve bağırsak dokusunda inkübasyon sıcaklığının düşük olduğunu ve aynı zamanda bağırsaklarda Na^+, K^+ ve Mg^{+2} düzeylerini belirlediklerini bildirmişlerdir.

Nolan ve ark. (1999), örihalin bir balık türü olan tilapianın (*O. mossambicus)* tatlı sudan tuzlu suya adaptasyonunun bağırsak ve solungaç dokusu üzerine bir çalışma yapmışlar ve solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalma olduğunu, bağırsak dokusunda ise Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi'nin önemsenmeyecek kadar az olduğunu belirtmişlerdir.

Webb ve ark. (2000), yüksek derişimlerdeki (250-650 μg/L) Ag^+'nın akut süreç (48-72 sa.) ve düşük derişimlerdeki (1,5-50 μg/L) Ag^+'nın kronik süreç (21 gün) sonundaki etkisini farklı tuzluluktaki (18-30 ppt) ortamlarda üç farklı deniz balığı (*Oligocottus maculosus, Porichthys notatus, Oncorhynchus mykiss*) üzerinde araştırmışlardır. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi etki süresi, metal derişimi, tuzluluk düzeyi,

doku tipi ve balık türüne bağlı olarak azalış ve artış göstermiştir. Araştırıcılar, inhibitör ve telafi mekanizmaları arasındaki dengesel farklılıklara bağlı olarak metal etkilerinin değişiklik göstermesine karşın, kronik Ag^{+} etkisinin Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini önemli düzeyde değiştirdiğini ve solungaç dokusunun önemli bir hedef organ olduğunu kaydetmişlerdir.

Canlı ve Atlı (2003), Akdeniz'de yaşayan 6 balık türünün (***Sparus auratus***, ***Atherina hepsetus***, ***Mugil cephalus***, ***Trigla cuculus***, ***Sardina pilchardus*** ve ***Scomberesox saurus)*** dokularında 6 ağır metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) düzeylerini ölçmüşlerdir. Bunların balık boyu ve ağırlığı ile olan ilişkilerini incelemişlerdir. Sonuçlarda hemen hemen bütün balıklarda büyüklük ile metal birikimi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Araştırıcılar bunu örnekleme alanının metal kirliliği düzeyinin balık metabolizmasının düzenleme kapasitesinden fazla olmadığı şeklinde yorumlarken, büyük hayvanların düşük metabolik hızlarının bu birikim azlığında rolünün olabileceğini vurgulamışlardır.

Güner ve ark. (2005), deniz suyuna doğrudan transfer edilen ve 14 gün süresince çevresel tuzluluğa maruz bırakılan tilapialarda (***O. niloticus)***, solungaç Na^{+}/K^{+}- ATPaz aktivitesinin, klorit hücre sayısı ve boyutlarında meydana gelen değişimler üzerine yaptıkları çalışmalarda, doğrudan deniz suyuna transfer edilen balıklarda %100 ölüm olduğunu, deniz suyuna kademeli transfer edilen tilapiaların solungaç klorit hücre sayısının azaldığını, klorit hücre boyutlarında artış olduğunu ve doğrudan ve kademeli adaptasyon sonucu yüksek tuzluluğun solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzim aktivitesi ve klorit hücre yoğunluğu üzerine etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Blanchard ve Grosell (2006), Atlantik balığı ***Fundulus heteroclitus***'u 0, 5, 11, 22 ve 28 ppt tuzluluk düzeylerinde Cu^{+2}'nin 30 ve 150 μg/L derişimlerine 30 gün süreyle bırakmışlar ve 150 μg/L Cu^{+2} etkisinde Na^{+} düzeyinin vücutta düşüş gösterdiğini, solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin ise azaldığını kaydetmişlerdir. Araştırıcılar fizyolojik bulguların, Cu^{+2} toksisitesinde tuzluluğa bağlı değişikliklerin açıklanmasında önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Saoud ve ark. (2007), pasifik teleost ailesinden olan ***Siganus rivulatus***'un tuzluluğa toleransı, plazma osmolaritesi ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde

tuzluluğun etkisi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışmada *Siganus rivulatus*'un solungaç dokusundaki Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın azalan tuzlulukta arttığını ve solungaç dokusunun çok güçlü osmoregülatör olduğunu belirtmişlerdir

Ağcasulu (2007), balık *Capoeta tinca*'nın karaciğer, kas ve solungaç dokularında Zn^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2} ve Cd^{+2} metallerinin birikim düzeyleri üzerine yaptıkları bu çalışmada metallerin balığın farklı organlarında farklı düzeyde biriktiği ve metal birikimlerinin vücut ağırlığına bağlı olarak değiştiğini saptamıştır. Metal birikim değerlerinin karaciğer, kas ve solungaçta $Zn^{+2}>Pb^{+2}>Cu^{+2}>Cd^{+2}$ şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

Atlı ve Canlı (2007), *O. niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 μM derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkileri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Çalışılan tüm enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğunu yalnızca solungaçta 20 μM Pb^{+2} etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2}-ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırıcılar enzim tepkilerinin metal tipi ve derişimlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ve enzimatik tepkilerin ekotoksikoloji alanında sucul ortamlardaki metal kirliliğine duyarlı belirteçler olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Kulaç (2010), tatlı su balığı olan *O. niloticus'*un sadece farklı tuzluluk (0, 2, 4 ve 8 ppt) derişimlerine ve ayrıca 1 μg/mL Cd^{+2} ve Cu^{+2} ile birlikte farklı sürelerde (1, 3, 7 ve 14 gün) etkilerine bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzim aktivitesinin farklı tuzluluk, metal, etki süresi ve doku tipine göre değiştiği gözlenmiştir. Metal ve tuzluluk etkisinde bulunan balıklarda ortam koşulları ve etki süresine bağlı olarak solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+}- ATPaz aktivitesinde değişimler bulunmuştur. Sadece tuzluluk etkisinde eğilim artış yönünde, tuzluluk+metal etkisinde azalma yönünde olmuştur. Metal birikimi sadece tuzluluk grubunda değişmezken, metal+tuz grubunun etkisinde eğilim artış yönünde olsa da, azalmalar da görülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller, Asitler ve Tuzlar

Kurşun [$Pb(NO_3)_2$]
Krom ($K_2Cr_2O_7$)
Nitrik asit (HNO_3 % 65, Merck)
Perklorik asit ($HClO_4$ % 60, Merck)
Trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$, Riedel)
Sodyum klorür (NaCl, Riedel)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Sukroz (α -D-Glukopiranozil β -D-fruktofuranosid; $C_{12}H_{22}O_{11}$ 99.5%, Sigma)
Trizma –Base (Tris [hidroksimetil]aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$, Sigma)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$, Merck)
Trizma Base (Tris [hidroksimetil] aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, 99.9%, Sigma)
Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP 99%, Sigma)
Decaethylene glycol monododecyl ether (Sigma)
Amonyum Molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck)
Sülfirik asit (H_2SO_4 %98, Merck)
Ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Merck)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Fluka)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)
Bakır(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)
Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)
Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Ekipmanlar

Spektrofotometre: Schimadzu UV-1800
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi: Perkin Elmer 3100-SpectrAA 220 FS
Derin dondurucu (- 80 ^oC): Revco Ultima II
Hassas Terazi: Sartorius Analytic ATL-224-I
Santrifüj: Sigma 2-16 K
Homojenizatör: Janke & Kunkel Ultra Turrax T25
Su Banyosu: Wise Bath WSB-30
pH metre: Hana HI 8314 membran pH metre
Manyetik Karıştırıcı: Janke & Kunkel IKAMAG RH
Karıştırıcı: Vortex S0 200

3.2. Yöntem

Deneylerde kullanılmak üzere Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan *Oreochromis niloticus*, sıcaklığın 20±1 ^0C olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuar ortamında 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 100 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yaklaşık 1 ay süreyle yeni koşullara adapte olmaya bırakılmıştır. Balıklar; kontrol (1), tuz etkisindeki kontrol (2), tuz ve metal etkisindeki deney grubu (3) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Buna göre 1. grupta tuz veya metal uygulanmazken, 2. grupta sadece tuz, 3. grupta ise tuz ve metal birlikte uygulanmıştır. Balıklar bu deney esasına göre 2 ve

8 ppt tuz (NaCl) derişimleri ile 1µg/mL kurşun ($Pb(NO_3)_2$) ve krom ($K_2Cr_2O_7$) derişimlerinin 1, 7 ve 14 gün süreyle etkisine bırakılmıştır. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. ± S.D., N=44).

pH	Oksijen mg O_2/L	İletkenlik µS/cm	Sertlik mg Ca_2CO_3/mL	Alkalinite mg Ca_2CO_3/mL
7,60±0,20	4,94±1,08	4,53±0,35	384,1±23,7	262,1±15,9

Balıklara günde bir defa olmak üzere ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) verilmiştir. Kullanılan balık yemindeki mikro elementlerin miktarları sırasıyla 70 mg Zn/kg, 25 mg Mn/kg, 25 mg Mg/kg, 2 mg Fe/kg, 0.7 mg I/kg, 1 mg Cu/kg, 0.2 mg Co/kg, 0.03 mg Se/kg; makro elementlerin miktarları ise en az % 2-en çok % 2.5 Ca, en az % 0.2-en çok % 1 Na, en az % 1 P ve yem içeriğindeki ham protein ise en az % 40'dır.

Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki metal derişimleri değişeceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirilmiştir ve metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verilmiştir.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Deney süreleri sonunda balıklar akvaryumlardan alındıktan sonra spinal yapılarak öldürülmüştür. Kurutma kağıdıyla kurulanan balıkların boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçülmüştür. Balıkların ortalama boy (12.7±0.79 cm) ve ağırlıklarının (34.2±6.96 g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlenmiştir ($P>0.05$). Steril aletler kullanılarak solungaç ve bağırsak dokuları alınmış ve homojenize edilinceye kadar -80 ^{0}C'de saklanmıştır. Dokular 250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base, 1 mM EDTA (pH 7.8) içeren homojenizasyon tamponu ile (1/10, w/v) 9500 rpm'de

1,5 dk süreyle buz üstünde homojenize edilmiştir. Ependorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13.000 g'de 20 dk +4 ^{0}C'de santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatantlar enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanılmıştır.

3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Bu çalışmadaki ATPaz aktivite ölçümünde, laboratuarımızda daha önce yapılan ATPaz karakterizasyon çalışması sonucu (Atli ve Canli, 2008) elde edilen enzim aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon ortamı derişimleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri.

	(- Ouabain)	(+ Ouabain)
Ouabain (mM)	-	1
NaCl (mM)	100	100
KCl (mM)	20	20
$MgCl_2$ (mM)	4	4
Tris (mM)	40	40
pH	7,7	7,7
ATP (mM)	3	3
^{0}C	37	37

Enzim aktivitelerinin saptanması için iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son iyon derişimleri Çizelge 3.2' de verilen 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek konulmuştur. Tüpler sıcak su banyosunda 37 ^{0}C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon, tüplerin üzerlerine 100 µL ATP konmasıyla başlatılmış ve 30 dk inkübasyon süresinin ardından 500 µL soğuk saf su (+4 ^{o}C) ile sonlandırılmıştır. Tüm bileşenler dışında sadece ATP içermeyen tüpler ATP körü, örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanılmıştır. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi, Toplam-ATPaz (ouabain içermeyen inkübasyon ortamı) aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz (ouabain içeren inkübasyon ortamı) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi analiz şeması.

	Total-ATPaz	Mg^{+2}-ATPaz	Ör Kör	ATP Kör	Kör
- Ouabain inkb ortamı	870µL	-	870µL	870µL	870µL
+ Ouabain inkb ortamı	-	870µL	-	-	-
Örnek Hmj	30µL	30µL	-	30µL	-
dH_2O	-	-	30µL	100µL	130µL
ATP	100µL	100µL	100µL	-	-

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi) Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark., 1973).

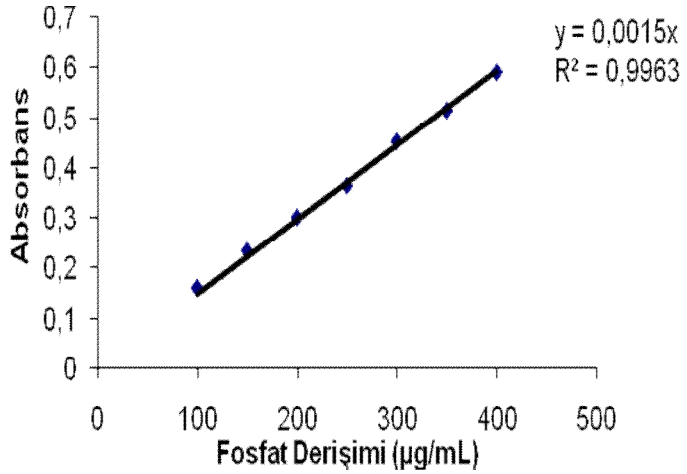
Ayıraçlar; 1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ^{0}C'de 30-40 dk bekletilmiştir.

2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 100 mL1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözülmüştür.

3. Ana ayıraç: 100 mL için 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı; 1. 1,5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayıraçtan konulmuştur.

2. Oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletilmiştir.
3. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülmüştür.
4. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Toplam Protein Analizi

Homojenize edilen solungaç ve bağırsak örnekleri santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatantlarda Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile protein analizi yapılmıştır.

Prensip;

Proteinlerin alkali bakır sülfat ortamında, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülerek protein miktarı kantitatif olarak belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungustik-fosfo molibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi renk verirler.

Ayıraçlar; 1- Ayıraç A: 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözülmüştür.

2- Ayıraç B_1: 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3- Ayıraç B_2: 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

4- Ayıraç C: 100 hacim ayıraç A + 1 hacim ayıraç B_1 + 1 hacim ayıraç B_2.

5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: 1 hacim Folin- Ciocalteu 1,5 hacim hacim saf su ile seyreltilmiştir.
6. Standart Sığır Albumin Çözeltisi: Stok sığır albumin çözeltisi 1 mL'de 1 mg (1000 µg/mL) sığır albumin olacak şekilde hazırlandı. Standart çözeltiler 100-200-300-400-500-600 µg/mL olacak şekilde stok sığır albumin çözeltisinden yapılan uygun seyreltmelerle hazırlanmıştır.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması;

Standart 1 = 100 µg : 0,1 mL stok bovin albumin + 0,9 mL distile su

Standart 2 = 200 µg : 0,2 mL stok bovin albumin + 0,8 mL distile su

Standart 3 = 300 µg : 0,3 mL stok bovin albumin + 0,7 mL distile su

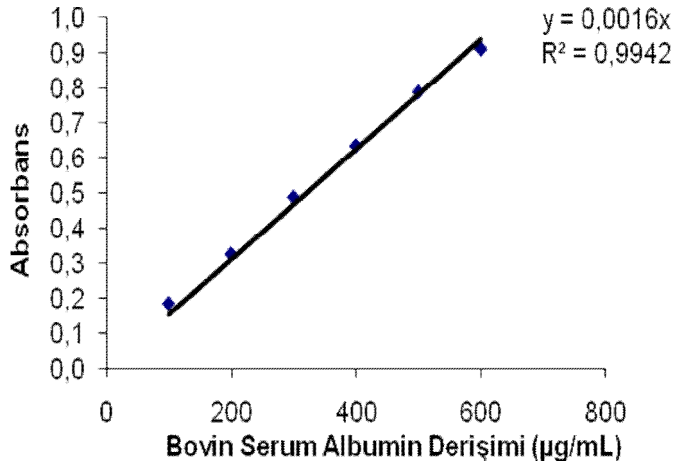
Standart 4 = 400 µg : 0,4 mL stok bovin albumin + 0,6 mL distile su

Standart 5 = 500 µg : 0,5 mL stok bovin albumin + 0,5 mL distile su

Standart 6 = 600 µg : 0,6 mL stok bovin albumin + 0,4 mL distile su

Deneyin Yapılışı;

1. Deney tüplerine hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0,3 mL konulmuştur.
2. Tüplerin üzerine 3 mL ayıraç C eklenmiştir.
3. Tüpler vortexle karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Tüplere 0,3 mL Folin-Ciocalteu konarak tüpler iyice karıştırılmıştır.
5. Oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir.
6. Absorbans değerleri 750 nm'de okunmuştur.
7. Sonuçlar 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µg/mL sığır serum albumini çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Buna göre 1,0 µg/mL Pb^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 7. gün sonunda toplam protein düzeyi:

y = 0,0016x

Absorbans: y = 0,590

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,590}{0,0016}$$

Derişim = 3,68 mg prot./mL

Aynı regresyon eşitliği kullanılarak kontrol, metal ve metal-tuz etkilerindeki gruplarda iki tekrarlı olmak üzere total protein düzeyleri hesaplanmıştır.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0{,}0015^{*} \text{ x } 4{,}5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0{,}03 \text{ (mL) x } 0{,}5 \text{ (sa.) x mg prot./mL}}$$

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y = 0,0015x)

1,0 µg/mL Pb^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 7. gün sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi;

Absorbans: y = 0,191

$$Na^{+}/K^{+}\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0{,}191 / 0{,}0015^{*} \text{ x } 4{,}5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0{,}03 \text{ (mL) x } 0{,}5 \text{ (sa.) x } 3{,}68 \text{ mg prot./mL}}$$

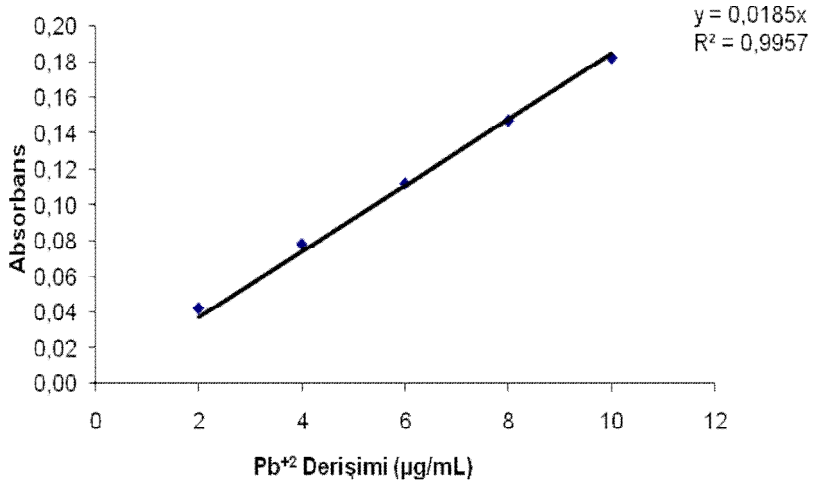
Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi = 8,40 µmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6. Metal Analizi

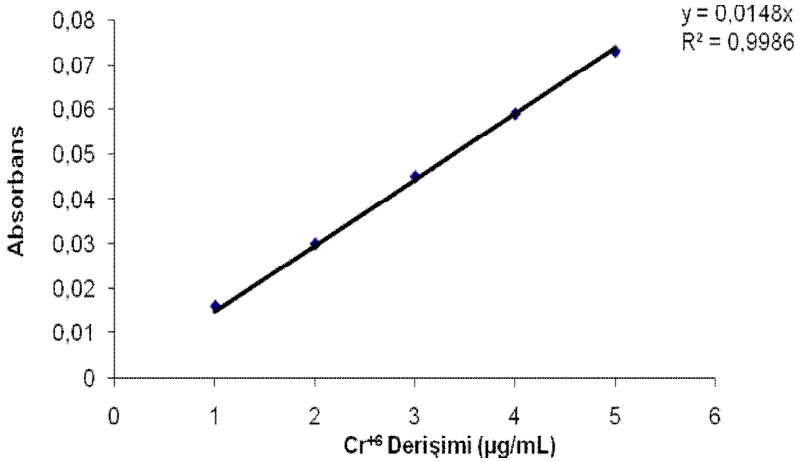
Toplam metal analizi için dokular 105 ^{0}C'de 5 gün süreyle sabit ağırlığa ulaşana kadar kurumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda dokular, kuru ağırlıkları saptandıktan sonra üzerlerine 2 mL perklorik asit ve 4 mL nitrik asit ilavesiyle 100 ^{0}C'de 4,5 saat süreyle çeker ocaklı ortamda yakılmıştır. Örneklerin tamamı homojen olarak yakıldıktan sonra plastik tüplere alınarak 10 mL'ye distile su ile seyreltilmiş ve atomik absorbsiyon spektrofotometresinde absorbans değerleri (Perkin Elmer AS 3100- SpectrAA 220 FS) okunmuştur. Kurşun ve krom için saptama sınırları sırasıyla 0,02 ve 0,003 µg/mL'dir.

3.2.7. Metal Derişiminin Hesaplanması

Cr^{+6} ve Pb^{+2} etkisinde kalan deney gruplarında ve kontrol gruplarında, metal standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart grafikler (Şekil 3.3.) kullanılarak metal birikim düzeyleri belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Pb^{+2} derişimi ve absorbansı arasındaki doğrusal ilişki



Şekil 3.4. Cr^{+6} derişimi ve absorbansı arasındaki doğrusal ilişki.

Standart eğrilerden elde edilen regresyon eşitlikleri Cr^{+6} ve Pb^{+2} için sırasıyla y=0,0148x ve y=0,0185x olarak bulunmuştur.

Toplam metal düzeyleri belirlenirken, regresyon eşitlikleri kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

1,0 µg/mL Pb^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 7. günün sonunda Pb^{+2} derişimi;
Absorbans: y = 1,136 µg/mL

Doku asitle yakıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandığı için

Derişim =1,136 x 10
Derişim =11,36 µg Pb^{+2}

Pb^{+2} etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0,1361 g olarak tespit edilmiştir. Buna göre 1 g dokudaki Pb^{+2} derişimi:

$$\text{Derişim} = \frac{11,36}{0,1361}$$

Derişim = 83,46 µg Pb^{+2}/g kuru ağırlık (k.a.)

Toplam metal düzeyi diğer Cr^{+6} ve Pb^{+2} etkisinde kalan deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplanmıştır.

3.2.8. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS yardımıyla "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde ($P<0.05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlenmiştir. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizilmiştir. Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

Kontrol, Cr^{+6} ve Pb^{+2}'nin 1,0 µg/mL derişimlerinin 1, 7 ve 14 gün süre ile etkisinde kalan *O. niloticus*'ların solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür. Deney süresi boyunca 2 ppt Cr etkisinde kalan balıklarda 13. günde sadece bir ölüm gözlenmiştir.

4.1.1.1. Kontrol Grubu Balıklar

4.1.1.1.(1). Kontrol Grubu

Elde edilen veriler, kontrol grubu balıkların solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 7,13±0,76 µmol Pi/mg prot./sa., düzeyinde olduğu saptanmıştır.

Bağırsak dokusunda ise kontrol grubu balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 4,55±0,80 µmol Pi/mg prot./sa., düzeyinde olduğu saptanmıştır.

4.1.1.1.(2). 2 ppt Tuzluluk Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

2 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi 14. günde artış gösterirken, bu artışın kontrol gurubuna göre % 175 oranında olduğu belirlenmiştir. 2 ppt tuzluluk etkisinde en yüksek aktivite 14. günde 12,5±0,51 µmol Pi/mg prot./sa. ($P<0,05$) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1.).

Bağırsak dokusunda ise 2 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 4.2.).

4.1.1.1.(3). 8 ppt Tuzluluk Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi

Solungaç dokusunda 8 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi 14. günde %162 oranında artış göstermiştir. 8 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda en yüksek aktivite 14. günde 11,6±1,29 µmol Pi/mg prot./sa. ($P<0,05$) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.).

Bağırsak dokusunda 8 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda ise 2 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda olduğu gibi Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark görülmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.2.).

4.1.1.2. Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

4.1.1.2.(1). 2 ppt Tuzluluk Ortamında Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

Solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi 2 ppt tuzluluk etkisine göre 14. günde %162 oranında azalış göstermiştir. 2 ppt krom etkisinde kalan balıklarda bu azalış 14. günde 7,71±0,97 µmol Pi/mg prot./sa. ($P<0,05$) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3.).

Bağırsak dokusunda ise Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.4.).

4.1.1.2.(2). 8 ppt Tuzluluk Ortamında Krom Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

Solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.5.).

Bağırsak dokusunda da Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.6.).

4.1.1.3. Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

4.1.1.3.(1). 2 ppt Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

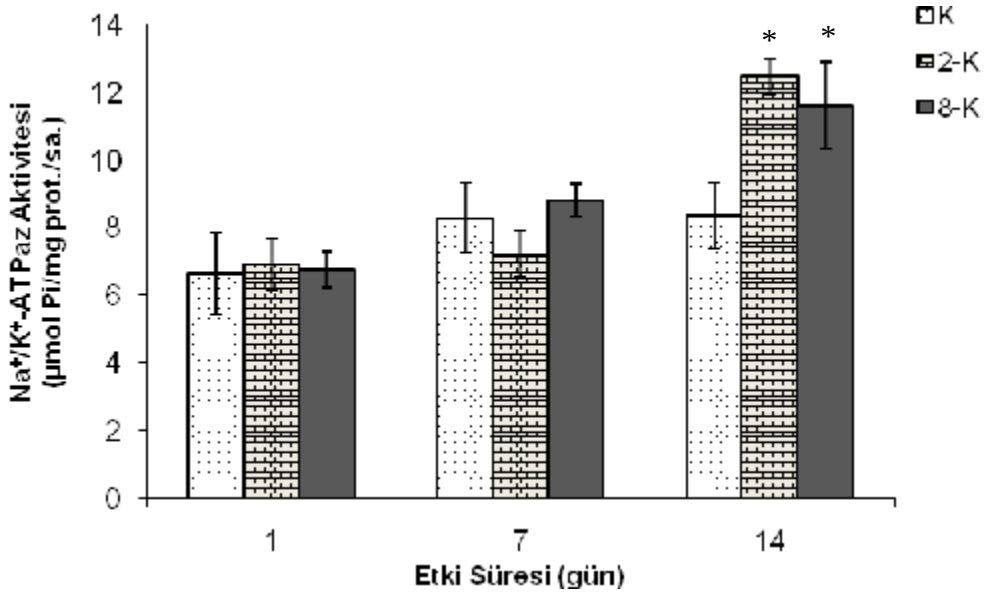
Solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0,05) (Şekil 4.3.).

Bağırsak dokusu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0,05) (Şekil 4.4.).

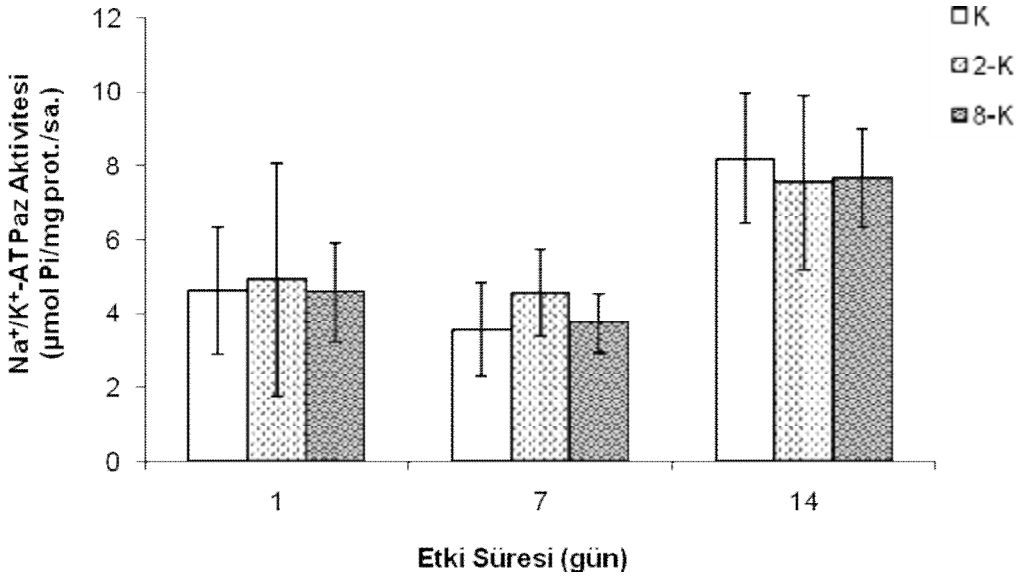
4.1.1.3.(2). 8 ppt Kurşun Etkisinde Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi

Solungaç dokusu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0,05) (Şekil 4.5.).

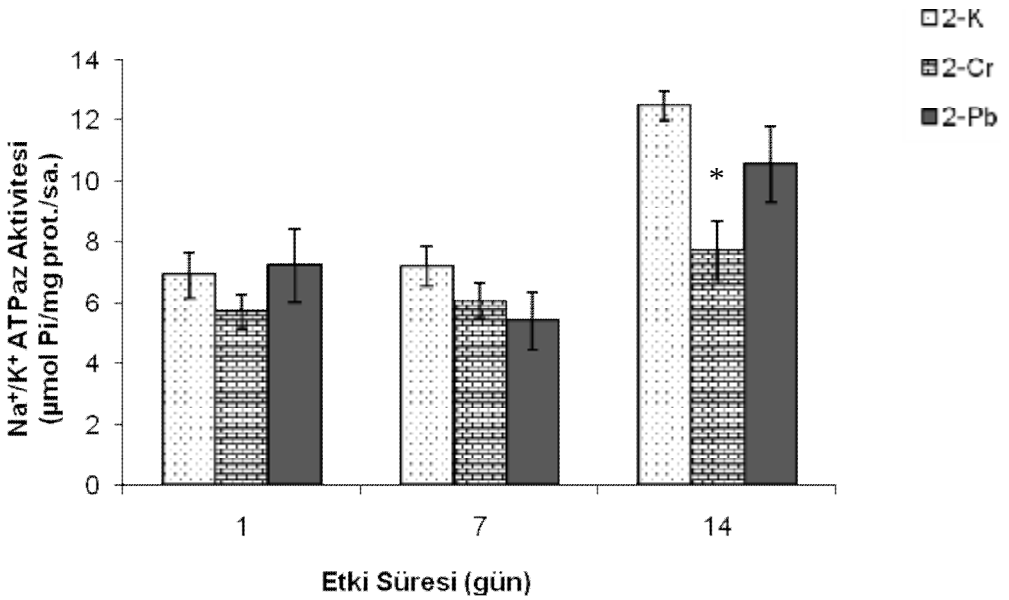
Bağırsak dokusu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde de anlamlı fark olmamıştır (P>0,05) (Şekil 4.6.).



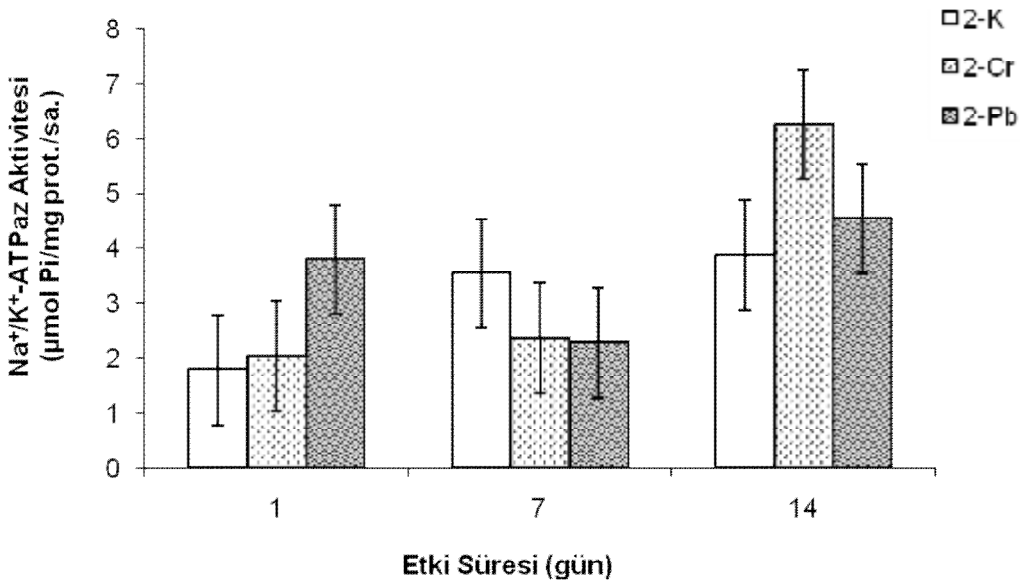
Şekil 4.1. Kontrol (K) ve farklı tuzluluk kontrollerinin (2-K ve 8-K) etkisinde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



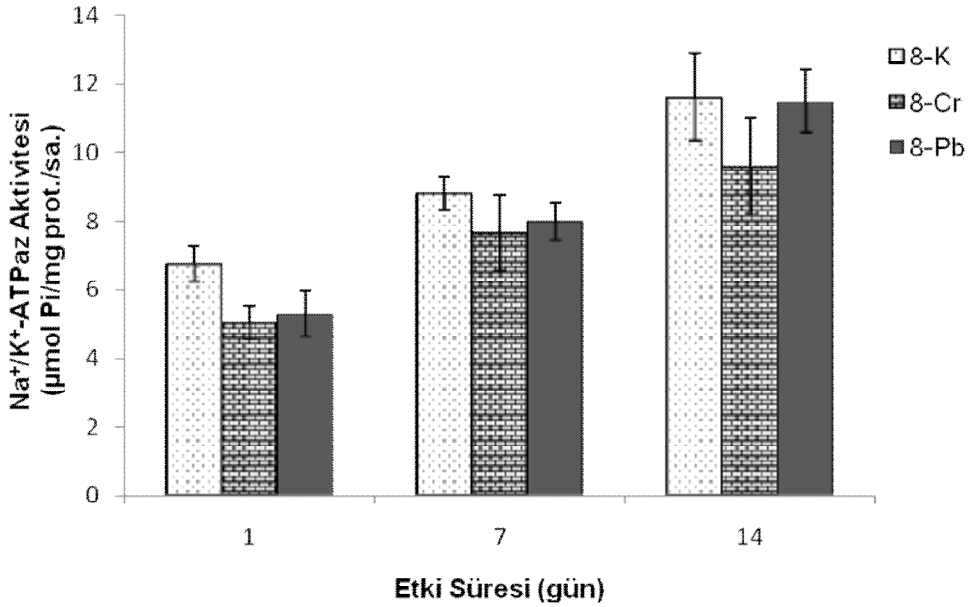
Şekil 4.2. Kontrol (K) ve farklı tuzluluk kontrollerinin (2-K ve 8-K) etkisinde *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.



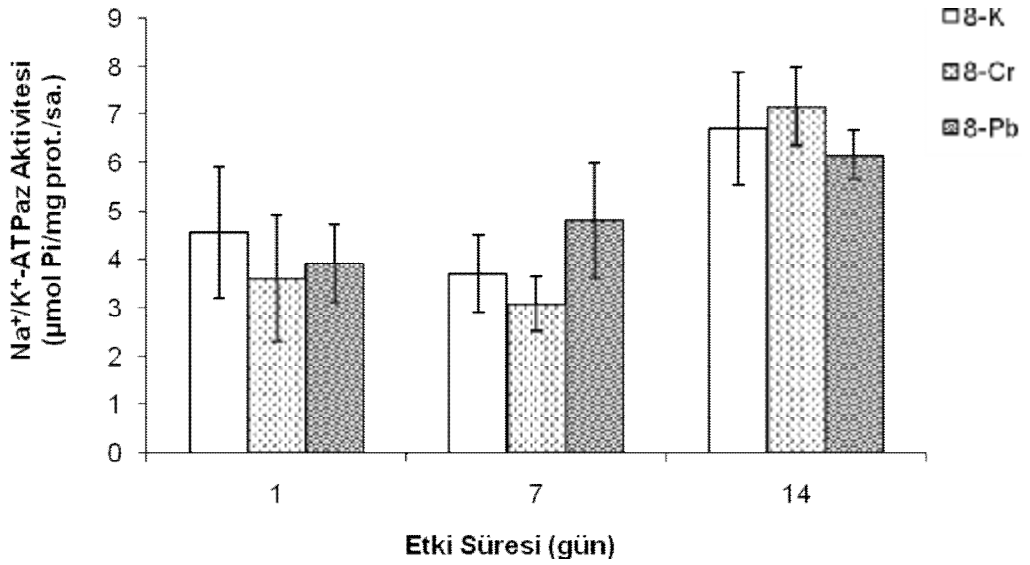
Şekil 4.3. 1,0 µg/mL metal + 2 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.4. 1,0 µg/mL metal + 2 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus* bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.5. 1,0 µg/mL metal + 8 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi.



Şekil 4.6. 1,0 µg/mL metal + 8 ppt tuzluluk etkisinde ve farklı sürelerde *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi.

4.1.2. Toplam Metal Düzeyi

4.1.2.1. Krom Düzeyleri

4.1.2.1.(1). Kontrol Gruplarında Krom Düzeyleri

Kontrol grubu ve tuzluluk kontrol gruplarının (2 ve 8 ppt) etkisindeki *O. niloticus*'ların solungaç ve bağırsak dokularında krom düzeyleri saptama sınırlarının altında belirlenmiştir (Krom: S.S.<0,003) (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.1.(2). Krom ve Tuz Etkisinde Bulunan Gruplarda Krom Düzeyleri

Solungaç dokusunda Cr+2 ppt etkisinde Cr düzeyi 14. gün sonunda 6,21±0,56 µg/g k.a. olarak belirlenmiştir (P<0,05) (Çizelge 4.1.). Bağırsak dokusunda ise Cr düzeyindeki artış 14. gün sonunda 19,4±1,13 µg/g k.a. olarak ölçülmüştür (P<0,05) (Çizelge 4.1.).

Solungaç Cr+8 ppt etkisinde Cr birikim düzeyi anlamlı bir artış göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.2.). Bağırsak dokusunda Cr+8ppt etkisinde ise Cr düzeyi yine anlamlı bir artış göstermemiştir (P>0,05) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.2. Kurşun Düzeyleri

4.1.2.2.(1). Kontrol Gruplarında Kurşun Düzeyleri

Kontrol grubu ve tuzluluk kontrol gruplarının (2 ve 8 ppt) etkisindeki *O. niloticus*'ların solungaç ve bağırsak dokularında kurşun düzeyleri saptama sınırlarının altında belirlenmiştir (Kurşun: S.S.<0,02) (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.2.).

4.1.2.2.(2). Kurşun ve Tuz Etkisinde Bulunan Gruplarda Kurşun Düzeyleri

Solungaç dokusunda Pb+2 ppt etkisinde Pb birikim düzeyi etki süresine bağlı olarak artmış ve en uzun etki süresi sonunda 41,3±2,61 µg/g k.a. değeri ile en yüksek düzeyde ölçülmüştür (P<0,05) (Çizelge 4.1.). Bağırsak dokusunda Pb^{+2} birikimi ise en yüksek 7. günde 236,3±10,70 µg/g k.a. olarak belirlenmiştir (P<0,05) (Çizelge 4.1.).

Solungaç dokusunda Pb+8 ppt etkisinde Pb birikim düzeyi en uzun etki süresi sonunda 51,6±4,07 µg/g k.a. olarak gözlenmiştir (P<0,05) (Çizelge 4.2.). Bağırsak dokusunda ise Pb^{+2} birikim düzeyi en yüksek 14. gün sonunda 112,9±5,55 µg/g k.a. olarak belirlenmiştir (P<0,05) (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.1. Tuzluluk (2 ppt) ve tuzluluk+metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus* dokularındaki toplam metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol balıklar; *: P<0,05 düzeyindeki istatistiksel farklılıkları.

Metal	Etki Süresi (gün)	Solungaç	Bağırsak
K 2 ppt (Cr^{+6})	1	<0,003	<0,003
	7	<0,003	<0,003
	14	<0,003	<0,003
Cr^{+6} 2 ppt	1	1,08±0,78	6,78±5,80
	7	1,63±0,39	13,1±3,77
	14	6,21±0,56*	19,4±1,13*
K 2 ppt (Pb^{+2})	1	<0,02	<0,02
	7	<0,02	<0,02
	14	<0,02	<0,02
Pb^{+2} 2 ppt	1	3,43±2,17	21,1±21,1
	7	24,1±5,3*	236,3±10,7*
	14	41,3±2,6*	74,4±7,6*

Çizelge 4.2. Tuzluluk (8 ppt) ve tuzluluk+metal etkisinde farklı sürelerde *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir. K: Kontrol balıklar; *: P<0,05 düzeyindeki istatistiksel farklılıkları.

Metal	Etki Süresi (gün)	Solungaç	Bağırsak
K 8 ppt	1	<0,003	<0,003
(Cr^{+6})	7	<0,003	<0,003
	14	<0,003	<0,003
Cr^{+6}	1	1,27±0,67	10,5±0,75
8 ppt	7	3,56±0,02	7,16±1,79
	14	3,65±0,58	6,16±0,63
K 8 ppt	1	<0,02	<0,02
(Pb^{+2})	7	<0,02	<0,02
	14	<0,02	<0,02
Pb^{+2}	1	3,25±3,25	62,1±32,9*
8 ppt	7	36,1±5,46*	30,4±4,57*
	14	51,5±4,07*	112,9±5,55*

4.2. Tartışma

Bu çalışmada tuzluluk (2 ve 8 ppt) ve metal (1,0 μg/mL Cr ve Pb) etkisinde kalan *O. niloticus'*da 14 günlük deney süresinin bitiminde solungaç ve bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerini ve bu dokulardaki metal birikim düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzim aktivite düzeylerinin farklı tuzluluk, metal, etki süresi ve doku tipine göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde ortam koşulları ve etki süresine bağlı olarak artış ya da azalış gözlenmiştir. Sadece tuzluluk etkisinde eğilim artış yönünde, tuzluluk+metal etkisinde azalma yönünde olmuştur. Metal birikimi sadece tuzluluk grubunda değişmezken, metal+tuz grubunun etkisinde eğilim genelde artış yönünde olmuştur.

Deney süresi boyunca 13. günde sadece bir balık ölümü gözlenmiştir. Mortalite söz konusu olduğunda sadece metalin cinsinden bahsetmek yetersiz olur. Çünkü balık türü, cinsiyet ve yaş gibi biyolojik faktörlerle birlikte ortamın diğer fiziksel ve kimyasal koşulları da metal toksisitesinde etkendir. Örneğin, Öner ve ark., (2008) yaptığı çalışmada *O. niloticus*'u farklı sürelerde (0, 5, 10, 20 ve 30 gün) 0,05 μg/mL derişimlerindeki Cu, Cd, Cr, Ag ve Zn etkisine bırakmıştır. Ag etkisinde kalan balıkların tamamı 16. gün sonunda ölmüştür. Benzer şekilde bir alabalık türü olan *Salmo gairdneri* 0,03 μg/mL Cu ve 0,1 μg/mL Cd etkisinde kısa sürede ölmüştür (Viale ve Calamari, 1984). Buna karşın aynı laboratuarda yapılan deneylerde 0.1, 0.5, 1.0 μg/mL Cd'nin 15, 30 ve 60 günlük sürelerde *Tilapia nilotica* türünde mortaliteye neden olmadığı gözlenmiştir (Kalay ve Karataş, 1999). Aynı şekilde Kalay ve Erdem (2003), *T. nilotica*'nın 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1.0 μg/mL derişimindeki Cd'nin 1, 15, 30, 45 ve 60 günlük sürelerdeki etkisi sonunda mortalite gözlememişlerdir ve hem ortam derişimine ve etkide kalma süresine bağlı olarak dokulardaki kadmiyum birikiminin artması, hem de birikim düzeyi bakımından dokular arasındaki ilişki (Böbrek>karaciğer>solungaç) gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalar günümüzde artan çevresel kirlilik sonucu metallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde, iyon taşınması, hücresel sıvı hacminin düzenlenmesi, zar potansiyelinin korunması gibi kilit öneme sahip ATPaz

enzimlerinin biyolojik belirteçler olarak büyük öneme sahip olduklarını vurgulamaktadırlar (Watson ve Beamish, 1981; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007). Bunlardan Na^+/K^+-ATPaz, hücre içindeki 3 Na^+ iyonunu hücre dışına 2 K^+ iyonunu hücre içine taşımak için ATP molekülünden açığa çıkan enerjiye gereksinim duymaktadır. Hem deniz hem tatlı su teleostlarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organlara özgü bir enzim olan Na^+/K^+-ATPaz enzimi temelde hücre içi homeostazisin korunmasından sorumludur. Na^+/K^+-ATPaz, yaklaşık 100 kDa ağırlığındaki katalitik α-alt ünitesi ile 55 kDa ağırlığındaki glikozile β-alt ünitesinden oluşmuş –SH grubu bakımından zengin ve bir steroid türevi (kardiyak glikozit) ouabain tarafından inhibe olan bir enzimdir (Heath, 1987; Diaz ve ark., 1998; Ribeiro ve ark., 2002). Zara bağlı enzimler olan ve dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, zar geçirgenliği üzerinde ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz'ların yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine duyarlı olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Bununla birlikte ATPaz'ların tuzluluk, sıcaklık gibi çeşitli faktörler tarafından da etkilendiği kanıtlanmıştır (Inman ve Lockwood, 1977; Diaz ve ark., 1998). Enzimin metallerin *in vivo* ve *in vitro* etkisine duyarlı olduğu ve ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin, çeşitli çevresel kirleticilere cevap olarak oluştuğu gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003, Atlı ve Canlı, 2007). Buna ek olarak çeşitli toksikolojik ve fizyolojik etkenlerin *in vivo* ve *in vitro* metal etkilerinde farklılıklara neden olduğu bildirilmiştir (Stagg ve Shuttleworth, 1982; Pinkney ve ark., 1989; Lemaire-Gony ve ark., 1995).

Balıkların dış ortamdaki osmolariteye karşın hücre dışı sıvılardaki osmotik derişimin aktif olarak düzenleyebilme yeteneği olarak tanımlanan osmoregülasyon işlevinin gerçekleştiği solungaç, böbrek ve bağırsak dokularında su ve iyon hareketleri düzenlenmektedir (Pinkney ve ark., 1989; Pelgrom ve ark., 1995; De La Torre ve ark., 2000). Böylece sucul organizmaların su ve iyon homeostazislerini dengeleyerek değişen dış ortam koşullarına uyum sağlama yeteneklerinde (osmotik ve iyonik düzenleme) birincil öneme sahiptir. Bu bağlamda plazma Na^+ ve Cl^-, yoğun miktarda bulunmakla birlikte osmotik basıncın düzenlenmesinde, K^+, Mg^{+2} ve

Ca^{+2} ise diğer yaşamsal fonksiyon ve mekanizmalarda hücre içi ve hücre dışı sıvılarda osmotik ve iyonik regülasyonun düzenlenmesi adına önemli görevlere sahiptir (Larsson ve ark., 1985, Simkiss ve Taylor, 1989). Balıklarda solungaç dokusu solunum gazları, elektrolitler, su ve nitrojenli atıkların taşınmasının ve asit-baz dengesinin gerçekleştiği biyolojik ortamdaki tartışmasız en karmaşık epitellerden biridir. Bu karmaşık fonksiyonları yerine getirebilmek için yüzlerce filament ile binlerce lameller yapıdan oluşan bu epitel doku balığın toplam yüzey alanının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Bu anlamda da metallerin toksik özelliklerinin gözlendiği birincil hedef organlardan biridir (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007). Bağırsak dokusu ise böbrek ve solungaç gibi boşaltım ve osmoregülasyonda rol oynar. Böylece balıklarda homeostasisin korunması ve metabolizma artıklarının atılışı, bu organların birlikte ve uyumlu bir biçimde çalışmalarıyla sağlanır.

Tuzluluk etkisinde solungaçta Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi en uzun etki süresi sonunda artış göstermiştir. Bununla ilgili olarak Nolan ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada tatlı su ve tuzlu su etkisindeki *O. mossambicus*'un plazma glukoz ve kortizol düzeylerinde artış, plazma Na^+ ve Cl^- düzeylerinde ise bir değişiklik gözlememişlerdir. Bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi tatlı suda artarken, böbrek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi sadece tuzlu suda artış göstermiştir. Solungaç enzim aktivitesi ise tuzlu su etkisindeki balıklarda azalış göstermiştir. Araştırıcılar tuzlu su etkisinin tatlı suya göre daha fazla olduğunu, bunun da branşiyal oksijen düzeyi ve ATP tüketimi gibi sonuçlarla ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır. Araştırıcılar ayrıca artan bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin branşiyal iyon kaybını dengelemek adına artan Na^+ alımı ve hiperglisemiye karşı durmakla ilişkili olabileceğini, buna karşın böbrek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin ise sadece tuzlu su etkisinde artış gösterdiğini ve bu durumun da strese karşı böbreğin verdiği tepkiden ve sudan geçen fazla miktardaki iyonun atımından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Tuzlu su etkisinde azalan solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi klorit hücre sayısındaki azalmayla ilişkili olabilmektedir.

Shivkamat ve Roy (2005), *O. niloticus*'un % 1'lik tuzlu suya bir aylık adaptasyonu sırasında solungaç epitel hücre membranlarında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi'nin tuzluluk stresine rağmen % 70 arttığını ve mikrozomal membrandaki

glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın 2.5 kat arttığını gözlemlemişlerdir. Tuzluluk adaptasyonu sırasında solungaç epitelyum hücrelerindeki Na^+'nın içeri akışının K^+'nın dışarı akışından daha fazla olduğunu ve Na^+/K^+-ATPaz 'ın yardımıyla membran yapısının değiştiğini belirtmişlerdir.

Arjona ve ark., (2007), deniz balığı olan *Solea senegalensis* farklı çevresel tuzluluklara maruz bırakmışlar ve balığın vereceği osmoregülatör yanıtı incelemişlerdir. Sonuç olarak çevresel tuzluluk ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi arasında doğrusal ilişki olduğunu ve böbrek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin değişmediğini gözlemlemişlerdir. Balıkların osmoregülatör mekanizmalarının deney süresince değişimine bağlı olarak Na^+/K^+- ATPaz aktivitesinin değiştiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Saoud ve ark., (2007), deniz balığı olan *Siganus rivulatus*'u farklı sürelerdeki çeşitli tuzluluk derişimlerinin etkisine bırakmış ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi'nin azalan tuzlulukta arttığını gözlemlemişlerdir. Bu deneyin sonucu yaptığımız deneyden farklı bir sonuç göstermiştir, bunun nedeni kullanılan tuz miktarındaki farklılıktan ve balık türünden kaynaklanabilir.

Doza ve süreye bağlı metal etkisinin gözlendiği bir çalışmada, *Periophthalmus dipes* 5, 10 ve 15 mg/L Cr^{+6} etkisine 2, 4 ve 6 gün süreyle bırakıldıktan sonra solungaç, böbrek ve bağırsak dokularında ATPaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür (Thaker ve ark., 1996). Buna göre araştırıcılar derişime ve süreye bağlı genel bir inhibisyonun gözlenmesine karşın, enzim aktivitesinin azalmasında etki süresinin daha önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarında da gözlendiği gibi Cr^{+6}'nın akut süreçte Na^+/K^+-ATPaz aktivitesine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmazken, kronik süreçte azalışa neden olmuştur. Araştırıcılar Cr^{+6}'nın dokularda osmoregülatör sistemi bozduğunu, ATPaz enzim sistemini inhibe ederek iyon ve metabolitlerin emiliminin azaldığını vurgulamışlardır. Bununla birlikte Thaker ve ark. (1996), Cr^{+6}'nın dokularda osmoregülatör sistemi bozup iyon ve metabolitlerin emiliminden sorumlu aktif taşıma sistemini bloke ederek ATPaz enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olduklarını bildirmişlerdir. Bir tatlı su balığı türü olan *Anabas scandens*'in 30 günlük 25 mg/L Cr^{+3} ve Cr^{+6} etkisi sonrasında böbrek ve karaciğer Na^+/K^+-ATPaz

aktivitesinde inhibisyon gözlenirken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde başlangıçta artış daha sonra azalış görüldüğü belirtilmiştir (Venugopal ve Reddy, 1993). Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0.5-4.0 mg/L) etkisinde 14 gün kalan *T. zillii*'nin solungacında Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzim aktivitesinin önemli oranda azaldığını göstermişlerdir.

Bu sonuçlar ışığında enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte metallerin tek ve iki değerlikli iyonlarla yarışması veya enzim yapısındaki –SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişikliklere neden olması da aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Enzim aktivitesindeki artışlar ise bozulan düzenin tekrar onarılabilmesi için devreye giren telafi mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. De La Torre ve ark. (2007), balıkta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına, doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır.

O. niloticus'da solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin düşük tuzluluk düzeyleri ile ters orantılı olduğu buna karşılık yüksek tuzluluk düzeylerinde ise artan iyon regülatör kapasitelerine gereksiniminden dolayı doğru orantılı olarak geliştiği belirtilmiştir. Güner ve ark., 2005, az tuzlu ortamda osmorgülasyon için metabolik gereksinim kan osmotik gradientinin minimal olması nedeniyle azalmaktadır. Araştırıcılar balıklarda tatlı sudan tuzlu suya doğrudan transferi sonrasında görülen ölçümlerin, dehidrasyon sonucu Na^{+}/K^{+}-ATPaz fonksiyonundaki hasardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak *O. niloticus*'un yüksek düzeydeki tuzluluk etkisine aşamalı uyumdan sonra dirençlilik gösterdiğini ve bunun osmoregülatör mekanizmaları uyarmada doğrudan transferden daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte tuzluluğun yanında diğer uyum yöntemlerinin osmoregülatör organlardaki etkisini incelemenin önemli olduğu ve bu yapılırken de su kalitesi gibi diğer fizyolojik etkenlerin de göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır.

Metal birikim sonuçlarına göre etki süresine bağlı olarak birikim düzeyinde artış gözlenirken, tuzluluk düzeyinin artışı ile metal birikiminin azaldığı kaydedilmiştir. Dokularda metal birikimlerinin erken fazda daha hızlı olmasının, dokularda metal bağlayan ligantların hızla doyuma ulaşmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Wong ve Wong, 2000).

Gerek doğal gerekse antropojenik faktörlerin etkisi ile sucul ortamdaki derişimi artan ağır metaller, sucul organizmalar tarafından ortamdan alınmakta ve besin zinciri aracılığı ile üst trofik düzeylere artan derişimlerde iletilerek, metabolik bakımdan aktif doku ve organlarda birikmekte, hücresel veya moleküler düzeyde yapısal ve işlevsel bozukluklara hatta mortaliteye neden olmaktadırlar (Heath 1995).

Balıklarda ağır metal gibi toksik maddelerin atılım, depolama ve detoksifikasyon mekanizmaları, alınımı karşılamadığı durumlarda ağır metallerin doku ve organlarda birikimine neden olmaktadır. Balıklarda ağır metal birikimi doku ve organlar arasında farklılık göstermektedir. Ağır metaller, subletal ortam derişimlerinde etki süresinin başlangıcında öncelikle solungaç dokusunda birikmektedir (Flos ve ark. 1987).

Doğal su ortamlarında genellikle subletal düzeylerde bulunan metallerin kronik etkilerine verilen tepkiler beslenme kaybı, büyümede gerilik, iyon kaybı, solunum yetersizliği ve ölüm gibi çeşitli fizyolojik ve davranışsal değişiklikler olabilmektedir (Heath, 1987; Hogstrand ve Wood, 1996).

Bu çalışmada kullanılan *O. niloticus*, Afrika kökenli bir balık türü olup, kültür koşullarında bakım ve üremesinin kolay olması, besin maddelerini iyi değerlendirmesi, kirlenmeye ve çeşitli hastalıklara dirençli olması bu türün kültür balıkçılığındaki önemini her geçen gün arttırmaktadır (Erdem, 1990; Canlı ve Erdem, 1994; Kalay, 1999). Tatlı su orjinli olan Tilapialar değişik tuzluluklara gösterdikleri toleransla da dikkat çekmektedirler (Genç, 1996).

Bu çalışmanın sonuçları, sucul ortamlarda ağır metal kirliliğinin ve canlı organizmalara olan etkilerinin belirlenmesinde, su kimyasının ve organizmanın metabolik faaliyetlerinin önemli kriterler olabileceğini ve çevresel etki değerlendirilmeleri yapılırken bunların dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır. Aynı zamanda bu çalışmada balık osmoregülasyon sisteminin Na^+,K^+-ATPaz

aktivitesindeki değişiklikler temelinde ağır metal toksisitesine verdiği tepkiler farklı tuzluluktaki sularda test edildi. Elde edilen veriler Na^+,K^+-ATPaz'ın hem tuzluluk hem de metal etkilerinin belirlenmesinde duyarlı bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde diğer metabolik yolların nasıl tepkiler vereceği ile ilgili çalışmaların yapılması, organizmanın bir bütün olarak ağır metallerden nasıl ve ne kadar etkilendiği hakkında aydınlatıcı bilgiler verebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. Deney süresince *O. niloticus*'larda sadece Cr+2 ppt etkisinde 13. günde ölüm gözlenmiştir.
2. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi tuzluluk (2 ppt ve 8 ppt) etkisinde kalan *O. niloticus*'ların sadece solungaç dokusunda süreye (1, 7 ve 14 gün) bağlı olarak artış göstermiştir.
3. Krom+2 ppt etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi en uzun etki süresi sonunda azalış göstermiştir.
4. Metal birikimi sadece tuzluluk etkisinde değişmezken, metal+tuz grubunun etkisinde eğilim artış yönünde olduğu görülmüştür.

5.2. Öneriler

1. Sucul organizmalarda tuzluluğun metal toksisitesine olan etkilerini gözlemde farklı metallerin karışımları kullanılarak, bunların canlı metabolizmasına etkileri değerlendirilebilir.
2. Farklı balık türlerinde yapılacak ATPaz aktivite analizleri uzun süreli dönemler için arazi çalışmalarına uygulanırsa doğal ortamdaki metal etkilerini gözlemde çok daha duyarlı ve doğru sonuçlar verebilir.
3. Enzimatik veya enzimatik olmayan başka mekanizmaların metal+tuzluluk etkilerine verdiği cevaplar sonucunda bunların biyoindikatör olma potansiyelleri değerlendirilebilir.
4. Tuzluluk dışında suyun farklı fizikokimyasal özellikleriyle metallerin ATPaz aktivitesine olan etkileri de ayrıca değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

AĞACASULU, Ö., 2007. Sakarya Nehri Çeltikçe Çayı'nda Yaşayan Capoeta tinca (Heckel, 1843)'nın Dokularında Ağır Metal Birikiminin İncelenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 43.

ALVES, L.C., and WOOD, C.M., 2006. The Chronic Effects of Dietary Lead in Freshwater Juvenile Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fed Elevated Calcium Diets. Aquatic Toxicology, 78: 217-232.

ARJONA, F.J., 2007. Osmoregulatory Response of Senegales *senegalensis*) to Changes in Environmental Salinity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 148: 413-421.

ARUNKUMAR, R.I., RAJASEKARAN, P., and MICHAEL, R.D., 2000. Differential Effect of Chromium Compounds on the Immune response of the African Mouth Breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). Fish and Shellfish Immunology, 10: 667-676.

ATKINSON, A., GATEMBY, A.O., and LOWE, A.G., 1973. The Determination of Inorganic Ortophosphate in Biological Systems. Biochimica Et Biophysica Acta, 320: 195–204.

ATLI, G., and CANLI, M., 2003. Natural Occurrence of Metallothionein-like Proteins in the Liver of Fish *Oreochromis niloticus* and Effects of Cadmium, Lead, Copper, Zinc, and Iron Exposures on Their Profiles. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 70: 619-627.

ATLI, G., ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S., and CANLI, M., 2006. Response of Catalase Activity to Ag^{+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, and Zn^{2+} in Five Tissues of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 143: 218-224

ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus.* Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 282–287.

———, 2008. Characterization of Branchial Na,K-ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 32: 299-304.

ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Response ofantioxidant system of freshwater fish Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Cd,Cu,Cr,Zn,Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety 73 (2010) 1884–1889.

ATLI, G., 2009. Bakır, Çinko, Kadmiyum, Krom ve Gümüş'ün *Oreochromis niloticus*'un Solungaç ve Böbrek Dokusundaki Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile Kas Dokusundaki Ca^{+2}-ATPaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana, 206.

AY, Ö., KALAY, M., TAMER, L., and CANLI, M., 1999. Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62: 160-168.

BIANCHINI, A., and WOOD, C.M., 2003. Mechanism of Acute Silver Toxicity in *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22 (6): 1361–1367.

BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2004. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189– 194.

———, 2006. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. International Congress Series, 1275: 189– 194.

BLANCHARD, J., and GROSELL, M., 2006. Copper Toxicity Across Salinities from Freshwater to Seawater in the Euryhaline Fish Fundulus heteroclitus: Is Copper an Ionoregulatory Toxicant in High Salinities? Aquatic Toxicology, 80: 131-139.

BOGE, G., N'DIAYE, P., ROCHE, H., and PERES, G., 1989. Effects of Hexavalent Chromium at Non-lethal Concentrations on the Enzymology of the Intestine of *Salmo gairdneri* and *Dicentrarchus labrax* (Pisces). Journal of Physiology-Paris, 83 (2): 57-63.

BURDEN, V.M., SANDHEİNRİCH M.B. and CALDWELL C.A., 1998. Effects of lead on the growth and δ-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Enviromental Pollution, 101(2): 285-289

CANLI, M., and ERDEM, C., 1994. Mercury Toxicity and Effects of Exposure Concentration and Period on Mercury Accumulation in Tissues of a Tropical Fish *Tilapia nilotica* (L.). Turkish Journal of Zoology, 18: 233-239.

CANLI, M., 1995. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Some Blood Parameters in the Carp *Cyprinus carpio*. Turkish Journal of Zoology, 19: 305-311.

CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of In Vivo Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus.* Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 31: 491–501.

CANLI, M., and ATLI, G., 2003. The Relationships Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. Environmental Pollution, 121: 129–136

DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. Enviromental Pollution, 109: 277-282.

_____, 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. Chemosphere, 68: 1582-1590.

DIAZ, M., COZZI, S., ALMANSA, E., CASARIEGO, M., BOLANOS, A., CEJAS, J., and LORENZO, A., 1998. Characterization of Intestinal Na^+-K^+-ATPase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a Tissue-Specific Heterogeneity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 121: 65 76.

ERDEM, C., 1990. Cadmium Accumulation in Liver, Spleen, Gill and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica* (L.). Biyokimya Dergisi, Cilt XV, 3: 13-22.

FLOS R, Tort L, Balasch J (1987) Effects of Zinc Sulphate on Haematological Parameters in the Dogfish *Scyliorhinus canicula* and Influences of MS-222. Mar. Environ. Res. 21, 289-298.

FUENTES,J.,SOENGAS,JL.,BUCETA,M.,OTERO,J.,REY,P.; and REBOLLEDO, E., 1996. Kidney ATPase Response in Seawater-Transferred Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).Effect of Salinity and Fish Size.Journal of Physiology and Biochemistry,52(4):231-238

GENÇ, E., 1996. Farklı Tuzlulukdaki Suların Tilapia (*Oreochromis niloticus* L. 1758) Balıklarının Gelişimine Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 46.

GJEVRE, A.G., and NAESS, L.I.M., 1996. Intestinal Na^+/K^+-ATPase Activity in Salmonids. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 115 (2): 159-168.

GÜNER, Y., ÖZDEN, O., ÇAĞIRGAN, H., ALTUNOK, M., and KIZAK, V., 2005. Effects of Salinity on the Osmoregulatory Functions of the Gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 1259-1266.

HEATH, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Florida, USA, 245s.

HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 1996. The Physiology and Toxicology of Zinc in Fish (E.W. TAYLOR editör). The Toxicity of Silver to Marine Fish, University Press, Cambridge, s.61–84.

INMAN, C.B.E., and LOCKWOOD, A.P.M., 1977. Some Effects of Methylmercury and Lindane on Sodium Regulation in the Amphipod Gammarus Duebeni During Changes in the Salinity of its Medium. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 58: 67-75.

KALAY, M., and ERDEM, C., 2003. Tilapia nilotica'da Kadmiyum Birikiminin Total Protein Düzeyine Etkisi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27: 1367-1374.

KALAY, M., and KARATAŞ, S., 1999. Kadmiyumun *Tilapia nilotica* (L.)'da Kas, Beyin ve Kemik (Omurga Kemiği) Dokularındaki Birikimi. Tr. J. Of Zoology, 23 (3): 985-991.

KARAKOÇ, M., 1994. *Tilapia nilotica*'da Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularındaki Bakır Birikimi Üzerine Tuzluluğun Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 50.

KAMUNDE, C., and WOOD, C.M., 2003. The Influence of Ration Size on Copper Homeostasis during Sublethal Dietary Copper Exposure in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology, 62: 235-254.

KATO, A., DOI, H., NAKADA, T., SAKAI, H., and HIROSE, S., 2005. Takifugu obscurus is a Euryhaline Fugu Species Very Close to Takifugu rubripes and Suitable for Studying Osmoregulation. BMC Physioloy, 5:18.

KAYHAN, F.E., 2006. Su Ürünlerinde Kadmiyumun Biyobirikimi ve Toksisitesi. E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 23 (1-2): 215-220.

KOMJAROVA, I., and BLUST, R,. 2008, Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia manga*, a stable isotope experiment. Aquatic Toxicology 90:138-144

KUHNERT, P.M., KUHNERT, B.R., and STOKES, R.M., 1976. The Effect of In Vivo Chromium Exposure on Na/K- and Mg-ATPase Activity in Several Tissues of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 15 (4): 383-390.

KULAÇ, B., 2010. Tuzluluk ve Metal (Cd, Cu) Etkisinde Kalan Tatlı Su Balığı Oreochromis niloticus'un Dokularında Na,K-ATPaz Aktivitesi ve İyon Düzeylerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, 84.

LAIZ-CARRION R., SANGİAO-ALVARELLOS S., GUZMAN J.M., MARTİN DEL RİO M.P., SOENGAS J.L., and MANCERA J.M., 2005 Growth Performance of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* in Different Osmotic Conditions: Implications for Osmoregulation and Energy Metabolism, *Aquaculture*, 250, 849-861.

LARSON, A., HAUX, C., and SJOBECK, M., 1985. Fish Physiology and Metal Pollution: Results and Experiences from Laboratory and Field Studies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 9: 250-281.

LEMAIRE-GONY, S., LEMAIRE, P., and PULSFORD, A.L., 1995. Effects of Cadmium and Benzo(a)pyrene on the Immun System, Gill ATPase and EROD Activity of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Aquatic Toxicology, 31: 297-313.

LIANG, Y., CHEUNG, R.Y.H., and WONG, M.H., 1999. Reclamation of Wastewater for Polyculture of Freshwater Fish: Bioaccumulation of Trace Metals in Fish. Pergamon, 33: 2690-2700.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARRA, N.J., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 1993. Branchial Mechanisms of Acclimation to Metals in Freshwater Fish (J.C. RANKIN and F.B. JENSEN editör). Fish Ecophysiology, Chapman and Hall, London, s.297–332.

McGEER, J.C., and WOOD, C.M., 1998. Protective Effects of Water Cl- on Physiological Responses to Waterborne Silver in Rainbow Trout. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 55 (11): 2447–2454.

McGEER, J. C., SZEBEDINSZKY, C., McDONALD D. G. and WOOD, C. M., 2000. Effect of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout 2: Tissue Spesific Metal Accumulation. Aquatic Toxicology. 50, 245-256.

MEINELT T., Playle, R.C., Pietrock M., Burnison B.K., Wienke A., Steinberg C.E.W., Interacion of Cadmium Toxicity in Embryos and Larvae of Zebrafish (*Danio rerio*) with Calcium and Humic Substances, *Aquatic Toxicology*, 54, 205-15, (2001).

MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L, MARTINS, C.M.G., PINHO, G.L.L., CHAVES, I.S.C., FERREIRACRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., and BIANCHINI, A., 2007. Pollution Biomarkers in Estuarine Animals: Critical Review and New Perspectives Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 146: 221-234.

NOLAN, D.T., VELD, R.L.J.M.O., BALM, P.H.M., and BONGA, S.E.W., 1999. Ambient Salinity Modulates the Response of the Tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to Net Confinement. Aquaculture, 177: 297-309.

O'NEILL, J.G., 1981. The Humoral Immune Response of *Salmo trutta* L. And *Cyprinus carpio* L. Exposed to Heavy Metals. Journal of Fish Biology, 19: 297 – 306.

ÖNER, M., ATLI, G., and CANLI, M., 2008. Changes in Serum Biochemical Parameters of Freswater Fish Oreochromis niloticus Following Prolonged Metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) Exposures. Environmental Toxicology and Chemistry, 27: 360–366.

PAN, Q., LUI, S., TAN, Y.G., and BI, Y.Z., 2003. The Effect of Chromium Picolinate on Growth and Carbohydrate Utilization in Tilapia, *Oreochromis niloticus-Oreochromis aureus.* Aquaculture, 225: 421–429.

PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1995. Effects of Combined Waterborne Cd and Cu Exposures on Ionic Compositions and Plasma Cortisol in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2: 227-235.

PINKNEY, A.E., WRIGHT, D.A., JEPSON, M.A., and TOWLE, D.W., 1989. Effects of Tributyltin Compounds on Ionic Regulation and Gill ATPase Activity in Estuarine Fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 92 (1): 125-129.

RIBEIRO, M.G.L., PEDRENHO, A.R., and HASSON-VOLOCH, A., 2002. Electrocyte (Na^+–K^+)-ATPase Inhibition Induced by Zinc is Reverted by Dithiothreitol. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34: 516–524.

RIEDEL, B., and CHRISTENSEN, G., 1979. Effect of Selected Water Toxicants and Other Chemicals upon Adenosine Triphosphatase Activity *In Vitro*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 23: 365-368.

ROGERS, J.T., RICHARDS, J.G., and WOOD, C.M., 2003. Ionoregulatory Disruption as the Acute Toxic Mechanism for Lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 64: 215-234.

SAOUND, I.P., KREYDIYYEH, S., CHALFOUN, A., and FAKIH, M., 2007. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 348: 183-190.

SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., and ANDREU-MOLINER, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 434–441.

SHEPHARD, K., and SIMKISS, K., 1978. The Effects of Heavy Metal Ions on Ca^{+2} ATPase Extracted from Fish Gills. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 61: 69-72.

SHIVKAMOT, P., and ROY, R., 2005. Regulation of Membrane Lipid Bilayer Structure During Salinity Adaptation: A Study with the Gill Epithelial Cell Membranes of Oreochromis niloticus. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 142: 28-36.

SIMKISS, K., and TAYLOR, M.G., 1989. Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. Review. Aquatic Sciences, 1 (1): 173-188.

STAGG, R., GOKSOYR, A., and RODGER, G., 1992. Changes in Branchial Na^{+},K^{+}-ATPase, Metallothionein and P450 1A1 in Dab *Limanda limanda* in the German Bight: Indicators of Sediment Contamination? Marine Ecology Progress Research, 91: 105-115.

STAGG, R.M., and SHUTTLEWORTH, T.J., 1982. The Effects of Copper on Ionic regulation by the Gills of the Seawater-Adapted Flounder (*Platichthys flesus* L.). Journal of Comparative Physiology, 149: 83-90.

TAGLIARI, K.C., VARGAS, V.M.F., ZIMIANI, K., and CECCHINI, R., 2004. Oxidative Stress Damage in the Liver of Fish and Rats Receiving an Intraperitoneal Injection of Hexavalent Chromium as Evaluated by Chemiluminescence. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17: 149–157.

THAKER, J., CHHAYA, J., NUZHAT, S., MITTAL, R., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1996. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dipes*. Toxicology 112: 237–244.

TORREBLANCA, A., RAMO, J.D., ARNAU, J.A. and DIAZ-MAYANS, J., 1989. Cadmium, Mercury and Lead Effect on Gill Tissue of Freshwater Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). Biological Trace Element Research, 21: 343-347.

VENUGOPAL, N.B.R.K., and REDDY, S.L.N., 1993. *İn vivo* Effects of Trivalent and Hexavalent Chromium on Renal and Hepatic ATPases of a Freshwater Teleost *Anabas scandens*. Environmental Monitoring and Assessment, 28: 131-136.

VİALE, G., and CALAMARI, D. 1984. Immune Response in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* After Long-term Treatment with Low Levels of Cr, Cd and Cu. Environ. Pollut. 35: 247-257.

VIARENGO, A., 1989. Heavy Metals in Marine Invertebrates. Mechanism of Regulation and Toxicity at the Cellular Level. Aquatic Sciences, 1 (2): 295-317.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1980. Effects of Zinc on Branchial ATPase Activity In Vivo in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 66: 77-82.

_____, 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.

WATSON, C.F., and BENSON, W.H., 1987. Comparative Activity of Gill ATPase in Three Freshwater Teleosts Exposed to Cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 14: 252-259.

WEBB, N.A., and WOOD, C.M., 2000. Bioaccumulation and Distribution of Silver in Four Marine Teleosts and Two Marine Elasmobranchs: Influence of Exposure Duration, Concentration, and Salinity. Aquatic Toxicology 49: 111-129.

WONG, C.K.C., and WONG, M.H., 2000. Morphological and Biochemical Changes in the Gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to Ambient Cadmium Exposure. Aquatic Toxicology, 48: 517–527.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretim ve lise-2'ye kadar öğrenimini Gaziantep'te, Lise-3'ü ise Adana'da tamamladı. 2004 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılı Şubat ayında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı.