ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek SAĞLAM

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cd, Cu) ETKİSİNDE KALAN TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA Na^+-K^+ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE İYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cd, Cu) ETKİSİNDE KALAN TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA Na^+-K^+ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE İYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek SAĞLAM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 09/08/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....

.....	.....	….....
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ	Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

…….	……..
Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ	Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI
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.6

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

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cd, Cu) ETKİSİNDE KALAN TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA Na^+-K^+ATPaz ENZİM AKTİVİTESİ VE İYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek SAĞLAM
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl: 2011, Sayfa**:** 79
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
:Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ
:Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI

Tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* farklı sertlik değerlerine sahip sularda, farklı sürelerde 1.0 µg/mL derişimindeki Cu^{+2} ve Cd^{+2}'nin etkisine ayrı ayrı bırakılmıştır. 0, 1, 7 ve 14 gün deney süreleri sonunda solungaç, bağırsak ve böbrek dokularında Na^+/K^+-ATPaz enzim aktiviteleri ile, total metal ve total iyon düzeyleri (Na^+, K^+, Ca^{+2}, Mg^{+2}) ölçülmüştür. Deney süresince Cu^{+2} etkisinde 7. günden itibaren balık ölümleri gözlenmiştir. Sert ve yumuşak sularda yaşayan balıklarda Na^+,K^+-ATPaz enzim aktivitesi en çok solungaç dokusunda etkilenirken, bunu sırasıyla böbrek ve bağırsak izlemiştir. Ayrıca enzim aktivitesi üzerinde Cd^{+2}, Cu^{+2}'ya göre daha etkili olmuştur. Deney süreleri sonunda dokularda metal birikimlerinin gözlendiği, özellikle de yumuşak sudaki balıkların bağırsak ve böbrek dokularında Cd^{+2} ve Cu^{+2} düzeyinde sert suya göre önemli bir artış olduğu kaydedilmiştir. Toplam iyon düzeyleri de suyun sertliği, metal türü ve doku tipine göre artış ya da azalış göstermiş ve iyon düzeyi $Mg^{+2} > K^+ > Na^+ > Ca^{+2}$ şeklinde sıralanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPaz, Su sertliği, İyon

ABSTRACT
MSc THESIS

DETERMINATION OF Na^+-K^+ATPase ACTIVITIES AND ION LEVELS IN TISSUES OF FRESHWATER FISH *Orochromis niloticus* EXPOSED TO METALS IN WATERS WITH DIFFERENT HARNESSES

Dilek SAĞLAM
DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year: 2011, Page: 79
Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Assoc. Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Asst. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ
: Asst. Prof. Dr. Gülüzar ATLI

Freshwater fish *Oreochromis niloticus* were individually exposed to 1.0 µg/mL concentrations of Cu^{2+} and Cd^{2+} at different exposure durations in waters with different hardnesses. At the end of the exposure periods (0, 1, 7 and 14 days) Na^+/K^+-ATPase activities, total metal and ion levels in the gill, kidney and intestine were measured. Fish mortality was observed after Cu^{2+} exposure beginnig from 7^{th} day during the experiments. Na^+/K^+-ATPase activity was affected mostly in the gill exposed to soft and hard water and this was followed by kidney and intestine. In addition, Cd^{2+} was appeared to be more effective on Na^+/K^+-ATPase activity than Cu^{2+}. At the end of the experimenal protocol, total Cu^{2+} and Cd^{2+} levels accumulated significantly especially in the kidney and intestine following soft water exposures. Total ion levels also increased or decreased depending upon the hardness of water, metal species and tissue type and ordered as ion levels are $Mg^{2+} > K^+ > Na^+ > Ca^{2+}$.

Keywords: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPase, Hardness, Ion

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince fikir ve görüşleriyle desteğini eksik etmeyen ve yol gösterici olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte çalışmalarımda bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu süre içerisinde dostluğu ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım İpek DELİL, Emine BAYSOY, Ceren GÜRLER, Ali EROĞLU, Zehra DOĞAN ve tüm diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan sevgili annem Nezihe SAĞLAM ve babam Muzaffer SAĞLAM'a son olarak da benim hayat boyu destekçim olan eşim Osman ARSLAN'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 Bakır.....3
1.2. Kadmiyum.....4
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri.....5
1.4. İyonlar 7
1.5. Su Sertliği.....8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....15
3.1. Materyal.....15
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....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 Ekipmanlar.....16
3.2. Yöntem.....16
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı.....17
3.2.2. Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesinin Ölçümü.....18
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini.....19
3.2.4. Toplaml Protein Analizi.....21
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması.....24
3.2.6. Metal ve İyon Analizleri.....24
3.2.7. Metal Derişiminin Hesaplanması.....25
3.2.8. İyon Derişiminin Hesaplanması.....27

3.2.9. İstatistik……....29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....31
4.1. Bulgular.....31
4.1.1. ATPaz Aktivitesi……..…….....31
4.1.1.1. Kontrol Balıklarda ATPaz Aktivitesi……..…….31
4.1.1.2. Bakır Etkisinde ATPaz Aktivitesi…….....35
4.1.1.3. Kadmiyum Etkisinde ATPaz Aktivitesi……..…….39
4.1.2. Metal Birikimi……..…….....43
4.1.2.1.Bakır Etkisinde Metal Birikimi…….……43
4.1.2.2. Kadmiyum Etkisinde Metal Birikimi…….……..44
4.1.3. İyon Düzeyleri……..……....46
4.1.3.1. Bakır Etkisinde İyon Düzeyleri……..……..46
4.1.3.2. Kadmiyum Etkisinde İyon Düzeyleri…….……..47
4.2. Tartışma.....57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....65
5.1. Sonuçlar.....65
5.2. Öneriler.....65
KAYNAKLAR.....67
ÖZGEÇMİŞ.....79

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Dokularda en yüksek Na^+-K^+ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü optimum ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri……18

Çizelge 4.1. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%)değişimleri……43

Çizelge 4.2. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri……45

Çizelge 4.3. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^+ düzeyleri……....49

Çizelge 4.4. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde K^+ iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri……..50

Çizelge 4.5. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Na^+ düzeyleri……...51

Çizelge 4.6. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Na^+ iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri……..52

Çizelge 4.7. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+2} düzeyleri……53

Çizelge 4.8. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Mg^{+2} iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri……..54

Çizelge 4.9. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+2} düzeyleri…….55

Çizelge 4.10. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Ca^{+2} iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri……56

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 Na^+ ve K^+ iyonlarını taşıma mekanizması..……..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 …….....23
Şekil 3.3. Cu^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……...26
Şekil 3.4. Cd^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……..26
Şekil 3.5. Na^+ derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki …….....27
Şekil 3.6. K^+ derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki …….....27
Şekil 3.7. Mg^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……..28
Şekil 3.8. Ca^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……...28
Şekil 4.1. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi ...…… 32
Şekil 4.2. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ ATPaz aktivites……..33
Şekil 4.3. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi ...……..34
Şekil 4.4. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu^{+2}/mL'nin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine etkisi …….36
Şekil 4.5. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu^{+2}/mL'nin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine etkisi …….37
Şekil 4.6. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu^{+2}/mL'nin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine etkisi …….38
Şekil 4.7. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd^{+2}/mL'nin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine etkisi …….40
Şekil 4.8. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd^{+2}/mL'nin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesine etkisi ……41

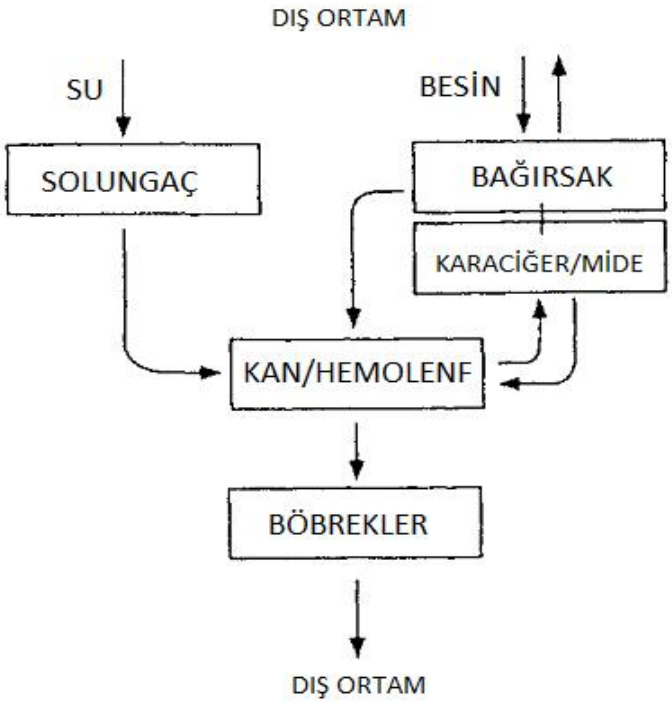
Şekil 4.9. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd^{+2}/mL'nin Na^{+}-K^{+} ATPaz aktivitesine etkisi ……42

1. GİRİŞ

Günümüzde çevreye verilen toksik maddeler, bazı bölgelerde doğal ekolojik dengeyi bozacak düzeye ulaşmıştır. Antropojenik aktivitenin yoğun olduğu kentsel alanlardan ve çeşitli endüstri kuruluşlarından ortama yayılan toksik maddeler, çevre kirliliğine neden olmaktadır. Meydana gelen bu kirliliğin önemli kaynaklarından birini de ağır metaller oluşturmaktadır (ATSDR, 2006). Ağır metallerden çinko, bakır, civa, kadmiyum, gümüş ve benzeri metaller kirleticilerin büyük bir bölümünden sorumlu olan önemli bir gruptur. Toprak erozyonu ve volkanik olaylar gibi doğal faaliyetler ile endüstriyel, kentsel ve tarımsal aktiviteler gibi insan kaynaklı faaliyetlerin bir sonucu olarak toksik maddelerin sucul ortamdaki düzeyleri artmaktadır. Böylece hidrolojik döngüdeki suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri olumsuz yönde değişebilmektedir (Almeida ve ark., 2001).

Özellikle son yıllardaki endüstriyel gelişmeler sucul ortamların ağır metaller tarafından kirletildiği ve bu kirlenmenin besin zincirine de yansıdığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Su ve besinler ile bünyeye alınan ağır metaller canlılarda birikerek tüm yaşam aktivitelerine zarar verebilme ve değiştirebilme potansiyeline sahiptirler (Heath, 1987; Hu, 2000). Yapılan araştırmalar ağır metallerin sucul organizmaların biyolojik özelliklerini bozabildiğini hatta ölümlerine neden olabildiklerini göstermiştir. Ayrıca dokularda birikme özellikleri olması nedeniyle, besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşıp, insanlarda da ciddi sağlık sorunlarına yol açabildikleri görülmüştür (Heath, 1987).

Su ortamında kirleticilerin bulunması, birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri meydana getirdiğinden balıklar için çok önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ariyoshi ve ark., 1990). Balığın biyolojik sistemlerinde Hg^{+2} ve Cd^{+2} gibi metallerin rolü bilinmezken, Cu^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2} gibi ağır metallerin balık metabolizması için gerekli olduğu bilinmektedir. Dokulardaki metal birikiminde, metallerin sudaki derişimleri ve etki süreleri ile tuzluluk, sıcaklık, pH ve sertlik gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark., 2007; Atli ve Canli, 2008).



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

Metabolizma için gerekli olan metaller organizmanın bulunduğu ortamdan doğrudan ya da besinle organizmaya girebilirler. Dolaşım sistemi tarafından emilimlerinin ardından metaller normal metabolizmada kullanıldıkları, atıldıkları veya alı kondukları özgün organlara taşınmaktadırlar. Balıklarda ağır metallerin doku ve organlarda etkisi ve birikimi metalin alınım yoluna, derişimine ve metalin etkisinde kalma süresine bağlı olarak değişim göstermektedir (Campana ve ark., 2003).

Balıklar ortamdaki ağır metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Simkiss ve Taylor, 1989; Viarengo, 1989). Balıkta akut etki sonucu en fazla hasar gören organın solungaç olduğu düşünülmektedir. Balıklarda solungaç, gaz alış verişi, asit baz dengesi, iyon (Na^+, Cl^- ve Ca^{+2}) taşınması ve azotlu atıkların atımında görev alan çok fonksiyonlu

bir organdır. Karaciğer, dalak ve böbrek ise, su veya besin kaynaklı uzun süreli metal etkisinde zarar gören organlardır (Olsvik ve ark., 2001).

Solungaçlar sekonder lamellerin bulunduğu bir çift primer filament içeren 4 çift solungaç yayından oluşmuştur. Filament ve lameller, kan damarları ile desteklenen klorid hücreler ve mukus hücreleri gibi epitelyal hücreleri içermektedir. Böylece solungaç epitelyumu iyon taşınması ve gaz alış verişini kolaylaştırmak için dış ortamla etkileşecek geniş bir yüzey alanı sağlar. Buna karşılık çok sayıda kılcal damara sahip olması nedeniyle epitelyum aynı zamanda toksik maddeler için birincil hedef olmaktadır (Watson ve Benson, 1987; Wong ve Wong, 2000; Garcia-Santos ve ark., 2006). Solungaçlar balık ve su arasındaki ilişkiyi sağlayan organ olması bakımından çok önemlidir ve balığın vücudunu örten deriden 10-60 kez daha geniş bir yüzeye sahiptir (Flik ve Verbost, 1993).

1.1. Bakır

Bakırın, pestisit üretiminde, gübre, elektrik kaplama sanayinde, boya yapımında, demir-çelik ve madencilikte kullanımı sonucu su ortamındaki düzeyi artmıştır. IB gurubuna dahil olan bakır, sucul hayvanlarda toksik etkileri yüksek olan bir elementtir. Bakır hücresel fonksiyonların sürdürülebilmesi ve azot, oksijen ve sülfür gruplarınca zengin birçok enzimin yapısında bulunması nedeniyle canlıların gereksinim duyduğu bir iz elementtir. Yüksek düzeylerde doğrudan protein denatürasyonuna, dolaylı olarak ise reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturması nedeniyle toksik etki göstermektedir (Basha ve Rani, 2003; Liu ve ark., 2006). Bakırın subletal derişimlerinin balıklarda büyüme, gelişme ve üreme üzerine olumsuz etkiler yaptığı bir çok araştırıcı tarafından belirtilmiştir (Buckley ve ark., 1982; Hilmy ve ark., 1985).

Bununla birlikte sucul organizmalarda Na^+ dengesinde bozukluklara, indirgenmiş plazma ozmolaritesi, Na^+ ve Cl^- derişimlerine neden olması da bu metalin ozmoregülatör toksikant olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Stagg ve Shuttleworth, 1982). Bu etki, solungaç epitelyumun bazolateral membranında bulunan Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak solungaç düzeyinde

iyon alımının azalması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bu etkinin genellikle Cu^{+2} birikimine bağlı solungaçlardaki yapısal ve fonksiyonel hasarla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Li ve ark., 1998).

Atli ve Canli (2007), Cu^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin önemli ölçüde inhibe olduğunu, buna karşılık alkalen fosfataz aktivitesinin ise artış gösterdiğini bulmuşlardır.

1.2. Kadmiyum

Kadmiyum her bölgede bulunabilen ve ağır metaller arasında toksik etki bakımından ilk sıralarda yer alan önemli bir metaldir. Kadmiyumun endüstride kullanılmasıyla çevre kirliliği önemli derecede artmıştır (Ravera, 1984). Tatlı sularda, Cd^{+2} 0.1 μg/L'den küçük derişimlerinde bulunurken, insan kaynaklı atıkların karışabildiği su ortamlarında ise bu değer birkaç μg/L veya daha yüksek düzeylere çıkabilmektedir (USEPA, 2001; Garcia-Santos ve ark., 2006). Cd^{+2}, toksik etki göstermesi, çevrede yaygın dağılımı ve düşük düzeylerde bile organizmalarda yan etkilere yol açması nedeniyle çevre çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Ayrıca Cd^{+2} etkisinin karaciğer, beyin, sinir sistemi, böbrek, dalak ve kemikte patolojik lezyonlara neden olduğu bilinmektedir (Almeida ve ark., 2002).

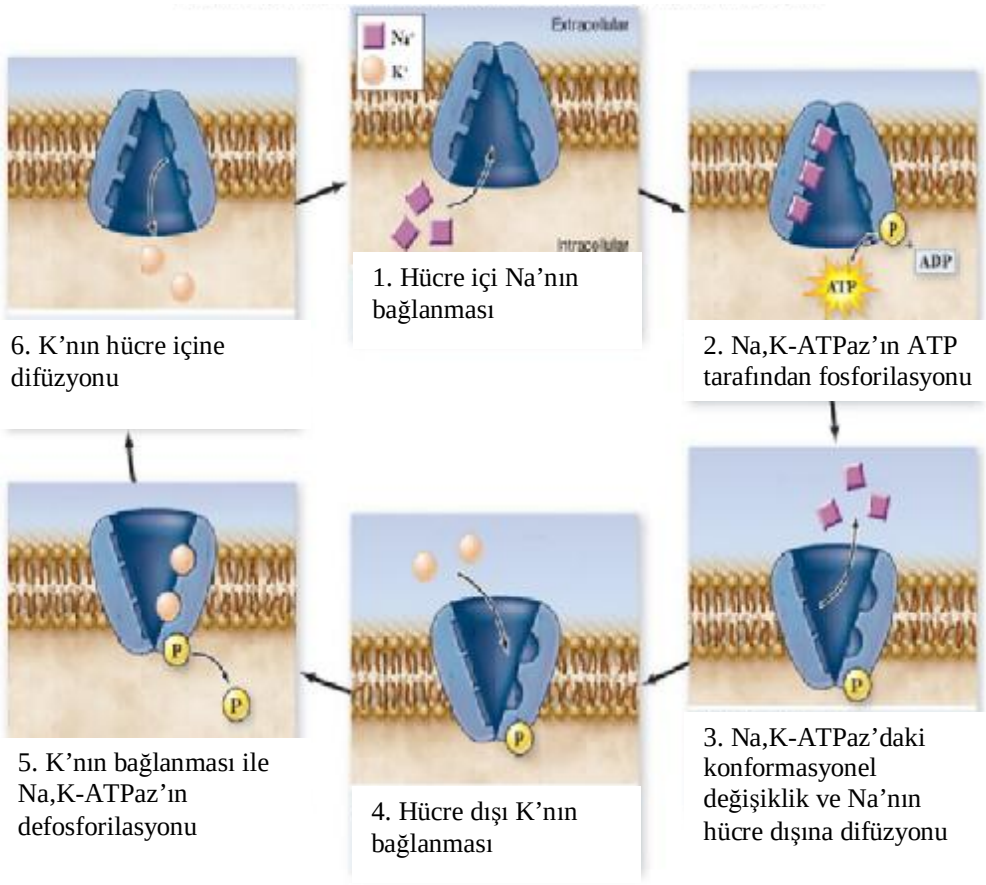
Cd^{+2} balıkta yavaş bir şekilde birikim göstermekle birlikte, karaciğer ve böbrek en önemli hedef organlardır. Cd^{+2}, Na^{+}/K^{+}- ATPaz gibi solungaçlarda iyon taşınmasında görev alan enzimleri inhibe ederek solungaçlarda iyon geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (De la Torre ve ark., 2000; Silvestre ve ark., 2005). Cd^{+2} bağırsaktan absorbe edilerek depo bölgelerine öncelikle de karaciğere taşınmaktadır. Karaciğerde Cd^{+2} metallothioneine bağlanmakta ve bu kompleks böbreklere taşınmaktadır.

Kadmiyum etkisinde kalmış balıkların vücut yüzeylerinde mukus salgısı ve solungaçlardaki mukus hücrelerinin sayısında bir artış meydana gelmektedir (Gardner ve Yevich, 1970). Kadmiyum plazmadaki sodyum, potasyum ve klor seviyelerini düşürmektedir ve çinko ATPaz enzimleri üzerinde olumsuz etkiler yapmaktadır (Larsson ve ark., 1981).

1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri

Zar proteinleri iyon taşınması, lipit biyosentezi ve oksidatif fosforilasyonu gibi hücre zarının birçok biyolojik aktivitesinden sorumludur. Zar enzimleri veya zar proteinlerinin zardaki fizyolojik ve kimyasal değişikliklere neden olan sıcaklık veya diğer etkenlere duyarlı olduğu belirtilmiştir. 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).

ATPaz'lar hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan ve toksisitede duyarlı zara bağlı bir grup enzimdir. Dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, membran geçirgenliği üzerinde ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz'ların metal etkilerine oldukça 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). Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'lar; iyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar arasında yer almaktadır. 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). Kemikli balıkların solungaçlarında elektrolitlerin aktif taşınmalarında görev alan solungaç ATPaz enzimlerinin metal etkisine farklı tepkiler verdiği belirtilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Atli ve Canli, 2007).



Şekil 1.2. Na,K-ATPaz'ın Na ve K iyonlarını taşıma mekanizması.

Skou (1957) tarafından bulunan membrana bağlı Na^+/K^+-ATPaz enzimi, 3:2 oranında Na^+'yı hücre dışına, K^+'yı ise hücre içine taşır. 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. Na^+/K^+-ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup α (100 kDa) ve β (60 kDa) alt ünitelerinden oluşan heterodimerik integral membran proteinidir. Kardiyak glikoziti olan ouabain Na^+ ve K^+ taşınmasını katalizleyen Na^+/K^+-ATPaz enzimini inhibe etmektedir (Periyasamy ve ark., 1983).

Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. 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 gözlemişlerdir. Buna karşın, Atli ve Canli (2007) farklı derişimlerdeki Cd^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin azalmasına karşın, yüksek Pb^{+2} derişimi etkisinde ise solungaç enzim aktivitesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Birçok balık türü, tuzluluk ve sertlik gibi suyun fizikokimyasal özelliklerindeki değişikliklere bağlı olarak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde değişiklikler göstermektedir (Rathor ve Khangarot, 2003).

1.4. İyonlar

İyon akışının düzenlenmesi, iyonik ve osmotik homeostazisinin dengelenmesi ile ilişkilidir. Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+-ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Tek değerlikli serum iyon derişimleri, fazla miktarda Na^+/K^+-ATPaz enzimlerine sahip klorit hücrelerin bulunduğu solungaç dokusu ile düzenlenmektedir (Guynn ve ark., 2002). Epitelden Na^+, iyon kanalları veya protein taşıyıcı (kolaylaştırılmış difüzyon) ile dış ortamdan hücre içerisine geçmektedir. Na^+'nın hücreden kana geçişi ise elektokimyasal gradiente karşı bazolateral Na^+ pompası Na^+/K^+-ATPaz enzimi tarafından yürütülmektedir (Handy ve ark. 2002). Divalent metal katyonları Mg^{+2} ve Ca^{+2} ise hücre membranı bütünlüğü, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan iyonlardır ve hücre dışı ortamdaki eksiklikleri solungaç geçirgenliğinde azalmalara neden olmaktadır (Watson ve Beamish, 1980, 1981). Kemikli balıklarda, Ca^{+2}'nin büyük bir oranı kemikler dışında deri ve iskelette depolanmaktadır (Berntssen ve ark., 2003). Tatlı su balıkları Ca^{+2} homeostazisini Ca^{+2}-ATPaz ve Na^+/Ca^{+2} değişimi ile aktif olarak bağırsaktan ve solungaçtan Ca^{+2} absorpsiyonu ile düzenlemektedir. Na^+/Ca^{+2} değişimi ise Na^+ gradientine bağlı Na^+/K^+-ATPaz ile sağlanmaktadır.

Günümüzde sucul organizmaların kirleticilerle indüklenen biyokimya ve fizyolojilerindeki değişiklikler, çevre sağlığının değerlendirilmesinde belirleyici araçlar olarak kullanılabilmektedir. Biyokimyasal değişiklikler ise kimyasalların sucul ekosistemlere olan etkilerini gözlemlemede hızlı ve duyarlı sonuçlar sağladığından çevre sağlığı için etkili belirteçler olarak düşünülmektedir.

Evrim sürecindeki önemli konumları, çeşitli habitatlara adapte olmaları, insanlar için önemli bir besin kaynağı oluşturmaları nedeniyle balıklar biyolojinin çeşitli disiplinlerinin dikkatini üzerine çekmiştir. Balıklar omurgalılar arasında metalleri hem sudan hem de besin yoluyla almaları açısından önemlidir (Bury ve ark., 2003). Nil çuprası *Oreochromis niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuarda çalışılması ve toksikolojik araştırmalarda kirleticilere verdiği tepkilerden dolayı iyi bir biyolojik modeldir (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). Günümüzde balığın çevresel strese tepki olarak gösterdiği fizyolojik mekanizmaların anlaşılmasına gösterilen ilgi giderek artarken, çevresel kimyasallara karşı biyolojik tepkilerin çalışılmasında uygun belirteçlerin kullanımı çevre kalitesinin değerlendirilmesinde anlam kazanmaktadır.

1.5. Su Sertliği

Ağır metaller sert suya nazaran yumuşak suda daha toksiktir, çünkü bu metaller yumuşak suda daha fazla çözünür ve bilindiği gibi ağır metallerin çözünmüş formları aktif toksik ajanlardır (Rathor ve Khangarot, 2003).

Birçok ağır metal sert suda daha az toksik hale gelir. Su sertliği sucul organizmalar üzerine ağır metallerin toksik etkilerini değiştirebilir (Kim ve ark, 2001). Genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesi organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için yarışmasından dolayı azalır (Javid ve ark, 2007; Kim ve ark, 2001; Pyle ve ark, 2002). Doğal ortamda Ca^{+2} ve Mg^{+2} ağır metallerden daha fazla oranda bulunur. Ca^{+2} konsantrasyonu azaldıkça metal iyonların solungaç membranlarından pasif geçişi artar. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının

hücre membranlarından alımı dengenin sağlanmasına neden olur ve bu durum metal iyonlarına karşı geçirgenliği azaltır (Kim ve ark, 2001; Penttinen ve ark, 1998)

Su sertliği bilindiği gibi balıklar üzerine ağır metallerin toksik etkilerini azaltmaktadır. Metal toksisitesi genellikle solungaç epitelyumlarındaki Ca^{+2} kanallarının yarışmalı olarak bloke olması yoluyla balıklarda aktif Ca^{+2} transferinin bozulması ile ilgilidir. İyon regülasyonlarının eşik şiddetinde bulunan balıklar yumuşak suda Ca^{+2} eksikliğinden dolayı tehlikededirler. Çevre metalleri ozmotik bütünlükteki düzenden ve yapısal zararlardan dolayı Ca^{+2} iyonlarının yerini solungaç yüzeylerinin negatif yüklenmiş kısımlarına doğru değiştirir (Ebrahimpour ve ark, 2010).

Perschbacher ve Wurts (1999) su sertliğinin kedi balığında (***Ictalurus punctatus***) Cu^{+2} toksisitesini minimum düzeyde etkilediğini gözlemlemiştir. Bu durum ise sertliğin 50-100 mg/L $CaCO_3$ düzeyinde artması ile toksisitedeki azalmanın sadece 1.3 kat olmasına bağlanmıştır. Su sertliğinin Cu^{+2} ve Zn^{+2} toksisitesi üzerinde önemli etkisi vardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre su sertliği ne kadar artarsa balıkların Cu^{+2} ve Zn^{+2}'ye karşı toksisite hassasiyetleri o kadar azalır. Cu^{+2} konsantrasyonu 2 mg/L olan yumuşak suda ölüm oranı % 100 iken sert suda bu oran % 16 olup çok sert suda ise ölüm gözlenmemiştir. Cu^{+2} konsantrasyonu 16 mg/L olan sert suda ölüm oranı % 100 iken çok sert suda bu oran % 77 'dir (Ebrahimpour ve ark, 2010).

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lauren ve McDonald (1987), gökkuşağı alabalığı *S. gairdneri*'de 28 günlük 55 µg Cu^{+2}/L etkisine bakmışlardır. Cu^{+2} birikiminin yanında solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 24 saat içerisinde % 33 inhibe olduğunu gözlemişlerdir.

Li ve ark. (1998), 3.2 mM Cu^{+2} etkisindeki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 28. gün sonunda yapısal değişikliklerle birlikte klorit hücre sayısında farklılık gözlemişlerdir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ve plazma Na^{+} düzeyinin Cd^{+2} etki süresi ile azalış gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile solungaç Cu^{+2} içeriği arasındaki ters orantının, enzimin Cu^{+2} inhibisyonuna oldukça duyarlı olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Ay ve ark. (1999), *Tilapia zillii*'nin Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin (0.5-4.0 mg/L) 14 günlük etkisi sonucunda kas, solungaç ve karaciğer dokularında Cu^{+2} ve Pb^{+2}'nin birikim gösterdiğini buna karşın, kas dokusunda Cu^{+2} düzeyinin kontrole göre farklı olmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin her iki metal etkisinde inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir.

De la Torre ve ark. (2000), *Cyprinus carpio*'yu 1.6 mg Cd^{+2}/L'nin 14 günlük etkisine bırakmalarının ardından balıkları Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün süreyle bekletmişlerdir. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi etki sonunda % 30 düzeyinde azalırken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 70 artış göstermiştir. Subletal Cd^{+2} etkisinin sazanda osmotik ve iyonik dengeyi sağlayan solungaç enzimlerini önemli ölçüde değiştirerek strese neden olduğu bildirilmiştir.

McGeer ve ark. (2000), *O. mykiss*'i Cd^{+2} (3 mg/L), Cu^{+2} (75 mg/L) ve Zn^{+2}'nin (250 mg/L) 100 günlük etkisine bırakmışlardır. Deney sonunda metallerin iyon dengesi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine olan etkilerini incelemişlerdir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin Cu^{+2} etkisinde artış gösterdiği ve tüm vücuttaki Na^{+} ve Ca^{+2} düzeylerinin 2 gün içerisinde bozulduğunu gözlemişlerdir. Cd^{+2} etkisinde Ca^{+2} kaybının daha uzun süreli olduğu ve fizyolojik tepkilerin Cu^{+2} etkisinde metabolik gereksinimle ilişkili mekanizmaları içerdiği belirtilirken, kronik Cd^{+2} etkisinin ise uzun süreli metabolik gereksinimle ilişkili olmadığı gösterilmiştir.

Grosell ve ark. (2004), 12.8 ve 55.2 µM Cu^{+2}'nin 30 günlük etkisi sonrasında deniz balığı *Opsanus beta*'da metal birikimi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine incelemişlerdir. Araştırıcılar, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde solungaç ve böbrek dokusundaki Cu^{+2} birikimine karşın inhibisyon gözlememişlerdir.

Monteiro ve ark. (2005), 40 ve 400 µg/mL Cu^{+2} etkisinde bırakılan tatlı su çuprası *O. niloticus*'da 3, 7, 14 ve 21 gün süreyle solungaç dokusunda Cu^{+2} birikimi ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Solungaçlarda Cu^{+2} düzeyinin Cu^{+2} derişimi ve etki süresi ile doğrusal olarak artmasına karşın, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 3. gün sonunda Cu^{+2} düzeyi ile ters orantılı olarak azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen veriler, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin iyon plazma düzeylerine göre uzun süreli metal etkilerinde daha hızlı tepki verdiğini vurgulanmıştır.

Garcia-Santos ve ark. (2006), *O. niloticus*'u 5 ve 25 mg Cd^{+2}/L etkisine 24, 48 ve 96 saat süreyle bırakmışlardır. Deney sonunda plazma Na^{+} düzeyi değişiklik göstermezken, Ca^{+2} düzeyi uygulanan doza bağlı olmaksızın azalmış ve solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ise değişiklik göstermemiştir.

Hoyle ve ark. (2007), besin yoluyla Cu^{+2}'nin (1500 mg Cu^{+2}/kg k.a.) 30 günlük etkisine bırakılan kedibalığı *Clarias gariepinus*'un bağırsak, karaciğer ve solungaç dokularında Cu^{+2} düzeyini incelemişlerdir. Bu sürenin sonunda Cu^{+2} düzeyi sırasıyla 20, 5 ve 4 kat artmış ve doku Na^{+}, K^{+} düzeyi ile Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde az miktarda değişiklik olmuştur.

Atli ve Canli (2007), *O. niloticus*'un 14 gün süreyle 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki metal (Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}) etkilerinin ardından solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi solungaçta 20 µM Pb^{+2} etkisinde artış göstermesinin dışında bütün metal etkilerinde inhibe olmuştur. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olmuştur. Bu çalışma ile 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.

Craig ve ark. (2007), 7 gün süreyle yumuşak suya adapte edilen zebra balığı *Danio rerio*'da çeşitli biyokimayasal parametrelerle birlikte Na^{+}-K^{+}ATPaz

aktivitesini sert suda yaşayan balıklarla karşılaştırmışlardır. Yumuşak suda iyon düzeyleri sert suya göre önemli düzeyde azalırken, tüm vücuttaki iyon düzeylerinde önemli bir fark gözlenmemiştir. Buna karşılık, araştırıcılar solungaç Na^{+}-K^{+} ATPaz aktivitesinin yumuşak suda 3. güne kadar önemli düzeyde artışının ardından 7. güne kadar sert sudaki düzeyine yaklaştığını belirtmiş ve elde ettikleri verilerin balıktaki iyon düzenleyici mekanizmaların işleyişini anlamada yol gösterici olabileceğini kaydetmişlerdir.

Ebrahimpour ve ark. (2010), 40, 150 ve 380 mg $CaCO_3$/L sertlik düzeylerine sahip sularda Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin toksisitesinin *Capoeta fusca*'ya etkisine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre suyun sertliği arttıkça metallerin toksik etkilerinde azalış gözlemiş başka bir deyişle, Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin sert suya göre yumuşak suda çok daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Mansouri ve Baramaki (2011), farklı sertlik düzeyine sahip sulara adapte edilen (0.118, 0.154 ve 0.180 mg/L) balık *Capoeta fusca*'da akut Hg^{+2} toksisitesini incelemişler ve artan su sertliği ile Hg^{+2} toksisitesinin azaldığını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

3.1.1.1. Metaller ve Asitler

Bakır klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$, Merck)
Kadmiyum klorür monohidrat ($CdCl_2.H_2O$, Merck)
Trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$, Merck)
Nitrik asit (HNO_3 % 65, Merck)
Perklorik asit ($HClO_4$ % 60, Merck)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Trizma-Base (Tris [hidroksimetil]aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)
Sukroz (α-D-Glukopiranozil β-D-fruktofuranosid; $C_{12}H_{22}O_{11}$, Sigma)
EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)
Sodyum klorür (NaCl, Merck)
Potasyum klorür (KCl, Merck)
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$, Merck)
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$, Merck)
Polioksietilen 10 Lauril eter (Sigma)
Amonyum molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck]
Sülfirik asit (H_2SO_4 % 98, Merck)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Merck)
Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP, Sigma)
Ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Merck)
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: Cecil 5000 series
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi: Perkin Elmer 3100-SpectrAA 220 FS
Derin dondurucu (- 80 ^oC): Revco Ultima II
Hassas Terazi: Sartorius Analytic A 200S
Santrifüj: Sigma 2-16 K
Homojenizatör: Janke & Kunkel Ultra Turrax T25
Su Banyosu: nüve BM 101
pH metre: Hanna HI 8314 membran pH metre
Manyetik Karıştırıcı: Janke & Kunkel IKAMAG RH

3.2. Yöntem

Bu araştırmada kullanılan *O.niloticus*'lar Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuara getirildi. Balıklar 4 ay süre ile 40 x 40 x 100 cm boyutlarındaki 120 L çeşme suyu içeren akvaryumlar içerisinde 20 $^0C\pm1$ sıcaklığında ve 12 saat aydınlanma periyodu uygulanan laboratuar koşullarına adaptasyonları sağlandı.

Deney sırasında akvaryumlardaki sert ve yumuşak su ortamının kalitesini belirlemek amacıyla çoklu ölçüm cihazıyla (Thermo Orionstar 5) ölçümler yapıldı. Sert su olarak çeşme suyu, yumuşak su olarak ise Pınar Çamlıca marka hazır su

kullanıldı. Sert suyun bulunduğu akvaryumlardaki oksijen (5.3 ± 0.83 mg/L), pH (8.3 ± 0.08), toplam sertlik (304.2 ± 21.2 µg $CaCO_3$/mL) ve iletkenlik (5.8±17.78 mS) değerleri ölçüldü. Yumuşak suyun bulunduğu akvaryumlardaki oksijen miktarı 5.5±0.55 mg/, pH 8.58±0.13 , toplam sertlik 61.4± 3,5 µg $CaCO_3$/Ml, iletkenlik ise 1.77±15.57 olarak ölçüldü.

Balıklar günde bir kere ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) verilerek beslendi. Bu balık yemindeki mikro elementlerin miktarları 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 ve 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. Akvaryum suları 2 günde bir olmak üzere dinlendirilmiş ve çeşme suyu kullanılarak değiştirildi.

Balıklar 6 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda kadmiyum ($CdCl_2.H_2O$) ve bakır ($CuCl_2.2H_2O$) 1.0 µg/mL derişimlerinin etkisine 1, 7 ve 14 gün olarak üç farklı zaman diliminde metal etkisinde bırakıldı. Metallerin akvaryum tabanına çökmesini önlemek amacıyla trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) kullanıldı. 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 değiştirildi ve metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verildi.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Belirlenen her sürenin sonunda balıklar çeşme suyu ile iyice yıkandıktan sonra ve kurutma kâğıdı ile yüzeylerinde bulunan su damlacıkları alınmıştır. Balıklar spinal yapılarak öldürüldükten sonra boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçüldü. Balıkların ortalama boy (12,7±1,4 cm) ve ağırlıklarının (28,0±8,7 g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlendi ($P>0.05$). Steril aletler kullanılarak solungaç, böbrek ve bağırsak dokuları alındı ve

tartımı yapılan dokular uygun paketlemeler yapılarak homojenize edilinceye kadar -80 ^{0}C'de saklandı.

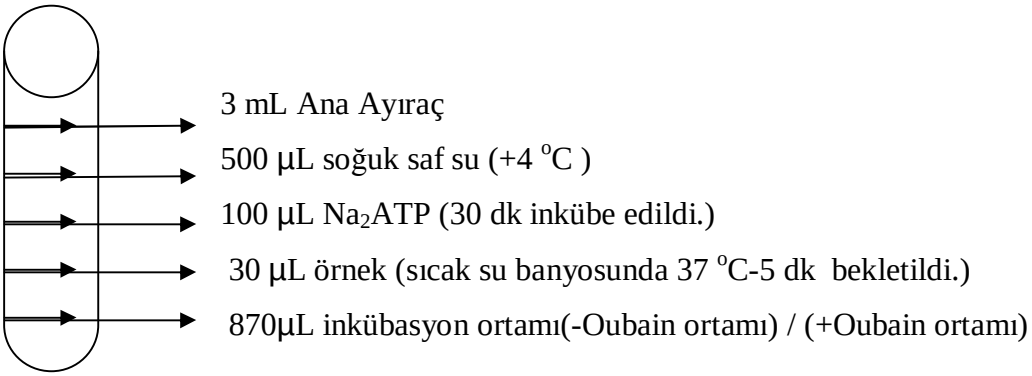
Dokular ağırlıklarının 1/10'u oranında homojenizasyon tamponu (250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base, 1 mM EDTA (pH 7.8)) ile 9500 rpm'de birkaç dk süreyle buz üstünde homojenize edildi. Ependorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13.000 g'de 20 dk (4 ^{o}C) santrifüj edildi ve elde edilen supernatantlar enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanılmak üzere ependorf tüplerine aktarılarak buz üzerinde saklandı.

3.2.2. Na^{+}–K^{+} ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

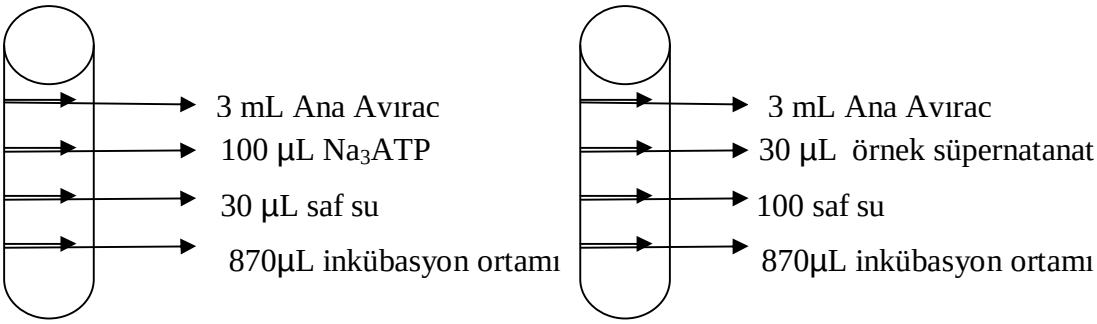
Na^{+}–K^{+} ATPaz aktivitesinin ölçüldüğü inkübasyon ortamının optimum koşulları laboratuarımızda önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Atlı 2009) (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Dokularda en yüksek Na^{+}–K^{+} ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü optimum 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



-Ouabain Örneği / +Ouabain Örneği



Örnek körü **ATP körü**

Na^{+}–K^{+} ATPaz aktivitesi, ouabain içermeyen tüplerin aktivitesinden (Toplam-ATPaz), ouabain içeren tüplerin aktivitesinin (Mg^{+2}-ATPaz) çıkarılması ile hesaplandı. ATPaz aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. olarak verildi.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

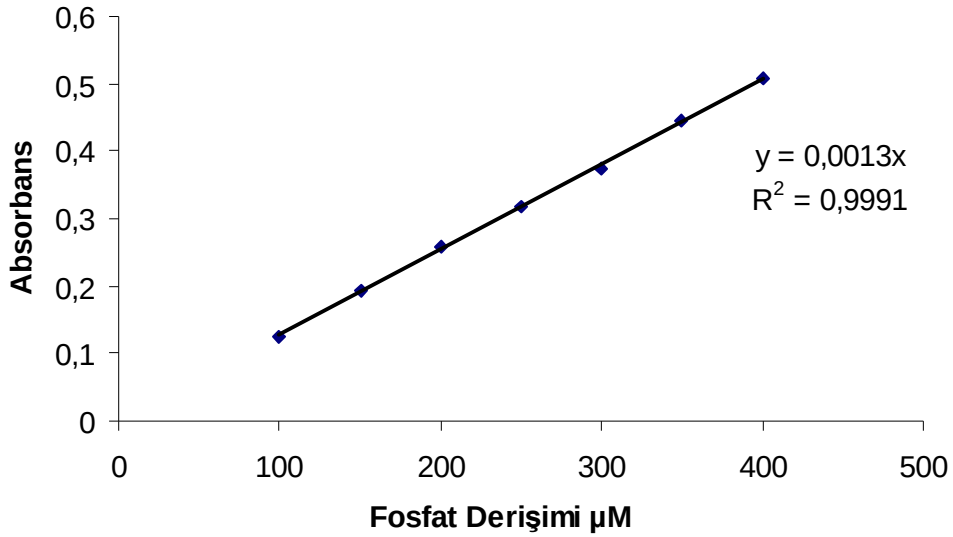
İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan Pi'nin Polioksietilen 10 Lauril eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark, 1973).

İnorganik fosfat tayini için kullanılacak olan ayıraçların hazırlanması aşağıda verilmiştir.

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g Polioksietilen eter tartıldı ve saf su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ^{0}C'de 30-40 dk bekletildi.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözüldü.
3. Ana ayıraç: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Atkinson ve ark (1973) kullandığı yönteme dayanarak tüplerde açığa çıkan inorganik fosfat miktarı, son hacmi 1,5 mL olan tüplerin üzerlerine 3 mL ana ayıraç (polioksietilen 10-lauril eter, amonyum molibdat karışımı) konulduktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Tüplerde oluşan sarı rengin absorbansı 390 nm'de okundu.

Sonuçların kantitatif değerlendirilebilmesi 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi.



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Toplam Protein Analizi

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

Lowry metodu; proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarları tespit edilir.

Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfomolibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi renk verirler. Bu metod ile, proteinler önce alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini oluşturur, daha sonra ortama Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiğinde bakır-protein kompleksi, tirozin ve triptofan kökleriyle birleşir.

Ayıraçlar:

1. Ayıraç A: % 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde). 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0.1 N NaOH içinde çözünmesi sağlandı.
2. Ayıraç B1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. Ayıraç B_2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
4. Ayıraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B_1 ve B_2.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1.5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mg/mL bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlandı.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması şu şekilde yapılmaktadır.

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 = 400 µg : 0.4 mL stok bovin albumin + 0.6 mL distile su

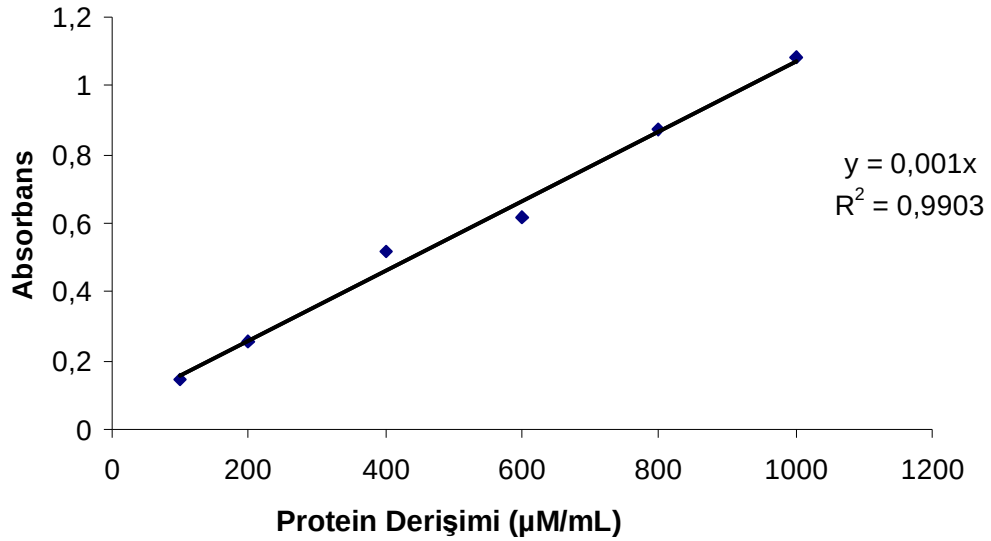
Standart 4 = 600 µg : 0.6 mL stok bovin albumin + 0.4 mL distile su

Standart 5 = 800 µg : 0.8 mL stok bovin albumin + 0.2 mL distile su

Standart 6 = 1000 µg : 1.0 mL stok bovin albumin

Daha sonra uygun seyreltmeler yapılarak son derişimlerin 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL olması sağlandı. Hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0.3 mL alınarak örnek tüplerine konuldu ve bunun üzerine 3 mL ayıraç C eklenerek çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilen tüplerin üzerine 0.3 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi konularak iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk daha bekletildi. Oluşan mavi renkli kompleks, 750 nm dalga boyunda su körüne karşı okundu.

O. niloticus dokularında total protein düzeyini belirlemek için stok serum bovin albumin çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak elde edilen standart derişimlerine karşılık gelen absorbans değerleri aracılığıyla çizilen regresyon eğrisinden elde edilen regresyon eşitliği y =0,0012x olarak bulunmuştur (Şekil 3.2.). Burada y absorbans değerini, x ise derişimi göstermektedir.



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

1 µg Cu/L etkisinde sert suda kalan balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 14 gün sonunda total protein düzeyi:

y = 0.0012x

Absorbans: y = 0,703

Derişim (x) = $\frac{0,703}{0,0012}$

Derişim = 0,585 mg/mL

Doku tamponla 10 mL'ye seyreltildiği için

Derişim = 0,585x 10 x 10

Derişim = 58,5 mg prot./ g yaş ağırlık (y.a.)

Benzer şekilde her ölçüme ait regresyon eşitliklerinden yararlanılarak diğer balık dokularındaki protein miktarları iki tekrarlı olmak üzere ölçüldü ve hesaplandı.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0{,}0013^{*} \times 4{,}5\ (\text{mL})}{1000 \times 0{,}03\ (\text{mL}) \times 0{,}5\ (\text{sa.}) \times \text{mg prot./mL}}$$

= μmol Pi/mg prot./sa.

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y = 0,0013x)

1 μg Cu/mL etkisinde sert suda kalan balıklardan 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 14 gün sonunda Na^{+}-K^{+} ATPaz aktivitesi:

Absorbans: y = 0,0705

$$Na^{+}\text{-}K^{+}\ \text{ATPaz aktivitesi} = \frac{0{,}0705\ /0{,}0013 \times 4{,}5\ (\text{mL})}{1000 \times 0{,}03\ (\text{mL}) \times 0{,}5\ (\text{sa.}) \times 5{,}86\ \text{mg prot./mL}}$$

Na^{+}-K^{+} ATPaz aktivitesi = 2,78 μmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6. Metal ve İyon Analizleri

Dissekte edilen dokular total ağır metal ve iyon analizlerine başlamak amacıyla etüve konuldu ve 105 ^{0}C'de 3 gün süreyle sabit ağırlığa ulaşana kadar kurumaları beklendi. Kuru ağırlıkları saptanan örnekler cam yakma tüplerine alınarak üzerlerine 2 mL perklorik asit ve 4 mL nitrik asit ilavesi yapılarak 100 ^{0}C'de yaklaşık 5 saat süreyle yakıldı. Yakma işlemi çeker ocaklı bir ortamda yapıldı. Tamamen berrak bir çözelti haline gelinceye kadar yakılan örnekler soğumaya bırakıldı ve plastik tüplere alınarak solungaç dokusu 10 mL'ye böbrek ve bağırsak dokusu 5 mL'ye distile su ile seyreltildi.

Daha sonra çözelti içerisindeki ağır metallerin absorbansı atomik absorbsiyon spektrofotometresinde (Perkin Elmer 3100- Perkin Elmer A Analyst 700) okundu. İyonların absorbans değerleri standart değerlerini aştığında ilave seyreltmeler

yapılarak okuma yapıldı. Atomik absorbsiyon spektrofotometresinin ve ölçümlerin doğruluğu referans materyal (TORT 1 istakoz hepatopankreası, National Research Council, Canada) kullanılarak test edildi ve ölçümlerin % 10 aralığında aynı olduğu belirlendi.

3.2.7. Metal Derişiminin Hesaplanması

Bakır ve krom etkisinde kalan deney gruplarında ve kontrol gruplarında, metal standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren standart grafikler kullanılarak metal birikim düzeyleri belirlendi. Bakır etkisinde kalan örneklerde, bakır birikimini belirlemek için stok çözeltiden uygun seyreltmelerle hazırlanan Cu^{+2} standartlarının (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 µg/mL) absorbans değerleri ile y = 0,046x regresyon eşitliği elde edildi (Şekil 3.3.).

Aynı şekilde Cd^{+2} etkisinde kalan örneklerde, Cd^{+2} birikimini belirlemek amacıyla stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan standartların (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µg/ml) absorbans değeri ile y = 1,0x regresyon eşitliği elde edildi. Denklemdeki y absorbansı, x ise metal derişimini göstermektedir (Şekil 3.4.).

1µg Cu^{+2}/mL etkisinde sert suda kalan balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 14 gün sonunda bakır derişimi:

Absorbans: y = 0,046x

Derişim (x) = $\frac{0,046}{18,15}$

Derişim = 0,835 µg Cu^{+2} /mL

Doku asitle yakıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandığı için

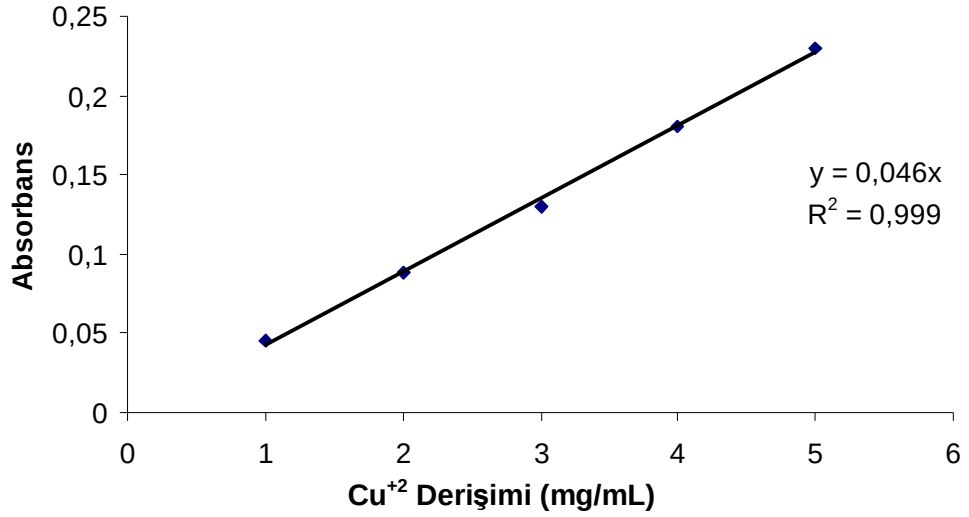
Derişim = 0,835x 10

Derişim = 8,35 µg Cu^{+2}/mL

Cu^{+2} etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0,2722 g olarak tespit edildi. Buna göre 1 g dokudaki Cu^{+2} derişimi:

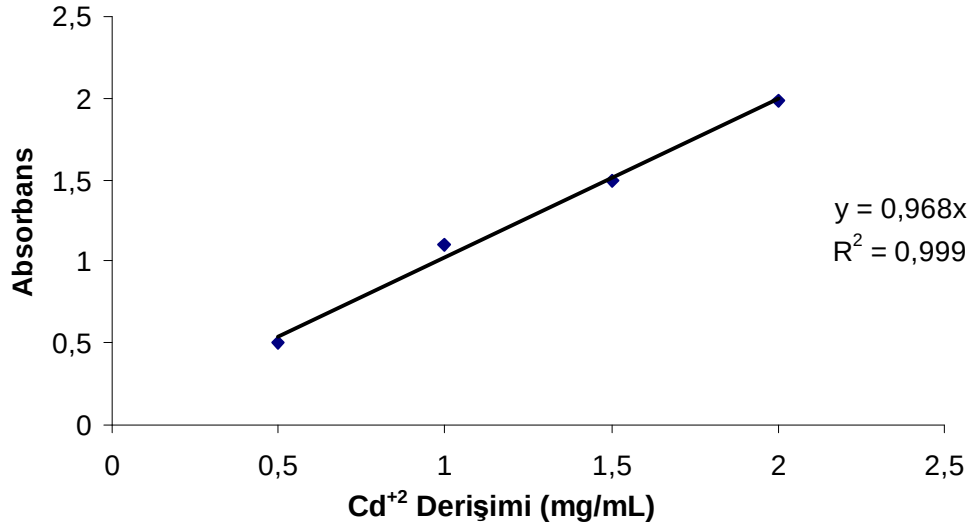
Derişim = $\frac{8,35}{0,2722}$

Derişim =30,68 µg Cu^{+2}/g k.a.



Şekil 3.3. Cu^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

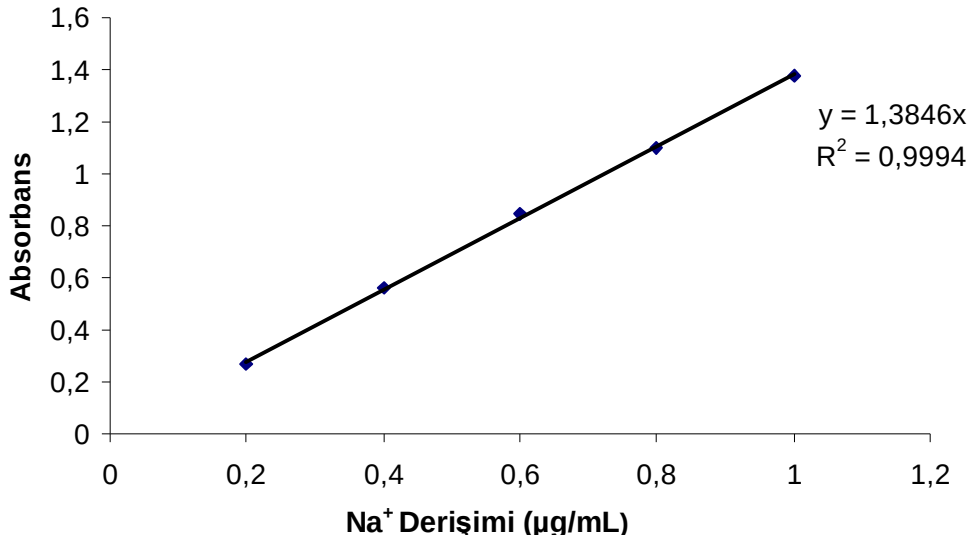
Total metal düzeyi Cd^{+2} deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı. Bütün sonuçlar µg metal/g. k.a. olarak verildi.



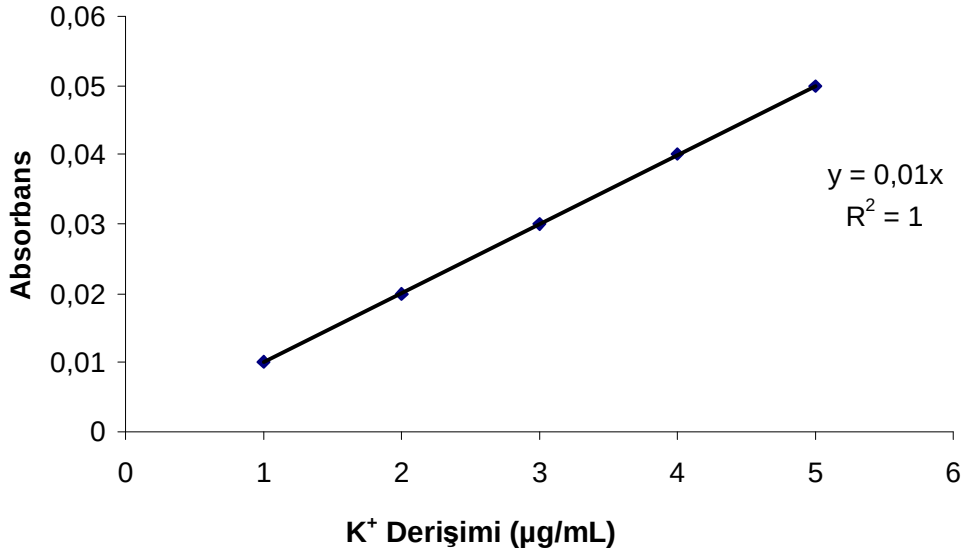
Şekil 3.4. Cd^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.8. İyon Derişiminin Hesaplanması

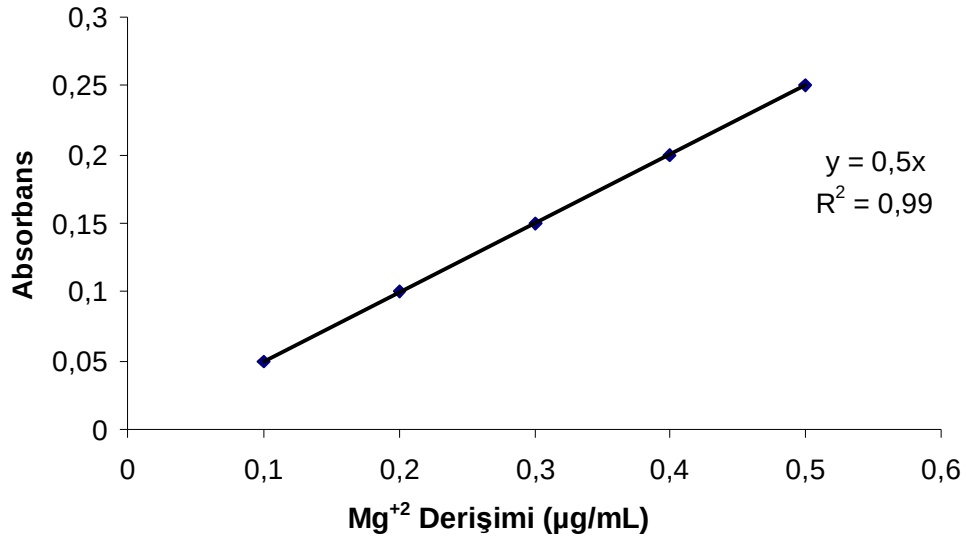
Total iyon düzeyleri, kontrol ve metal etkisinde kalan gruplarda Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} standartları ile absorbans değerleri arasındaki ilişkileri gösteren standart eğriler (Şekil 3.5.-3.8.) kullanılarak hesaplandı.



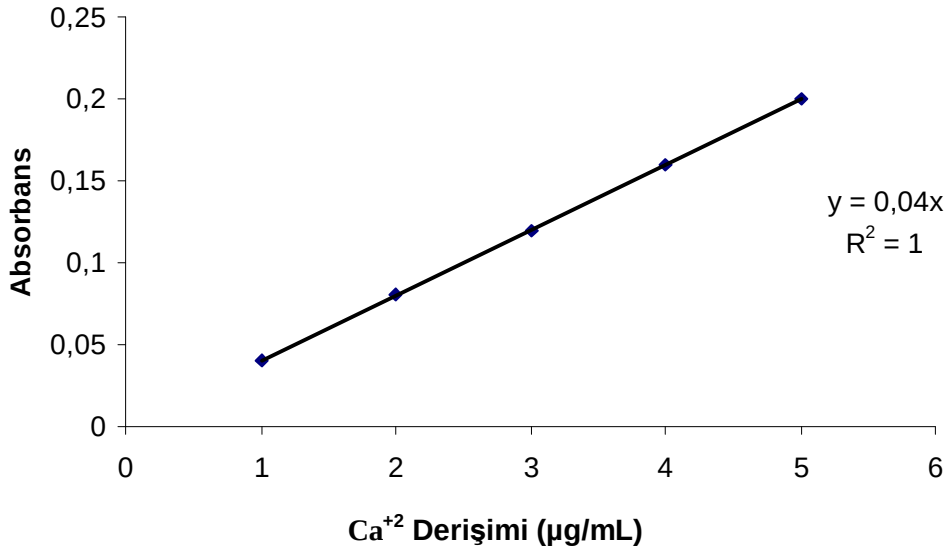
Şekil 3.5. Na^{+} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.



Şekil 3.6. K^{+} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.



Şekil 3.7. Mg^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.



Şekil 3.8. Ca^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal

1 µg Cu/mL etkisinde sert suda kalan balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 14 gün sonunda Na^{+} derişimi:

y = 1,384x

Absorbans: y = 110

Derişim (x) = $\frac{110}{1,384}$

Derişim = 79,48 μg/mL Na^{+}

Doku asitle yakıldıktan sonra önce 10 mL'ye seyreltildi. Yoğunluğun fazla olması nedeniyle çözelti ilave olarak 100 kere daha sulandırıldı ve böylece son derişim hesaplanırken 1000 kere sulandırılma katsayısı hesaba alındı.

Derişim = 79,48 x 1000

Derişim = 79480 mg Na^{+}/mL

Cu^{+2} etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0,1937g olarak ölçüldü. Buna göre 1 g dokudaki Na^{+} derişimi:

Derişim = $\frac{79480}{0,1937}$

Derişim = 410,33 mg Na/g k.a.

Total iyon düzeyi diğer Cu^{+2} ve Cd^{+2} etkisinde kalan deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı.

3.2.9. 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.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

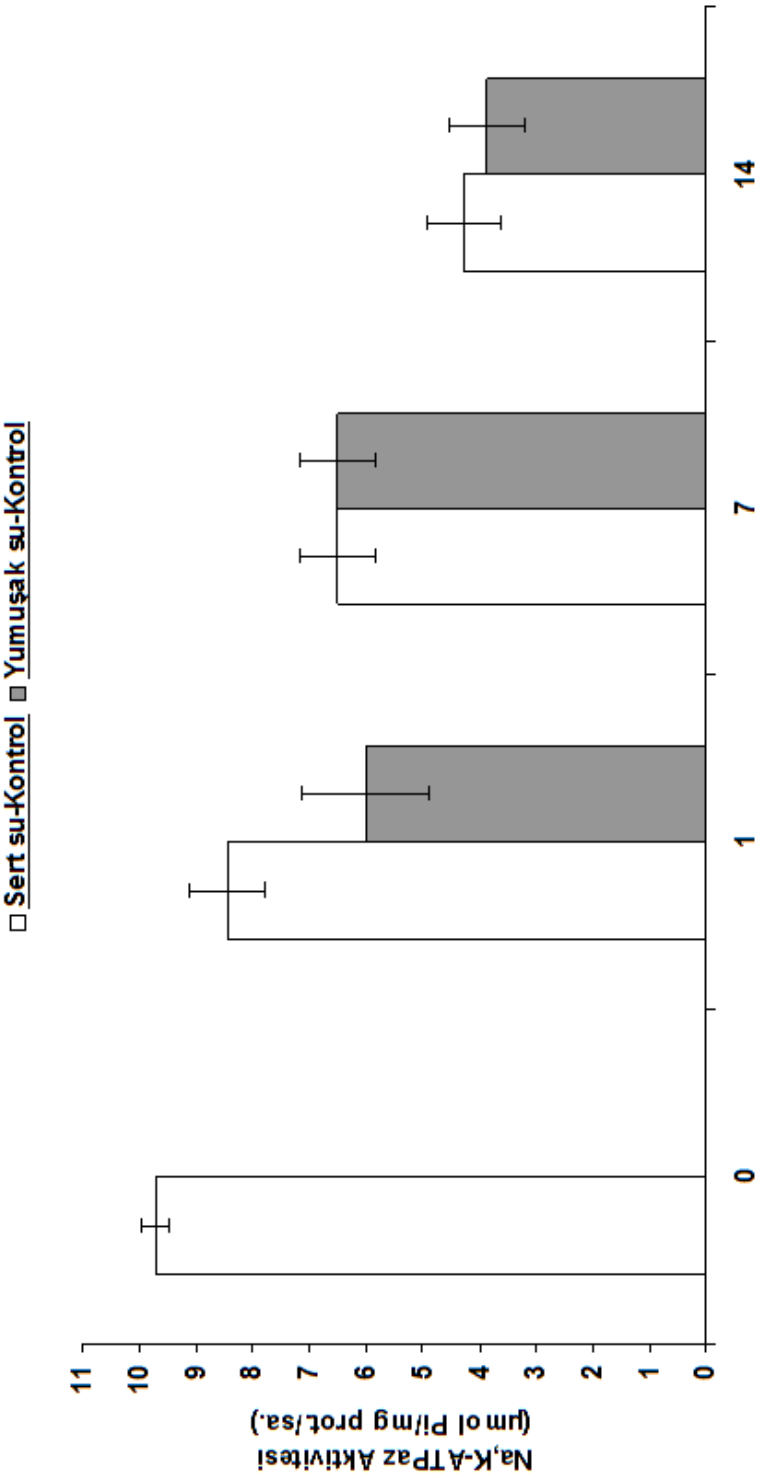
4.1. Bulgular

4.1.1. ATPaz Aktivitesi

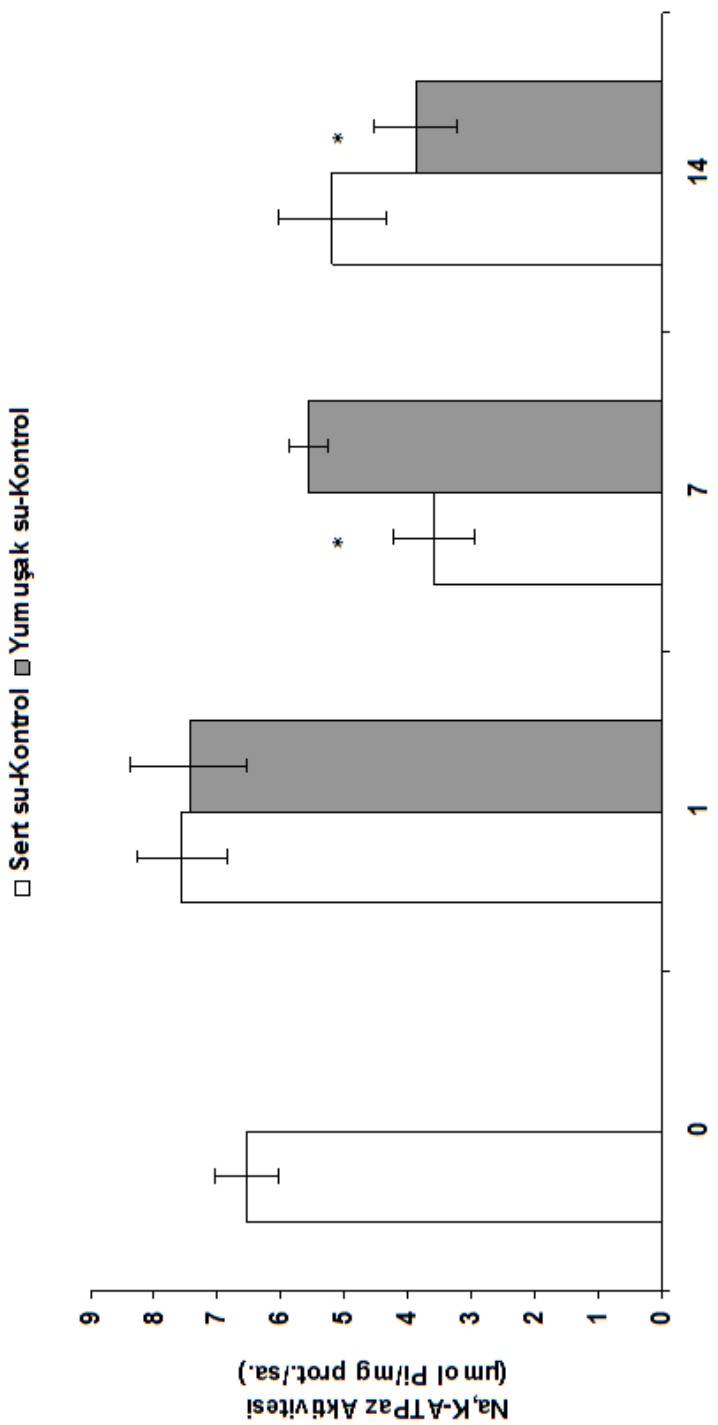
4.1.1.1. Kontrol Balıklarda ATPaz Aktivitesi

O. niloticus, sert su ve yumuşak suda Cu^{+2} ve Cd^{+2}'nin 1 µg/mL derişimlerinin etkisine 0, 1, 7 ve 14 gün süre ile bırakıldı ve bu süreler sonunda solungaç, bağırsak ve böbrek dokusunda Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler, sert sulardaki kontrol balıklarında solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 0, 1, 7 ve 14. günlerde sırasıyla 9,72±0,27, 8,45±1,13, 6,51±0,65 ve 4,28±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1.). Bağırsak kontrol Na^+,K^+-ATPaz aktiviteleri aynı günler için sırasıyla 6,54±0,50, 7,55±0,92, 3,58±0,31 ve 5,18±0,65 µmol Pi/mg prot/sa. (Şekil 4.2.) ve böbrek dokularındaki kontrol Na^+,K^+-ATPaz aktiviteleri ise aynı günler için sırasıyla 2,17±0,64, 3,82± 0,80 , 4,50±0,85 ve 1,96 ±1,40 µmol Pi/mg prot/sa olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3.).

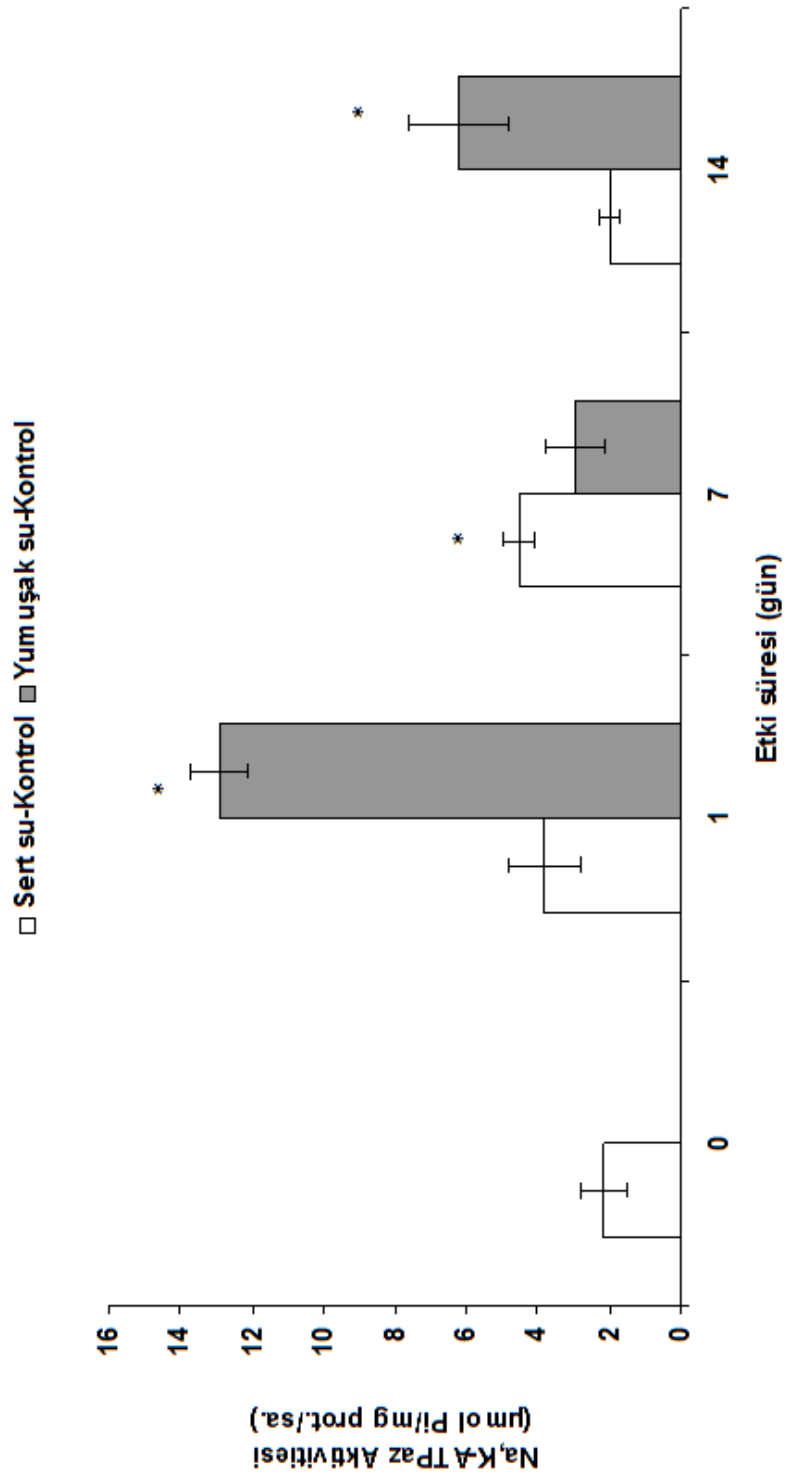
Yumuşak sulardaki kontrol balıklarında solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 0, 1, 7 ve 14. günlerde sırasıyla 6,01±1,13, 6,51±0,65 ve 3,88±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.). Bağırsak kontrol Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri aynı günler için sırasıyla 7,45±0,92, 5,55±0,31 ve 3,88±0,65 µmol Pi/mg prot/sa. olarak ölçülmüş (Şekil 4.2.) ve böbrek dokularındaki kontrol Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ise aynı günler için sırasıyla 12,9±0,80, 2,94±0,85 ve 6,23±1,40 µmol Pi/mg prot/sa. olarak ölçülmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil.4.1. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ATPaz aktivitesi.
(* ; kontrole göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).



Şekil.4.2. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ATPaz aktivitesi. (*; kontrole göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).

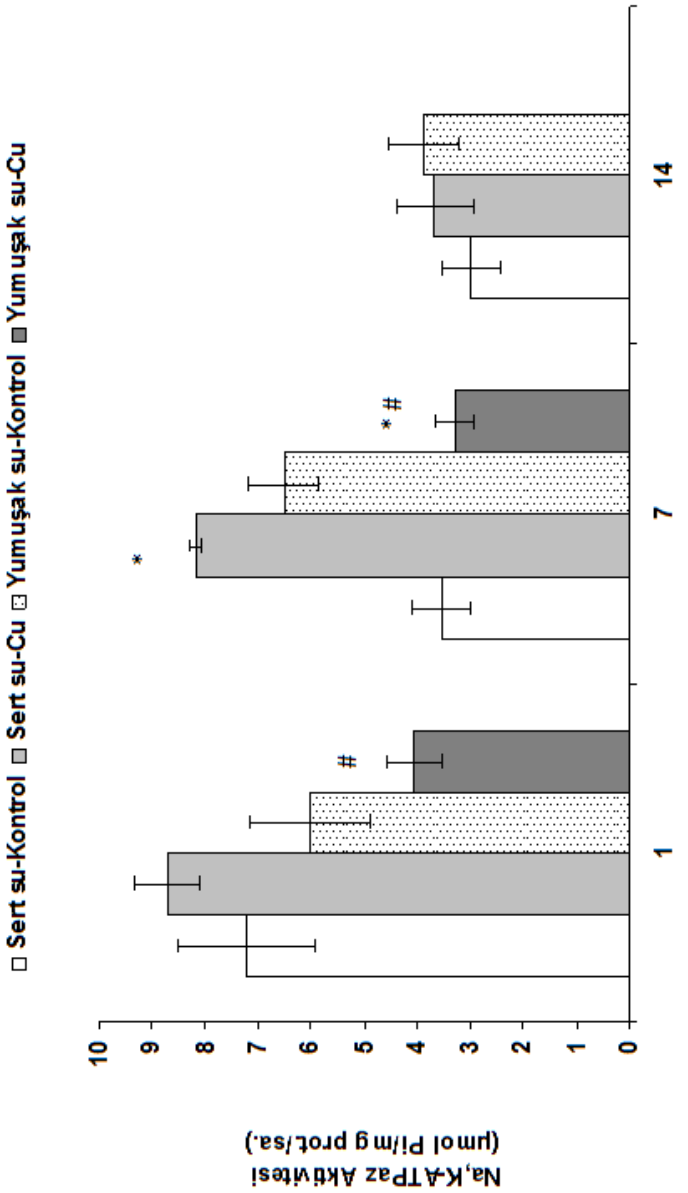


Şekil.4.3. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde Na^+-K^+ATPaz aktivitesi. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).

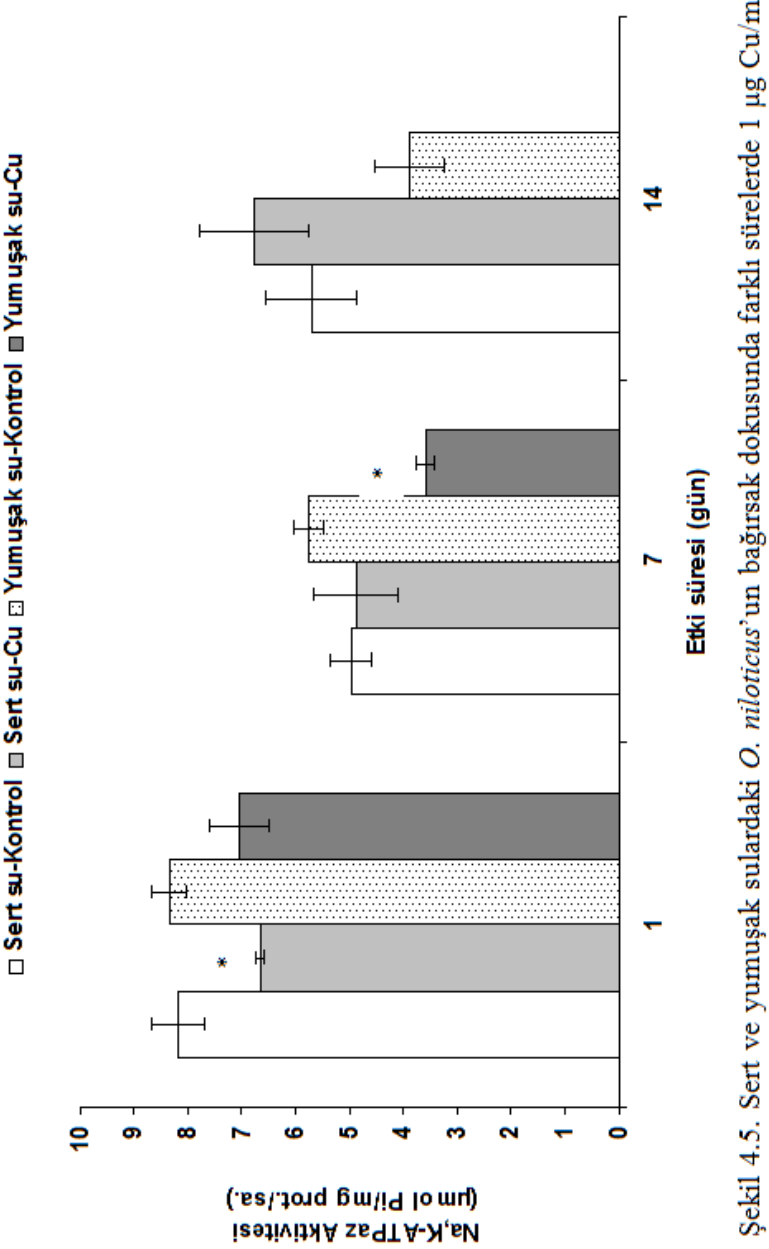
4.1.1.2. Bakır Etkisinde ATPaz Aktivitesi

Sert su ortamında bulunan balıkların 1, 7 ve 14 gün süre ile 1 µg/mL Cu^{+2} etkisi sonucunda enzim Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitelerinde kontrole göre önemli farklılıklar gözlenmiş ($P<0.05$) ve bu değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Buna göre solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi kontrole göre 7. gün sonunda anlamlı olarak en yüksek düzeyine % 130'luk artışla ulaşmıştır (8,16±0,12 µmol Pi/mg prot/sa.) (Şekil 4.4.). Buna karşın, bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi ise kontrole göre 1. gün sonunda % 18 oranında bir azalış göstermiştir (6,66±0,08 µmol Pi/mg prot/sa.) (Şekil 4.5.). Böbrek Na,K-ATPaz aktivitesi ise 1. gün % 149 (9,50±0,42 µmol Pi/mg prot/sa.)ve 14. gün sonunda % 606 (13,84±0,09 µmol Pi/mg prot/sa.) oranında istatiksel olarak önemli bir artış göstermiştir (Şekil 4.6.).

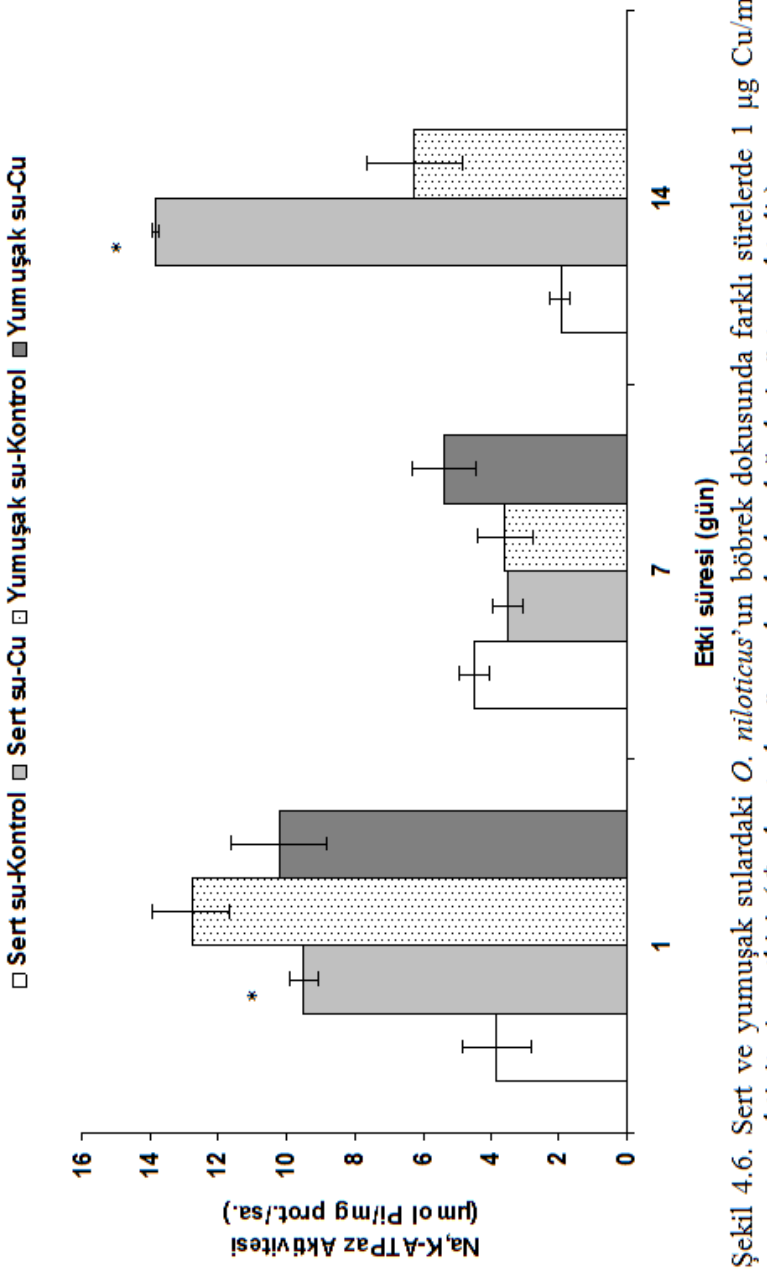
Yumuşak suda yaşayan Cu etkisindeki balıklar ise 7. gün sonunda ölmeye başlamışlardır. Bu nedenle yumuşak su ve Cu etkisindeki gruplarda 14. gün sonunda enzim aktivitesi ölçülememiştir. Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi, kontrole göre 7. Günde anlamlı bir azalış gözlenmiş, sert suya göre ise 1. (10,23±1,41 µmol Pi/mg prot/sa.) ve 7. günlerde (5,35±0,94 µmol Pi/mg prot/sa.) istatiksel olarak önemli bir azalış gözlenmiştir. Bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi ise 7. gün sonunda % 61 düzeyinde azalış kaydetmiştir (3,58±0,18 µmol Pi/mg prot/sa.). Bunun yanında böbrek Na,K-ATPaz aktivitesi ise tüm süreler için istatiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.4.Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cu^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).



Şekil 4.5. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).

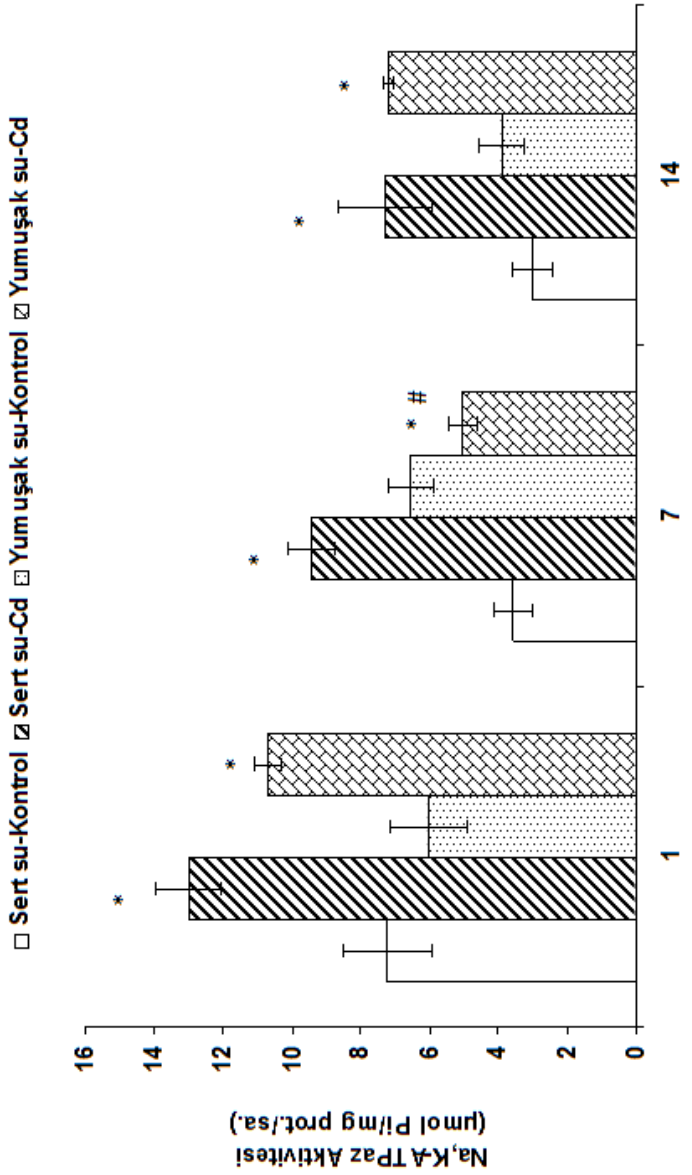


Şekil 4.6. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cu/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (*; kontrole göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).

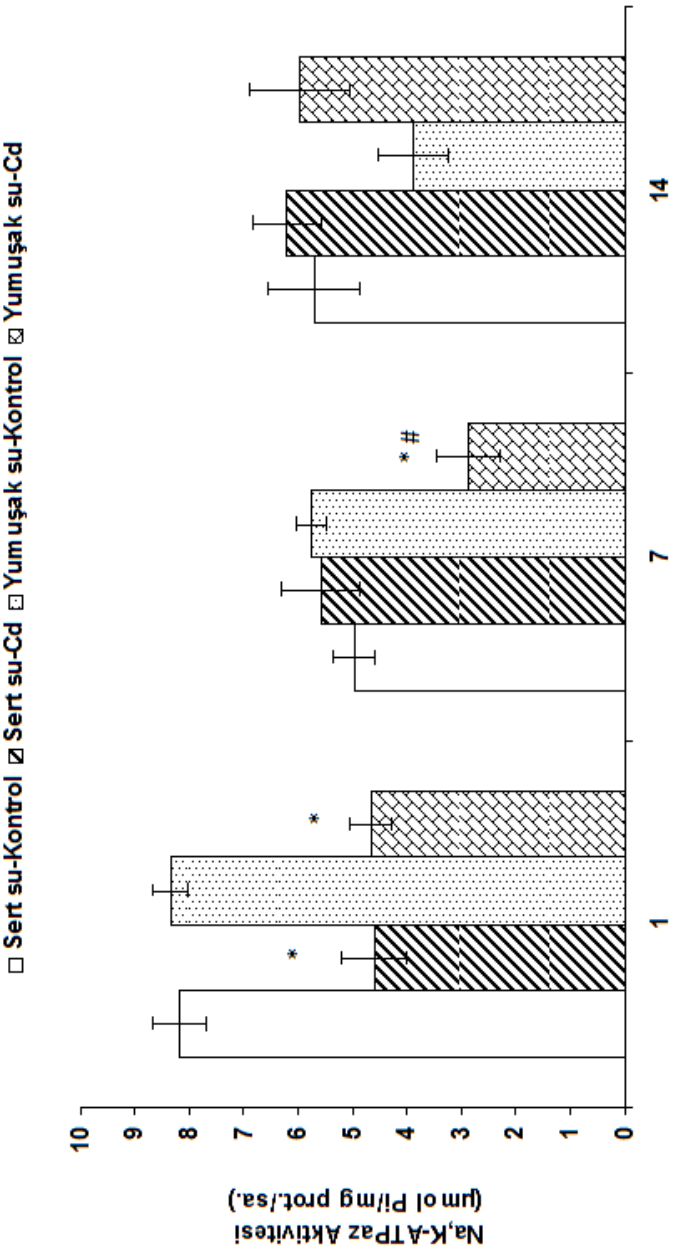
4.1.1.3. Kadmiyum Etkisinde ATPaz Aktivitesi

Sert suda yaşayan balıkların Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi 1 µg/mL Cd'nin 1, 7 ve 14 günlük etkisi sonunda önemli düzeyde farklılık göstermiştir ($P<0,05$). Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi tüm süreler için anlamlı artışlar göstermiş olup, 7. gün sonunda % 165 ile en yüksek düzeye ulaşmıştır (9,41±0,68 µmol Pi/mg prot/sa.) (Şekil 4.7.). Bağırsak enzim aktivitesi kontrole göre anlamlı olmayan artışların yanında 1. gün sonunda % 44 ile önemli bir azalış göstermiştir (4,60±0,61 µmol Pi/mg prot/sa.) (Şekil 4.8.). Böbrek Na,K-ATPaz aktivitesinde ise 1. ve 14. gün sonunda anlamlı artışlar olmakla birlikte en yüksek 14. Günde % 768'lik (17,0±0,03 µmol Pi/mg prot/sa.) önemli bir artış, 7 günlük etki sonunda ise % 65'lik (1,59±0,13 µmol Pi/mg prot/sa.) bir azalış gözlenmiştir (Şekil 4.9.).

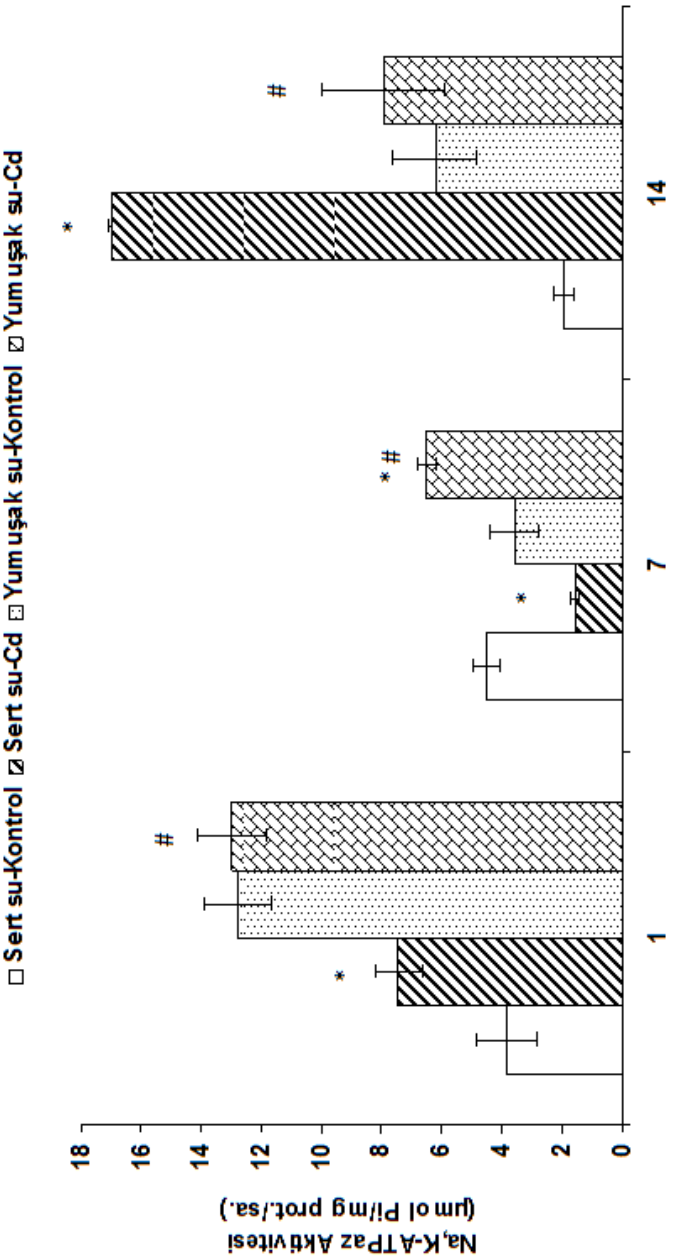
Yumuşak suda yaşayan balıklarda Cd etkisi sonrasında Na,K-ATPaz aktivitesinde önemli değişiklikler görülmüştür. Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi kontrole göre 1. ve 14. gün sonunda anlamlı artışlar gözlenirken en fazla artışın % 85 oranında 14. günde olduğu ölçülmüştür (7,18±0,14 µmol Pi/mg prot/sa.). Ayrıca 7. Gün sonunda da hem kontrole hem de sert suya göre % 23'lük bir azalış gözlenmiştir (5,02±0,41 µmol Pi/mg prot/sa.). Bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi en yüksek hem kontrole hem de sert suya göre 7 günlük Cd etkisi sonrasında % 51'lük bir düşüş göstermiştir (2,85±0,59 µmol Pi/mg prot/sa.). Buna karşın, böbrek enzim aktivitesinde ise 7. gün sonunda kontrole göre % 82'lik bir artış kaydedilmiştir (6,50±0,27 µmol Pi/mg prot/sa.). Sert suya göre ise 1. ve 7. günler önemli düzeyde artış gösterirken, 14. Günde % 27 oranında bir azalış belirlenmiştir (7,93±2,06 µmol Pi/mg prot/sa.).



Şekil 4.7. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un solungaç dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (* : kontrole göre anlamlı olan değerler, # : sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).



Şekil 4.8. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un bağırsak dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).



Şekil 4.9. Sert ve yumuşak sulardaki *O. niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sürelerde 1 µg Cd/mL'nin Na^+-K^+ATPaz aktivitesine etkisi. (*; kontrole göre anlamlı olan değerler, #; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir).

Çizelge 4.1. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri.. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yok).

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu-Yumuşak Su
Solungaç	1	80 ↑ *	21 ↑	78 ↓ *	48 ↓ #
	7	165 ↑ *	130 ↑ *	23 ↑ * #	98 ↓ * #
	14	143 ↑*	22 ↑	85 ↑ *	CBY
Bağırsak	1	44 ↓ *	18 ↓ *	44 ↓ *	19 ↓
	7	12 ↑	2 ↓	51 ↓ * #	61 ↓ *
	14	9 ↑	19 ↑	54 ↑	CBY
Böbrek	1	95 ↑ *	149 ↑ *	8 ↑ #	25 ↓
	7	65 ↓ *	22 ↓	82 ↑ * #	33 ↑
	14	768 ↑ *	606 ↑ *	20 ↑ #	CBY

4.1.2. Metal Birikimi

4.1.2.1. Bakır Etkisinde Metal Birikimi

Cu^{+2} etkisinde 1, 7 ve 14 gün süre ile sert suda yaşayan balıklarda her üç doku içinde önemli düzeyde artışlar gözlenmiştir. Buna göre kontrol baz alınarak yapılan değerlendirmede en yüksek birikim solungaç (28,6±2,05 µg/g k.a.) ve böbrek (26,9±0,0 µg/g k.a.) dokusu için 14.günde gözlenmiştir. Bağırsak dokusu için ise tüm sürelerde artış gözlenmiş olup en yüksek artış 7. Günde (59,9±7,14 µg/g k.a.) gözlenmiştir.

Yumuşak suda Cu^{+2} etkisinde kalan balıklardaki solungaç dokusu için ise kontrole göre en önemli artışı 7. günde (13,4±1,50 µg/g k.a.) gösterirken, sert suya göre ise 1. günde (6,37±0,19 µg/g k.a.) önemli bir düzey gözlenmiştir. Bağırsak dokusu için hem kontrole hem de sert suya göre 1. günde (66,8±29,1 µg/g k.a.) en önemli birikimi göstermiştir. Böbrek dokusu için de kontrole göre en fazla birikim 7. günde (11,7±3,48 µg/g k.a.) olup, sert suya göre ise 1. günde (7,14±0,0 µg/g k.a.) önemli düzey göstermiştir. Cu^{+2} etkisinde yumuşak sudaki balıklarda 7. Günden itibaren ölümler gözlenmiş olup 14 gün yaşayamamışlardır.

4.1.2.2. Kadmiyum Etkisinde Metal Birikimi

Sert suda yaşayan 1, 7 ve 14 gün süre ile Cu^{+2} ve Cd^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Cd^{+2} düzeyleri artış gösterirken, böbrek dokusunda önemli bir değişiklik görülmemiştir. Kontrole göre en yüksek Cd^{+2} düzeyi solungaç (46,6±0,0 µg/g k.a.) ve bağırsak dokusunda (209,8±44,5 µg/g k.a.) 14. gün sonunda gözlenmiştir. Böbrek dokusu için ise 7. günde (61,5±7,6 µg/g k.a.) bir atış gözlenmiştir.

Yumuşak suda ise hem kontrole hem de sert suya göre solungaç dokusu için en yüksek Cd^{+2} düzeyi yine 14. Günde (15,2±0,0 µg/g k.a.) olup önemli bir birikim göstermiştir. Bağırsak dokusu için ise hem kontrole hem de sert suya göre tüm günlerde anlamlı artışlar gösterirken en fazla birikim 14. günde (567,3±29,4 µg/g k.a.) gözlemiştir.

Böbrek dokusunda da tüm günler için hem kontrole hem de sert suya göre birikimde önemli artışlar gözlenmiş olup, birikimde en fazla artış 14. günde (1668,6±664,7 µg/g k.a.) ölçülmüştür. Bu değerler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=5; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Metal	**Süre (gün)**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Böbrek**
	0	2,54±0,12	6,57±1,3	10,8±0,32
	1	0,64±0,12	1,27±0,16	7,75±0,96*
SK-Cd^{+2}	**7**	0,71±0,1	1,79±0,42	2,71±0,62*
	14	0,85±0,06	1,05±0,36	4,44±0*
		P>0.05	P>0.05	P<0.05
	1	1,77±0,37	4,12±0,98	0±0
SK-Cu^{+2}	**7**	2,05±0,37	3,94±1,15	0±0
	14	0,64±0,08*	1,10±0,31*	0±0
		P<0.05	P<0.05	P>0.05
	1	3,69±0,28*	88,5±2,34*	7,10±1,15
S-Cd^{+2}	**7**	16,4±1,55*	201,9±12,64*	61,5±7,58*
	14	46,60±0*	209,8±44,5*	140,8±32,44*
		P<0.05	P<0.05	P<0.05
	1	4,08±0,26*	15,9±0,72*	0±0
S-Cu^{+2}	**7**	15,5±1,53*	59,9±7,14*	9,78±0,0*
	14	28,6±2,05*	26,2±11,59*	26,9±0,0*
		P<0.05	P<0.05	P<0.05
	1	0,60±0,06	1,15±0,12	8,39±0,76
YK-Cd^{+2}	**7**	0,94±0,19	1,34±0,13	4,1±1,27
	14	1,19±0,3	1,74±0,45	6,83±1,95
		P>0.05	P>0.05	P>0.05
	1	2,22±0,56	3,87±0,44	0±0
YK-Cu^{+2}	**7**	1,39±0,47	3,62±0,08	0±0
	14	0,83±0,37	2,75±1,39	7,32±0
		P>0.05	P>0.05	P>0.05
	1	5,99±0,50*#	72,9±17,50*	10,1±1,58#
Y-Cd^{+2}	**7**	12,3±1,36*#	311,5±15,76#*	78,8±2,32*#
	14	15,2±0*#	567,3±29,4 #*	1668,6±664,7*#
		P<0.05	P<0.05	P<0.05
	1	6,37±0,19* #	66,8±29,1*#	7,14±0,0*#
Y-Cu^{+2}	**7**	13,4±1,50*	58,9±7,48	11,7±3,48*
		P<0.05	P<0.05	P<0.05

4.1.3. İyon Düzeyleri

4.1.3.1. Bakır Etkisinde İyon Düzeyleri

Denemelerde balıklar 1, 7 ve 14 gün süre ile 1 µg/mL Cu^{+2} etkisinde kalması sonucu iyon düzeylerinde önemli bir değişim göstermemiştir. Buna göre sert suda Cu^{+2} etkisindeki balıklarda K düzeyi böbrek dokusunda 14. günün sonunda % 40 oranında önemli bir azalış göstermiştir (28,8±2,70 µg/g k.a.). Solungaçta ve bağırsak dokuları için iyon düzeyi kontrole göre anlamlı olmayan azalışlar göstermiştir. Yumuşak sudaki Cu^{+2} etkisindeki balıklarda ise K düzeyi kontrole göre solungaç dokusu 7. günün sonunda % 45 oranında önemli bir azalış göstermiştir (5,31±0,35 µg/g k.a.). Bağırsak dokusunda sert suya göre 1. günün sonunda % 3 oranında önemli bir azalış göstermiştir (26,5±75.7 µg/g k.a.). Böbrek dokusu için ise anlamlı olmayan azalışlar gözlenmiştir.

Na^{+} iyonunda sert sudaki balıkların solungaç dokusunda kontrole göre 7. günün sonunda % 45 oranında önemli bir azalış gözlenmiştir (0,47±0,02 µg/g k.a.). böbrek dokusunda 7. günün sonunda % 67 oranında bir azalış varken (0,05±0,02 µg/g k.a.), 14. günün sonunda %86 oranında önemli bir artış gözlenmiştir (0,13±0,0 µg/g k.a.). Yumuşak sudaki Cu^{+2} etkisindeki balıklarda ise Na^{+} düzeyi kontrole göre solungaç dokusu için anlamlı olmayan azalışlar gözlenirken, bağırsak dokusu için 1. günün sonunda % 45 oranında bir azalış (0,33±0,02 µg/g k.a.), böbrek dokusu için 7. günün sonunda % 150 değerinde bir artış ölçülmüştür (0,1±0,0 µg/g k.a.).

Mg^{+2} iyonunda sert sudaki balıkların solungaç dokusunda kontrole göre 1. Günün sonunda % 30 oranında bir artış gözlenmiştir. Böbrek dokusu için ise 7. günün sonunda % 75 oranında bir azalış varken (141,4±1,43 µg/g k.a.), 14. günün sonunda % 99 oranında önemli bir artış gözlenmiştir (370,4±0,0 µg/g k.a.).

Yumuşak sudaki Cu^{+2} etkisindeki balıklarda ise hem kontrole hem de sert suya göre bağırsak dokusu için 7. günün sonunda % 79 oranında önemli bir artış varken (235,3±1,85 µg/g k.a.), böbrek dokusu için ise sert suya göre % 24 oranında bir artış gözlenmiştir.

Ca^{+2} iyonunda sert sudaki balıkların bağırsak dokusunda 14. günün sonunda kontrole göre % 832 oranında önemli bir artış gözlenmiştir (2,58±0,0 µg/g k.a.). Yumuşak sudaki Cu^{+2} etkisindeki balıklarda ise kontrole göre böbrek dokusunda 1. Günün sonunda % 92 oranında bir azalış (0,01±0,02 µg/g k.a.) gözlenmiştir.

4.1.3.2. Kadmiyum Etkisinde İyon Düzeyleri

Denemelerde balıklar sert suda 1, 7 ve 14 gün süre ile 1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde kalması sonucu K^{+} iyon düzeyinde kontrole göre solungaç dokusunda anlamlı olmayan artışlar gözlenirken, bağırsak dokusunda 1. günün sonunda % 386 değerinde önemli bir artış gözlenmiştir (28,1±1,96 µg/g k.a.). Yumuşak su için ise bağırsak dokusunda hem kontrole hem de sert suya göre 1. günün sonunda % 28 oranında bir artış gözlenmiştir (35,2±1,99 µg/g k.a.). böbrek dokusu için ise kontrole göre 7. Günün sonunda % 24 oranında bir artış gözlenmiştir (34,7±0,87 µg/g k.a.).

Na^{+} iyonunda sert sudaki her üç doku içinde kontrole göre anlamlı olmayan artış ve azalışlar gözlenmiştir. Yumuşak sudaki balıklar için ise solungaç dokusunda kontrole göre anlamlı olmayan azalışlar gözlenirken, bağırsak dokusunda 1.günün sonunda % 7 oranında bir artış gözlenmiştir (0,63±0,06 µg/g k.a.).

Mg^{+2} iyonunda sert sudaki balıkların solungaç dokusunda 1. günün sonunda kontrole göre % 13 oranında bir artışa rastlanırken (53,4±4,2 µg/g k.a.), böbrek dokusu için 7. günün sonunda % 80 oranında önemli bir azalış gözlenmiştir (113,6±6,01 µg/g k.a.). Yumuşak sudaki balıklar için ise solungaç dokusunda kontrole göre anlamlı olmayan artışlara rastlanırken, böbrek dokusunda 1. günün sonunda hem kontrole hem de sert suya göre % 72 oranında bir azalış gözlenmiştir (132,0±7,88 µg/g k.a.). Ayrıca 14. günün sonunda da kontrole göre % 233 oranında önemli bir artış gözlenmiştir (447,4±14,1 µg/g k.a.).

Ca^{+2} iyonunda sert sudaki balıkların bağırsak dokusunda 14. günün sonunda kontrole göre % 903 oranında önemli bir artış (2,78±0,20 µg/g k.a.) gözlenmiştir. Yumuşak sudaki balıklar için ise solungaç ve bağırsak dokusunda kontrole göre anlamlı olmayan artışlara rastlanırken, bağırsağın 14. gününün sonunda sert suya göre % 45 oranında bir azalış gözlenmiştir (1,13±0,61 µg/g k.a.). Böbrek dokusunda ise kontrole göre 1. günün sonunda % 91 oranında bir azalışa rastlanmıştır.

Tüm bu değerlerin toplam iyon düzeyleri ve % çizelgeleri aşağıda verilmiştir. (Çizelge 4.3. – Çizelge 4.10.)

Çizelge 4.3**.** Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam K^+ düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=6; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Metal	**Süre (gün)**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Böbrek**
S-K	**0.0**	<0.001	23,2±1,33	<0.001
	1	8,73±0,52	5,78±0,43*	28,7±4,62
	7	8,40±1,39	28,5±2.50	22,8±1,85
	14	7,49±0,40	37,0±3,57*	48,3±4,83
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
S-Cd^{+2}	**1**	9,10±0.77	28,1±1,96 *	24,6±0,30
	7	8.76±0,44	24,3±2,84	25,0±0,18
	14	7,70±0,07	24,3±2,84	41,3±4,83
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
S-Cu^{+2}	**1**	8,44±0,07	11,2±0,3	26,3±2,24
	7	6,57±0,29	28,6±4.81	27,0±1,61
	14	7,40±0,79	28,6±4,81	28,8±2,70*
		P<0.01	P>0.05	P<0.05
Y-K	**1**	8,93±1,19	27,4±0,71	31,7±1,29
	7	9,65±0,43	24,2±0,97	28,1±1,11
	14	8,06±0,79	29,2±2,68	32,6±1,72
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
Y-Cd^{+2}	**1**	11,0±0,19	35,2±1,99*#	34,4±3,82
	7	9,13±0,58	29,3±3,79	34,7±0,87*
	14	9,21±0,10	29,3±3,79	
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
Y-Cu^{+2}	**1**	9,92±0,73	26,5±75.7#	28,0±5,58
	7	5,31±0,35*	29,2±4.84	26,7±1,06
		P<0.01	P>0.05	P<0.05

Çizelge 4.4. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde K^+ iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yoktur).

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu-Yumuşak Su
Solungaç	1	4 ↑	3 ↓	23 ↑	11 ↑
	7	4 ↑	22 ↓	5 ↓	45 ↓ *
	14	3 ↑	1 ↓	14 ↑	CBY
Bağırsak	1	386 ↑ *	93 ↑	28 ↑ * #	3 ↓ #
	7	15 ↓	_	21 ↑	21 ↑
	14	40 ↓	29 ↓	1 ↑	CBY
Böbrek	1	14 ↓	8 ↓	9 ↑	11 ↓
	7	10 ↑	18 ↑	24 ↑ *	5 ↓
	14	14 ↓	40 ↓ *		CBY

Çizelge 4.5. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* toplam Na^{+} düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=6; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Metal	**Süre (gün)**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Böbrek**
S-K	**0**	<0.001	<0.001	0,07±0,01
	1	0,55±0,15	0,24±0,31	0,08±0,01
	7	0,87±0,06	0,22±0,02	0,16±0,02*
	14	0,43±0,04	0,14±0,02	0,07±0.01
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
S-Cd^{+2}	**1**	0,46±0,06	0,18±0,01	0,07±0,03
	7	0,69±0,02	0,24±0,04	0,11±0,03
	14	0,37±0,0	0,34±0,15	0,05±0.01
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
S-Cu^{+2}	**1**	0,48±0,03	0,24±0,02	0,06±0,01
	7	0,47±0,02*	0,17±0,02	0,05±0,02*
	14	0,49±0,08	0,24±0,13	0,13±0,0*
		P<0.01	P>0.05	P<0.05
Y-K	**1**	0,60±0,06	0,59±0,04*	0,07±0,01
	7	0,59±0,07	0,32±0,04	0,04±0,0
	14	0,59±0,04	0,32±0,17	0,05±0.01
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
Y-Cd^{+2}	**1**	0,48±0,02	0,63±0,06*	0,09±0,01
	7	0,52±0,13	0,26±0,02	0,07±0,01
	14	0,56±0,22	0,24±0,0	0,04±0.02
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
Y-Cu^{+2}	**1**	0,57±5.2	0,33±0,02*	0,07±0,01
	7	0,42±6.15	0,17±0,03	0,1±0,0*
		P<0.01	P>0.05	P<0.05

Çizelge 4.6. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Na^{+} iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yoktur).

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu-Yumuşak Su
Solungaç	1	16 ↓	12 ↓	20 ↓	5 ↓
	7	21 ↓	45 ↓ *	12 ↓	29 ↓
	14	13 ↓	15 ↑	6 ↓	CBY
Bağırsak	1	25 ↓	1 ↓	7 ↑ *	45 ↓ *
	7	12 ↑	19 ↓	20 ↓	46 ↓
	14	152 ↑	78 ↑	25 ↓	CBY
Böbrek	1	17 ↓	29 ↓	27 ↑	-
	7	29 ↓	67 ↓ *	83 ↑	150 ↑ *
	14	36 ↓	86 ↑ *	34 ↓	CBY

Çizelge 4.7. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Mg^{+} düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=6; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Metal	**Süre (gün)**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Böbrek**
S-K	**0**	<0.001	<0.001	830,6±72,2
	1	47,3±3,25	59,2±6,67	433,3±117,8*
	7	52,5±7,60	85,8±13,0*	560,1±57,5*
	14	63,8±2,61	179,6±67,6	185,7±34,3*
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
S-Cd^{+2}	**1**	53,4±4,17*	147,9±38,2	459,9±65,4
	7	60,2±1,61	113,8±13,2	113,6±6,01*
	14	72,0±6,33	122,1±0,62	331,0±102,4
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
S-Cu^{+2}	**1**	61,7±4,5*	57,3±8,61	165,4±31,0
	7	57,7±9,90	118,1±1,34	141,4±1,43*
	14	61,3±17,6	163,6±34,4	370,4±0,0*
		P<0.01	P>0.05	P<0.05
Y-K	**1**	51,1±4,68	93,7±9,38 *	477,8±137,3*
	7	56,7±4,92	131,3±5,29*	173,4±39,2
	14	64,8±0,71	119,1±0,0*	134,5±39,7
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
Y-Cd^{+2}	**1**	66,0±2,30	216,0±88,9	132,0±7,88*#
	7	57,8±4,42	112,3± 1,48	111,1±2,26
	14	82,0±1,06	111,5±9,37	447,4±14,1*
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
Y-Cu^{+2}	**1**	60,6±2,08	80,9±10,6	594,5±21,3#
	7	39,7±6,45	235,3±1,85*#	188,0±0,46
		P<0.01	P>0.05	P<0.05

Çizelge 4.8. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Mg^{+2} iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yoktur).

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu-Yumuşak Su
Solungaç	**1**	13 ↑ *	30 ↑ *	29 ↑	19 ↑
	7	15 ↑	10 ↑	2 ↑	30 ↓
	14	13 ↑	4 ↓	27 ↑	CBY
Bağırsak	**1**	150 ↑	3 ↓	131 ↑	14 ↓
	7	33 ↑	38 ↑	14 ↓	79 ↑ * #
	14	32 ↓	9 ↓	6 ↓	CBY
Böbrek	**1**	6 ↑	62 ↓	72 ↓ * #	24 ↑ #
	7	80 ↓ *	75 ↓ *	36 ↓	8 ↑
	14	78 ↑	99 ↑ *	233 ↑ *	CBY

Çizelge 4.9. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki toplam Ca^{+} düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir (Kontrol grup, N=6; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Metal	**Süre (gün)**	**Solungaç**	**Bağırsak**	**Böbrek**
S-K	**0**	<0.001	4,2±0,33	<0.001
	1	14,9±3,23	0,24±0,01*	0,28±0,09
	7	28,0±2,08	0,36±0,05*	0,25±0,08
	14	15,4±2,45	0,28±0,09*	0,12±0,0
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
S-Cd^{+2}	**1**	19,0±2,17	0,24±0,02	0,12±0,02
	7	22,4±1,34	0,38±0,15	0,09±0,01
	14	18,2±3,1	2,78±0,20*	0,21±0,02
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
S-Cu^{+2}	**1**	17,8±0,75	0,33±0,06	0,15±0,03
	7	21,9±1,36	0,60±0,21	0,15±0,04
	14	20,7±7,04	2,58±0,0*	0,14±0,03
		P<0.01	P>0.05	P<0.05
Y-K	**1**	21,8±2,03	0,21±0,01	1,53±0,29
	7	22,7±1,92	0,6±0,34	0,16±0,03
	14	23,0±1,87	2,04±0,32*	0,16±0,03
		P<0.001	P<0.001	P<0.001
Y-Cd^{+2}	**1**	16,0±3,08	0,20±0,03	0,14±0,01*
	7	21,2±1,78	0,43±0,05	0,06±0,02
	14	13,6±0,65	1,13±0,61#	0,09±0,02
		P<0.001	P>0.05	P<0.001
Y-Cu^{+2}	**1**	20,4±1,27	0,24±0,01	0,01±0,02*
	7	19,5±0,82	0,22±0,04	0,17±0,0
		P<0.01	P>0.05	P<0.05

Çizelge 4.10. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde Ca^{+2} iyonunun kontrole göre yüzde (%) değişimleri. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd^{+2} etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yoktur).

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu-Yumuşak Su
Solungaç	1	28 ↑	20 ↑	26 ↓	6 ↓
	7	20 ↓	22 ↓	6 ↓	14 ↓
	14	18 ↑	35 ↑	41 ↓	CBY
Bağırsak	1	-	38 ↑	6 ↓	11 ↑
	7	6 ↑	65 ↑	28 ↓	64 ↓
	14	903 ↑ *	832 ↑ *	45 ↓ #	CBY
Böbrek	1	57 ↓	47 ↓	91 ↓ *	92 ↓*
	7	66 ↓	42 ↓	66 ↓	4 ↑
	14	71 ↑	13 ↑	43 ↓	CBY

4.2. Tartışma

Bu çalışmada 1 µg/mL derişimindeki Cu^{+2} ve Cd^{+2}'nin 0, 1, 7 ve 14 günlük etkisindeki *O. niloticus*'un solungaç, bağırsak ve böbrek dokularında Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi, toplam metal birikimi ve toplam iyon düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

Deney süresince yumuşak su ortamında Cd^{+2} etkisinde herhangi bir balık ölümü gözlenmezken, Cu^{+2} etkisinde 7. gün sonunda balık ölümleri gözlenmiştir. Cu^{+2}'nun balıklar üzerine olan toksik etkisi iyi bilinmekte olup, yapılan çalışmalar sonucunda osmoregülasyon mekanizmalarının çalışamaz duruma gelmesi balıkların ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Heath, 1987; Atli ve Canli, 2003; Schjolden ve ark., 2007). Hogstrand ve Wood (1998), tatlı su balıklarında Ag^+'nın solungaç epitelinden Na^+ kanalı aracılığıyla girerek Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini ve sonuçta Na^+ ve Cl^- gibi önemli plazma iyonlarındaki azalmanın ölüme neden olduğunu söylemişlerdir. Yapılan birçok çalışma sonucuna göre metaller arasında en toksik özellikte olanının Ag^+ ve Hg^+ olduğu bunu Cu^{+2} ve Cd^{+2}'nin takip ettiği gözlenmiştir (Heath, 1987). Balıklarda ölümlere neden olan metal toksisitesi sadece metal türünden değil aynı zamanda balık türü, cinsiyet ve yaş gibi biyolojik faktörlerin yanında sıcaklık, su sertliği gibi ortamın fiziksel ve kimyasal koşullardan da etkilenebilmektedir. Bir alabalık türü olan *Salmo gairdneri* 0.03 mg/L Cu^{+2} ve 0.1 mg/L Cd^{+2} etkisinde kısa sürede ölmüşlerdir (Viale ve Calamari, 1984). Benzer şekilde bir sazan türü olan *Cyprinus carpio*, 7 µM Cd^{+2} etkisinde 5. günde, 2.5 µM Cd^{+2} etkisinde ise 8. günde ölmüştür (Smet ve ark., 2001). Bununla birlikte 10 günlük deney süresinde 1 µg/mL Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2} ve Pb^{+2} etkisinde kalan *O. niloticus*'larda 6. günde Cu^{+2} etkisindeki balıklarda gözlenen ölümler, Cu^{+2}'nin Ag^+ ve Hg^{+2} ile birlikte metaller arasında toksisitesinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Atli ve Canli, 2003). Schjolden ve ark., (2007) bir sazan türü olan *Carassius carassius* ile yaptıkları çalışmada 300 µg Cu^{+2}/L etkisinde 13. günden itibaren ölümlerin ve 14 günlük etki sonrasında ise plazma Na^+ ve Cl^- düzeyindeki azalmayla birlikte solungaçlarda kontrol düzeylerine göre yaklaşık 14 kat oranında Cu^{+2} birikiminin gözlendiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar çalışma sonuçlarına göre

C. carassius'un dirençli bir tür olmasına karşın Cu^{+2}'nin balıkta solungaç yapısında bozulma, plazma iyon düzeylerinde azalma, oksijen alımının düzenlenmesindeki bozukluklarla birlikte morfolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olduğunu kaydetmişlerdir.

Deney sonucunda elde edilen veriler, Na^+,K^+-ATPaz aktivitelerinin metal türü, etki süresi, doku tipi ve ortam suyunun sertlik düzeyine bağlı olarak önemli oranda değiştiğini göstermiştir. Buna göre hem sert su hem de yumuşak su ortamında yaşayan balıklarda Cd^{+2}'nin Na^+,K^+-ATPaz aktivitesine etkisinin Cu^{+2}'ya oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Metallerin enzim aktivitesini en çok etkilediği dokuya dair bir karşılaştırma yapılacak olunursa sıralamanın solungaç>böbrek>bağırsak şeklinde olduğu görülmektedir. Solungaç Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi sert su ortamında metal etkilerinde artış, yumuşak su da ise hem artış hem de azalış göstermiştir. Bağırsak enzim aktivitesi ise her iki su ortamında azalış, böbrek dokusunda ise genel olarak artış göstermiştir. Bununla birlikte metal etkilerinin yumuşak su ile sert su arasında enzim aktivitesine etkilerine bakıldığında; Cu^{+2} etkisinde Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi çok değişiklik göstermemekle birlikte solungaç dokusunda azalmış, Cd^{+2} etkisinde ise solungaç ve bağırsak dokusunda azalırken böbrek dokusunda artmıştır.

Veriler, metal ile sert ve yumuşak su etkisinde dokulardaki metal ve iyon düzeylerinin de önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Sert su ortamında en fazla Cd^{+2} olmak üzere her iki metal de birikim gösterirken, yumuşak su ortamında metallerin toksik etkilerinin daha fazla olmasına bağlı olarak daha da artmıştır. İyon düzeylerindeki değişiklik dokularda bağırsak > böbrek > solungaç, iyonlarda ise Mg^{+2} >K^+ >Na^+ >Ca^{+2} sıralamasını izlemektedir. Genel olarak sert sularda Cu^{+2}, Cd^{+2}'ye göre daha çok etki gösterirken yumuşak sularda bu etki düzeyi her iki metal için birbirine yakındır.

Bu çalışmada solungaç dokusunun Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi için oldukça duyarlı olduğu ve Cd^{+2} toksisitesinin bu dokuda özellikle de bu enzim aktivitesine etkili olduğu görülmektedir. Bu durum Cd^{+2} toksisitesinin yüksek olduğunu ve Na^+,K^+-ATPaz aktivitesinin de bu metale duyarlı olduğunu gösteren diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Li ve ark., 1998; De la Torre ve ark., 2000;

Atli ve Canli, 2007). 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 organların özgü bir enzim olan Na^+/K^+-ATPaz enzimi temelde hücre içi homeostazisin korunmasından sorumludur ve yapılan çalışmalar günümüzde artan çevresel kirlilik sonucu metallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde Na,K-ATPaz'ın duyarlı biyolojik bir belirteçler olarak büyük öneme sahip olduğunu vurgulamaktadırlar (Watson ve Beamish, 1981; Canlı ve Stagg, 1996; Atli ve Canli, 2007).

Balıkların 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 bu dokular sucul organizmaların su ve iyon homeostazislerini dengeleyerek değişen dış ortam koşullarına uyum sağlama yeteneklerinde birincil öneme sahiptir. İyonlar arasında Na^+ ve Cl^-, yoğun miktarda bulunmakla birlikte osmotik basıncın düzenlenmesinde, K^+, Mg^{+2} ve Ca^{+2} ise diğer yaşamsal fonksiyon ve mekanizmalarda osmotik ve iyonik regülasyonun düzenlenmesi adına önemli görevlere sahiptir (Larsson ve ark., 1985, Simkiss ve Taylor, 1989). Ağır metaller, metal tipi ve derişimine, balık türüne, suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak enzim aktivitelerinde artışa veya azalışa neden olabilmektedir (Heath, 1987). Yapılan araştırmalar sucul ortamlarda metal etkilerinin oldukça karmaşık olduğunu ve suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğunu göstermiştir (Lauren ve McDonald, 1986; Heath, 1987). Bunlardan alkalinite, sertlik ve pH sudaki serbest metal oluşumunu ve dolayısıyla da balıklar tarafından emilimini etkilemektedir. Metal toksisitesinin sudaki EDTA 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). Sert sularda metal aktivitesi metallerin Ca^{+2} ve CO_3 ile bileşik oluşturmasına bağlı olarak düşüş gösterirken, yumuşak sularda düşük Ca^{+2} düzeyi ve tamponlama kapasitesi nedeniyle toksik etki göstermektedir (Meinelt ve ark., 2001). Cd^{+2}'nin Ca^{+2} kanallarına olan yüksek ilgisinden dolayı yumuşak sularda toksisitesinde artış olduğu belirtilirken, sert sularda ise Cd^{+2} toksisitesi Ca^{+2} ile büyük yarış nedeniyle

düşmektedir (Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar-Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000).

Na^+-K^+ATPaz aktivitesinde gerçekleşen azalışlar osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte metallerin 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 antioksidant enzim sistemi gibi 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. Na^+-K^+ATPaz'ın verdiği tepkiler doğrudan yoğun metal etkilerine ve zarlardaki iyon taşınmasının fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına, dolaylı olarak ise endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak gelişebilmektedir (Heath, 1987; Grosell ve ark., 2004). Bu nedenle de bu enzimlerin değişen ortam koşullarına verdikleri cevabın stresin sınıflandırılmasında ve metabolik olarak çeşitli düzenlemelerinin yapılmasında önem kazandığı belirtilmektedir. Cu^{+2}, Ag^+, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2} gibi metallerin akut toksisitelerinin kilit mekanizmasının solungaç Na^+-K^+ATPaz inhibisyonu ile ilişkili osmoregülatör hasar olduğu bildirilmiştir (McGeer ve Wood, 1998; Bianchini ve ark., 2005, Monserrat ve ark, 2007).

Cu^{+2} hücre zarlarından Cu^{+2} veya Cu^+ formunda geçebilmekte ve zar potansiyelinde değişikliklere neden olabilmektedir, dolayısıyla Na^+'ya bağlı Cu^{+2} alımı Na^+-K^+ATPaz aktivitesini değiştirmesi yönünden önem kazanmaktadır. Cu^{+2}, Na^+-K^+ATPaz aktivitesini, enzimdeki tiyol gruplarına veya Mg^{+2} bağlama bölgelerine bağlanarak inhibe edebilmektedir (Handy ve ark, 2002). Yapılan çalışmalar Cu^{+2}'nin doku Na^+ düzeylerinde azalışa neden olarak Na^+-K^+ATPaz aktivitesini indirgediğini ve aynı zamanda doku K^+ düzeyini azalttığını bildirmişlerdir (Li ve ark., 1998; Handy ve ark., 2002). Buna karşılık, bu çalışmada solungaç Na^+ düzeyindeki azalışa karşın aynı dokudaki Na^+-K^+ATPaz aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu durum ise iyon düzeyindeki azalışı telafi etmek adına enzim aktivitesinin artış göstermesi ile açıklanabilir. Grosell ve ark. (2003) ise bu

çalışmadaki bazı metal türü ve etki sürelerinde olduğu gibi, 0.52 ve 1.73 mM derişimlerindeki 7 günlük Cu^{+2} etkisinin balık *Myoxocephalus octodecemspinosus*'un solungaç ve bağırsak Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesi ile plazma Na^{+}, Mg^{+2} ve Cl^{-} düzeylerini, dokularda Cu^{+2} birikimine karşın değiştirmediğini belirtmişlerdir. Dang ve ark. (2001), besin yoluyla verdikleri Cd^{+2}'nin 4 ve 8 hafta sonunda plazma Cd^{+2} düzeyini artırdığını, plazma Ca^{+2}, Na^{+} ve Cl^{-} düzeyini ise etkilemediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte solungaç epitellerinde Cd^{+2} birikimi ile birlikte metallothionein sentezinde de bir artış kaydedilmiş ve solungaçlarda metallothionein varlığının metal etkilerinde Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesinin korunması ve dokunun normal fonksiyonlarının devamının sağlanmasında oldukça önem kazandığı belirtilmiştir. De La Torre ve ark. (2000), 14 gün boyunca 1.6 mg Cd^{+2}/L etkisinde bıraktıkları sazan *C. carpio*'yu daha sonra Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün tutmuşlar ve Na^{+}-K^{+}ATPaz % 30 inhibisyona uğradığını kaydetmişlerdir. Ayrıca ATPaz'ların metallere olan duyarlılıklarına, doku ve balık türlerine göre değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. *O. mossambicus*'un 28 günlük 3.2 µM Cu^{+2} etkisinde solungaç dokusunda bulunan klorit hücre sayısı ve yapısında değişikliklerle birlikte süreye bağlı solungaç Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesi ve plazma Na^{+} derişiminde azalma ve buna ters orantılı olarak doku Cu^{+2} düzeyinde artış gözlenmiştir (Li ve ark., 1998). Bu çalışmada ise Cu^{+2} birikimine karşın Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesinde artış gözlenmesi, dokularda değişen iyon düzeylerini tekrar normale getirmek için uyum mekanizmalarının devrede olması ile ilişkili olabilir. Bununla birlikte suyun fizikokimyasal etkisi de bu parametrelerdeki değişiklikler için ana etmen olabilmektedir.

Araştırıcılar Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin balık türü, metal ve in vivo ile in vitro uygulamalarda olduğu gibi etki koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini belirtmişlerdir (Ay ve ark., 1999, Atli 2007), McGeer ve ark., (2002) bir ay süreyle 7 mg Cu^{+2}/L etkisinde bıraktıkları *O. mykiss*'in plazma Na^{+} düzeyindeki azalışın Cu^{+2}'nin ilk etkisinin bir sonucu olduğunu kaydetmişlerdir. Na^{+}-K^{+}ATPaz aktivitesinin 29. günde artış göstermesinin ise homeostazisi düzenleme ve koruma amaçlı olduğunu belirtirken, kronik Cu^{+2} etkisinin iyon regülasyon hasarı ile ilişkili metabolik gereksinimde de artışa yol açtığını

gözlemişlerdir. Bununla birlikte kronik subletal metal etkilerinde Na^{+}-K^{+}ATPaz inhibisyonunun geçici olabileceği ve metal birikiminin bifazik yani birikim sonrası tekrar eski düzeylerine dönebileceği kaydedilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; McGeer ve ark., 2002).

Metal etkilerinde, organlardan iyon akışının ve solungaçlarda aktif iyon alımından sorumlu klorit hücrelerin hasar görmesini izleyen elektrolit kaybının olduğu gösterilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; Tkatcheva ve ark., 2004; Garcia-Santos ve ark., 2006). Bu durum ve dokulardaki metal birikimi, bu çalışmadaki iyon düzeylerinde gözlenen değişiklikleri açıklamaktadır. İyon düzeyleri de metal tipi, etki süresi ile ortam suyunun sertlik düzeyine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Sert sularda Cd^{+2} ve Cu^{+2} etkilerinde özellikle Mg^{+2} ve Ca^{+2} düzeylerindeki genel artış, ortam suyunun yüksek sertlik düzeyinden kaynaklanabilmektedir (304.2 µg $CaCO_3$/mL). Buna karşılık yumuşak su ortamındaki iyon düzeylerinde hem artış hem de azalış gözlenmesi, değişen ortam koşullarına adaptasyonda olası uyum mekanizmalarının fonksiyon görmesi neden olabilir (McDonald ve Wood, 1993). Pelgrom ve ark. (1995), *O. mossambicus*'un iyon düzeylerine Cu^{+2} (50, 100, 200 µg/l), Cd^{+2} (20, 35, 70 µg/L) ve bu metallerin karışımlarının balığın tüm vücudundaki Na^{+} düzeylerinin azaltırken, Ca^{+2} düzeyini ise yüksek derişimlerde artırdığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da özellikle sert su ortamındaki Cu^{+2} ve Cd^{+2} etkisinde genel olarak Ca^{+2} düzeyi artış, Na^{+} düzeyi ise azalış göstermiştir. Genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesi organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için yarışmasından dolayı azalır (Pyle ve ark., 2002). Doğal ortamda Ca^{+2} ve Mg^{+2} metallerden daha fazla oranda bulunur. Ca^{+2} derişimi azaldıkça metallerin solungaç membranlarından pasif geçişi artar. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının hücre zarlarından alımı dengenin sağlanmasına neden olarak metallere karşı geçirgenliği azaltır.

Toplam metal düzeyi, tüm dokularda artış gösterirken, yumuşak su ortamındaki metal etkilerinde özellikle bağırsak ve böbrek dokusunda metal birikimi önemli ölçüde artmıştır. Bu durum da metallerin sertlik düzeyi daha düşük ortamlarda Ca^{+2} eksikliğine bağlı metallerin Ca^{+2} kanallarını bloke ederek dokularda birikmesi sonucu toksisitelerinin artması ile ilişkili olabilmektedir. Metal ve

kimyasal toksisitenin düzeyini değiştirebilen etmenler, ekzojen (pH, oksijen konsantrasyonu, sertlik ve sıcaklık gibi) veya endojen (türler, türlerin karakteristik özellikleri, habitat, besin tercihi, metabolik oran, yaş gibi) olabilmektedir. Mansouri ve Baramaki (2011), Hg^{+2} toksisitesinin tatlı su balığı *Capoeta fusca*'da su sertliği arttıkça azaldığını belirtmişlerdir. Aynı türle yapılan bir diğer çalışmada da su sertliği arttıkça Zn^{+2} ve Cu^{+2}'nun toksik etkisinin azaldığı ve bu nedenle de su sertliğinin balıklarda Cu^{+2} ve Zn^{+2}'nin toksik etkisi üzerine önemli derecede etkili olduğu vurgulanmıştır (Ebrahimpour ve ark., 2010). Laboratuarımızda daha önce yapılan diğer çalışmalarda da metallerin özellikle de Cd^{+2}'nin *O. niloticus* dokularında önemli oranda birikim gösterdiği gözlenmiştir (Atli ve Canli, 2003; Eroğlu ve ark., 2005; Atli ve Canli, 2008).

Organizma için hem gerekli hem de gerekli olmayan metaller ekotoksikolojide önemli bir yere sahiptir, çünkü bu metaller canlı organizmalar için yüksek derecede toksiktir ve hasar bırakırlar (Heath, 1987). Bütün sucul organizmalar doğrudan veya dolaylı olarak özellikle suyun kimyasal bileşimi gibi çevrenin fiziksel ve karakteristik özellikleri tarafından etkilenir (Gillis ve ark., 2008). Sucul sistemler karmaşık ortamlardır. Bunların belirteci olan balıklar; sucul sistemlerin sağlıklı olup olmadığının gösterir çünkü kimyasallar balıklarda birikebilir ve zararlı etkilere neden olabilir. Etkilerin derecesi kimyasalların etki süresine, dozuna ve türüne olduğu kadar aynı zamanda alkalinite, sertlik, pH, organik karbon miktarı ve sıcaklığa da bağlıdır (Ezemonye, 2008).

Bu çalışmanın sonuçları, çevresel etki değerlendirilmeleri yapılırken, su sertliğinin ve balıkların Na^{+}-K^{+}ATPaz'ların görev aldığı iyon regülasyonundaki değişikliklerin, sucul ortamlarda metal kirliliğinin tespitinde ve organizmalara olan etkilerinin belirlenmesinde, dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Tatlı su balığı *O. niloticus* sert ve yumuşak sularda 1.0 µg/mL derişimlerindeki Cd^{+2} ile Cu^{+2}'nun 0, 1, 7 ve 14 gün süreyle etkisine bırakılmıştır. Cu^{+2} etkisinde 7. günden itibaren balık ölümleri gözlenmiştir. Deney süreleri sonunda solungaç, bağırsak ve böbrek dokularında Na^{+},K^{+}-ATPaz aktiviteleri ile toplam metal ve iyon düzeyleri ölçülmüştür.

2. Sert ve yumuşak sularda yaşayan balıklarda solungaç, bağırsak ve böbrek Na^{+},K^{+}-ATPaz enzim aktiviteleri önemli oranda değişmiştir. Bu değişim ise su sertliği, metal türü, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle artış yönünde gerçekleşmiştir. Buna göre enzim aktivitesi açısından en çok solungaç dokusu etkilenirken, bunu sırasıyla böbrek ve bağırsak dokuları izlemiştir. Bununla birlikte enzim aktivitesi üzerinde Cd^{+2}, Cu^{+2}'ya göre daha etkili olmuştur.

3. Deney süreleri sonunda dokularda metal birikimlerinin gözlendiği, özellikle de yumuşak sudaki balıkların bağırsak ve böbrek dokularında Cd^{+2} ve Cu^{+2} düzeyinde sert suya göre önemli bir artış olduğu kaydedilmiştir

4. Toplam iyon düzeyleri de önemli ölçüde değişikliğe uğramış ve etkilenme düzeyine göre iyonlar $Mg^{+2} > K^{+} > Na^{+} > Ca^{+2}$ şeklinde sıralanmıştır. İyon düzeyleri de suyun sertliği, metal türü ve doku tipine göre artış ya da azalış göstermiştir.

5.2. Öneriler

1. Metal kirliliğinin yol açtığı etkilerin belirlenmesinde Na^{+},K^{+}-ATPaz yanında farklı biyokimayasal belirteçler de kullanılması önemli olabilir.

2. Su sertliğinin yanında, pH ve çözünmüş organik madde gibi suyun diğer fizikimyasal özelliklerinin de ATPaz'lar üzerine etkileri araştırılabilir.

3. Sucul ortamlardaki fizikokimyasal özelliklerin metal toksisitesine etkileri ayrıca saha çalışmaları ile desteklenebilir.

4. Metal toksisitesinin ayrıca DNA ve RNA yapısında yol açabileceği hasarı gözlemlemek amacıyla gen düzeyinde çalışmalar da yapılabilir.

KAYNAKLAR

ALMEIDA, J. A., NOVELLI, E. L. B, DAL PAI SILVA, M. and ALVES, J. R.,2001. Environmental Cadmium Exposure and Metabolic Responses of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus.* Environmental Pollution. 114-2, 169-175.

ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., and NOVELLI, E.L.B., 2002. The Use of The Oxidative Stres Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to In Vivo Cadmium Contamination. Environment International, 27: 673-679.

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.

ARIYOSHI, T., SHIIBA, S., HASEGAWA, H., and ARIZONO, K., 1990. Profile of Metal-binding Proteins and Heme Oxygenase in Red Carp Treated with Heavy Metals, Pesticides and Surfactants. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44: 643-649.

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

ATLI, G., CANLI, M., 2008. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathionein a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 282-287.

ATLI, G.,2009. Bakır,Çinko,Kadminyum,Krom ve Gümüşün *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,Ç.Ü. Doktora Tezi,Adana,206

ATSDR, 2006. Agenyc for Toxic Subtances and Disease Registry, CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Available at: http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html. Accessed Octaber, 05, 2006.

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.

BAYKAN, U., ATLI, G., and CANLI, M., 2007. The Effects of Temperature and Metal Expasures on the Profiles of Metallothionein-like in *Oreochromis niloticus.* Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 33-38.

BASHA, P.S., and RANI, A.U., 2003. Cadmium-induced Antioxidant Defense Mechanism in Freshwater Teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 218–221.

BERNTSSEN, M.H.G., WAAGBO, R., TOFTEN, H., and LUNDEBYE, A.K., 2003. Effects of Dietary Cadmium on Calcium Homeostasis, Ca Mobilization and Bone Deformaties in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr. Aquaculture Nutrition, 9; 175-183.

BIANCHINI, A., PLAYLE, R.C., WOOD, C.M., and WALSH, P.J., 2005. Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertebrates. Aquatic Toxicology, 72: 67–82

BUCKLEY, J. T., ROCH, M., McCARTER, J. A., RENDELL, C. A. And MATHERSON, A. T., 1982. Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper-I. Effects of Growth, on Accumulation and Distribution of Copper and on Copper Tolerance. Comp. Biochem. Physiol., 72 C (1): 15-19.

BURY, N.R., WALKER, P.A, and GLOVER, C.N., 2003. Nutritive Metal Uptake in Teleost Fish. The Journal of Experimental Biology, 206: 11-23.

CAMPANA, O., SARAQUETE, C. and BLASCO, J., 2003. Effect of Lead on ALAD Activity, Metallothionein Levels, and Lipid Peroxidation in Blood, Kidney and Liver of the Toadfish *Halobatrachus didactylus*. Ecotoxicol. and Environ. Safe., 55: 116–125.

CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of *İn 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., ATLI, G., 2003. The Relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe,Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. Environmental Pollution, 121: 129-136.

CARL F. WATSON and WİLLİAM H. BENSON, 1987. Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium, 252-259.

DANG, Z.C., BERNTSSEN, M.H.G., LUNDEBYE, A.K., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E., and LOCK, R.A.C., 2001. Metallothionein and Cortisol Receptor Expression in Gills of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Exposed to Dietary Cadmium. Aquatic Toxicology, 53: 91–101.

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.

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.

EBRAHİMPOUR M, ALİPOUR, H., and RAKHSHAH S., 2010. Influence of water hardness on acute toxicity of copper and zinc on fish.

ENGEL, D.W., and BROUWER, M., 1984. Trace Metal-binding Proteins in Marine Molluscs and Crustaceans. Marine Environmental Research, 13: 177-194.

EROĞLU, K., ATLI, G., and CANLI, M., 2005. Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 390-399.

EZEMONYE, 2008. Lethal toxicity of industrial chemicals to early life stages of *Tilapia guineensis*

FLIK, G. and VERBOST, P. M., 1993. Calcium Transport in Fish Gills and Intestine. J. Exp. Biol., 184: 17-29.

FLIK, G., VAN DER VELDEN, J.A., DECHERING, K.J., VERBOST, P.M., SCHOENMAKERS, T.J.M., KOLAR, Z.I., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} Transport in Gills and Gut of Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, A Review. The Journal of Experimental Zoology, 265: 356-365.

GARCIA-SANTOS, S., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and WILSON, J.M., 2006. Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure: Assessment of Some Ionoregulatory Parameters. Environment Toxicology, 21: 33-46.

GARDNER G. R. and YEVICH, P. P., 1970. Histological and Hematological Responses of Eustuarina Teleost to Cadmium. Journal of The Fisheries mResearch Board of Canada. 27: 2185-2196.

GROSELL, M., McDONALD, M.D., WALSH, P.J., and WOOD, C.M., 2004. Effects of Prolonged Copper Exposure in the Marine Gulf Toadfish (*Opsanus beta*) II: Copper Accumulation, Drinking Rate and Na^+-K^+ ATPase Activity in Osmoregulatory Tissues. Aquatic Toxicology, 68: 263-275.

GROSELL, M., WOOD, C.M., and WALSH, P., 2003. Copper Homeostasis and Toxicity in the Elasmobranch *Raja erinacea* and the Teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during Exposure to Elevated Water-borne Copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 135: 179–190.

GUYNN, S., DOWD, F., and PETZEL D., 2002. Characterization of Gill Na/KATPase Activity and Ouabain Binding in Antarctic and New Zealand Nototheniid Fishes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 131: 363-374.

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

HANDY, R.D., EDDY, F.B., and BAINES, H., 2002. Sodium-Dependent Copper Uptake Across Epithelia: A Review of Rationale with Experimental Evidence from Gill and Intestine. Biochimica Et Biophysica Acta, 1566: 104-115.

HILMY, A. M., SHABANA, M. B. and DAABEES, A. Y., 1985. Bioaccumulation of Cadmium: Toxicity in *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol., 81C(1): 139-143

HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 1998. Toward a Beter Understanding of the Bioavailability, Physiology, and Toxicity of Silver in Fish: Implications for water Quality Criteria. Environmental Toxicology and Chemistry, 17: 547–561.

HOLLIS, L., McGEER, J.C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M., 2000. Effects of Long Term Sublethal Cd Exposure in Rainbow Trout during Soft Water Exposure: Implications for Biotic Ligand Modelling. Aquatic Toxicology, 51: 93–105

HOYLE, I., SHAW, B.J., and HANDY, R.D., 2007. Dietary Copper Exposure in the African Walking Catfish, *Clarias gariepinus*: Transient Osmoregulatory Disturbances and Oxidative Stress. Aquatic Toxicology, 83: 62–72.

HU, H., (2000), Exposure to metals. Occupational and Environmental Medicine, **27:** 983-996

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.

JAVİD A, JAVED M, and ABDULLAH S.,(2007). Nickel bio-accumulation inthe bodies of *Catla catla, Labeo rohita and Cirrhina mrigala during 96-hr* LC_{50} *exposures. International Journal of Agriculture and Biology*, 9:139-142.

KİM AD, GU MB, ALLEN HE, AND CHA D., (2001). Physiochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia bulba to copper. Environmental Monitoring and Assessment*, 70:105-106.

KUHNERT, P.M., KUHNERT, B.R., and STOKES, R.M., 1976. The Effect of *İn vivo* Chromium Exposure on Na/K- and Mg-ATPase Activity in Several 187 Tissues of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 15 (4): 383-390.

LARSSON, A., BENGTSSON, B. E., and HAUX, C., 1981. Disturbed Ion Balance in Flounder, *Platichthys flesus* L., Exposed to Subletal Levels of Cadmium. Aquat Toxicol. 1:19-35.

LARSSON, 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.

LAUREN, D.J., and McDONALD, D.G., 1987. Acclimation to Copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44: 105-111.

LI, J., QUABIUS, E.S., WENSWLAAR BONGA, S.E., FLIK, G., and LOCK, R.A.C., 1998. Effects of Water-borne Copper on Branchial Chloride Cells and Na^+-K^+-ATPase Activities in Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Aquatic Toxicology, 43: 1–11.

LIU, H., WANG, W., ZHANG, J. and WANG, X. R. 2006. Effects of Copper and its Ethylenediaminetetraacetate Complex on the Antioxidant Defenses of the Goldfish, *Carassius auratus*. Ecotox. and Anviron. Saf. 65, 350-354.

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.

MANSOURİ, B., and BARAMAKİ R., 2011. Influence of Water Hardness and Ph on Acute Toxicity of Hg on Fresh Water Fish *Capoeta fusca* 3 (2): 132-136.

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. Effects of Chronic Sublethal Exposure to Waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow Trout. 1: Iono-regulatory Disturbance and Metabolic Costs. Aquatic Toxicology, 50: 231–243.

McGEER, J.C., SZEBEDINSZKY, C., McDONALD, D.G., and WOOD, C.M. ,2002. The Role of Dissolved Organic Carbon in Moderating the Bioavailability and Toxicity of Cu to Rainbow Trout during Chronic Waterborne Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 147–160.

MEINELT T., PLAYLE, R.C., PİETROCK M., BURNİSON B.K., WIENKE A., STEİNBERG 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.

MONTEIRO, S.M., MANCERA, J.M., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and SOUSAC, M., 2005. Copper Induced Alterations of Biochemical Parameters in the Gill and Plasma of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 141: 375 – 383.

OLSVIK, P.A., GUNDERSEN, P., ANDERSEN, R.A., and ZACHARIASSEN, K.E., 2001. Metal Accumulation and Metallothionein in Two Populations of Brown Trout, *Salmo trutta*, Exposed to Different Natural Water Environments during a Run-off Episode. Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology, 128 (2): 189-201.

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.

PENTTİNEN S, KOSTAMO A, and KUKKONEN JVK., (1998). Combined effects of dissolved organic metarial and water hardness on toxicity of cadmium to Daphnia manga. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 2498-2503.

PERIYASAMY, S.M., HUANG, W.H., and ASKARI, A., 1983. Origins of the Different Sensitivities of (Na^+-K^+)-dependent Adenosinetriphosphatase Preparations to Ouabain. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 76 (3): 449-454.

PERSCHBACHER PW., WURTS WA., (1999). Effects of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus. Aquaculture*, 172:275-280.

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.

PRATAP, H.B., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Effect of Ambient and Dietary Cadmium on Pavement Cells, Chloride Cells, and Na+/K+ATPase Activity in the Gills of the freshwater Telesot *Oreochromis mossambicus* at Normal and High Calcium Levels in the Ambient Water. Aquatic Toxicology, 26: 133-150.

PYLE GG., SWANSON SM., and LEHMKUHT DM., (2002). The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). Water , Air, and Soil Pollution, 133;:215-226.

RATHOR RS., KHANGAROT BS., (2003)Effects of water hardness and metal concentration on a fresh water Tubifex tubifex muller. Water, Air, and Soil Pollution 142:341-356.

RAVERA, O., 1984. Cadmium in Freshwater Ecosistems. Experientia. 40, 2-14.

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.

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

SCHJOLDEN, J., SORENSEN, J., NILSSON; G.E., and POLEO, A.B.S., 2007. The Toxicity of Copper to Crucian Carp (*Carassius carassius*) in Soft Water. Science of the Total Environment, 384: 239-251.

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

SILVESTRE, F., TRAUSCH, G., and DEVOS, P., 2005. Hyper-osmoregulatory Capacity of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Exposed to Cadmium; Acclimation during Chronic Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 140: 29–37.

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

SKOU, J.C., 1957. The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves. Biochimica Et Biophysica Acta, 23: 394–401.

SMET, H.D., WACHTER, B.D., LOBINSKI, R., and BLUST, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in Gills, Liver and Kidney of Common Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. Aquatic Toxicology, 52 (3-4): 269-281.

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.

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.

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.

TKATCHEVA, V., HYVARINEN, H., KUKKONEN, J., RYZHKOV, L.P., and HOLOPAINEN, J., 2004. Toxic Effects of Mining Effluents on Fish Gills in a Subarctic Lake System in NW Russia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 278–289.

USEPA, 2001. Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. EPA-822-R-01–001. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Washington, DC, USA.

VERBOST, P.M., FLIK, G., PANG, P.K.T., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1989. Cadmium Inhibition of the Erythrocyte Ca2+ Pump a Molecular Interpretation. The Journal of Biological Chemistry, 264: 5613-5615.

VIALE, G., and CALAMARI, D., 1984. Immune Response in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* After Long-term Treatment with Low Levels of Cr, Cd and Cu. Environmental Pollution, 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.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 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.

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.

ZAFARULLAH, M., OLSSON, P.E., and GEDAMU, L., 1990. Differential Regulation of Metallothionein Genes in Rainbow Trout Fibroblasts, RTG-2. Biochimica Et Biophysica Acta, 1049: 318-323.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana'da doğdu. İlköğretimine Tarsus'ta başlayıp ,Adana'da İsmet İnönü ilk okulunda tamamladı. Orta okulu Gazi ilköğretim okulunda tamamlayıp, lise öğrenimini İsmail Sefa Özler Almanca Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 2004 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu.

2008 yılı Eylül ayında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı.