ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Asu KIVRAKDAL

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cu, Cr) ETKİSİNDE KALAN FARKLI BÜYÜKLÜKTEKİ BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus)* ATPaz TEPKİLERİN BELİRLENMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cu, Cr) ETKİSİNDE KALAN FARKLI BÜYÜKLÜKTEKİ BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus*) ATPaz TEPKİLERİN BELİRLENMESİ

Asu KIVRAKDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ..../...../2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza:.....	İmza:.....	İmza:.....
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Yrd. Doç. Dr. Mehmet SULANÇ	Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEF2009YL23

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

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL (Cu, Cr) ETKİSİNDE KALAN FARKLI BÜYÜKLÜKTEKİ BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus)* ATPaz TEPKİLERİN BELİRLENMESİ

Asu KIVRAKDAL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Mustafa CANLI

Yıl: 2010, **Sayfa:** 86

Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI

Yard.Doç.Dr. Mehmet SULANÇ

Yard.Doç.Dr. Gülüzar ATLI

Farklı büyüklüklerdeki tatlısu balığı *Oreochromis niloticus* farklı sertlik değerlerine sahip sularda, farklı sürelerde, farklı bakır ve krom derişimlerinin etkisilerine bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda solungaç dokusunda Na^{+},K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Total-ATPaz aktiviteleri, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Bununla beraber doku total protein düzeyleri ve total metal birikimi de ölçülerek ATPaz enzimlerinin farklı koşullarda metallere karşı verdikleri tepkiler belirlenmeye çalışılmıştır.

Akut (48 saat, 20 µM metal) ve uzun süreli (144 saat, 10 µM metal) deneyler sonunda ATPaz aktivitelerinde metale, su sertliğine ve balık büyüklüğüne bağlı olarak önemli değişimler olmuştur. Genellikle sert suda yaşayan kontrol balıkların ATPaz aktiviteleri yumuşak suda yaşayanlara göre önemli oranlarda yüksek bulunmuştur. Yumuşak suda yaşayan balıkların sert suda yaşayanlara göre metal etkisine, özellikle bakıra daha hassas oldukları görülmüştür. Bu etkilenme küçük balıklarda daha fazla olmuştur. Akut ve uzun süreli metal etkileri göz önüne alındığında, ATPaz'ların akut metal etkilerine daha hassas oldukları görülmüştür. Total protein düzeyi hem solungaç hem kas dokusunda genelde değişmemiştir. Dokularda metal birikimi gözlemlenmesine rağmen, birçok durumda da metal birikimi özellikle krom ölçüm sınırlarının altında kalmıştır. Doku iyon düzeyleri de genelde önemli bir değişim göstermemiştir.

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

ABSTRACT
MSc THESIS

DETERMINATION OF ATPase RESPONSES IN DIFFERENT SIZES OF FISH (O*reochromis niloticus*) TO METALS (Cu, Cr) IN WATERS WITH DIFFERENT HARDNESS

Asu KIVRAKDAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa CANLI

Year: 2010, **Page**: 86

Jury: Prof. Dr. Mustafa CANLI

Asist. Prof. Dr. Mehmet SULANÇ

Asist. Prof. Dr. Gülüzar ATLI

Freshwater fish *Oreochromis niloticus* with different sizes were individually exposed to different copper and chromium concentrations in water with different hardness in different exposure periods. At the end of exposure periods, Na^{+},K^{+}-ATPase, Mg^{+2}-ATPase and Total-ATPase activities in the gills and Ca^{+2}-ATPase activity in the muscle were measured. Moreover, levels of total protein and metal accumulation in the tissues were determined and consequently responses of ATPases to metal exposures under different conditions were evaluated.

There were changes in ATPase activities in relation to water hardness and fish size in both acute (48 hours, 20 µM metal) and longer (144 hours, 10 µM metal) exposure periods. Generally, control fish living in hard water showed higher ATPase activities comparing to soft water. Fish living in soft water were more sensitive to metals especially to copper exposures than fish living hard water. Profound effects were determined in smaller fish. It seemed that ATPases more affected in acute exposures when compared to longer exposure periods. Generally, total protein levels did not change in both the gill and muscle. Metal accumulation occurred in the tissues, though chromium levels were below detection limits in most cases. In general, tissue ion levels did not also change significantly

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını benden esirgemeyen, bilimsel vizyonumu geliştiren ve biyolojiye daha derin bakmamı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bu süreçte her anlamda yol göstermiş olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Gülüzar ATLI'ya ve Yrd. Doç.Dr. Mehmet SULANÇ'a önerileri ve yardımları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni sevgileriyle ve destekleriyle bugüne getiren sevgili annem Semra KIVRAKDAL ve babam Mustafa KIVRAKDAL'a sonsuz minnetlerimi sunar, 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. Krom.....4
1.3. Adenozin Trifosfataz (ATPaz) Enzimleri.....5
1.4. İyonlar……....8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....11
3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 14
3.1. Materyal..... 14
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler..... 14
3.1.1.1. Metaller ve Asitler…..... 14
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar..... 14
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar…… 15
3.1.2. Kullanılan Aletler.....15
3.2. Yöntem..... 15
3.2.1. Deneylerin yapılışı.....16
3.2.2. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı..……17
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini ..…….……... 18
3.2.4. Total Protein Analizi.....19
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması……..22
3.2.6.Ağır Metal ve İyon Analizleri ……...22
3.2.7.Ağır Metal Derişiminin Hesaplanması…….. 23
3.2.8. İyon derişiminin Hesaplanması……. 25
3.2.9. İstatistiksel Analizler …….. 29

4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... 30
4.1. Bulgular..... 30
4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler …….....30
4.1.1.1. Kontrol Küçük Balıklarda ATPaz Aktivitesi……...30
4.1.1.2.Kontrol Büyük Balıklarda ATPaz Aktivitesi……30
4.1.1.3. Bakır Etkisinde Kalan Balıklar……31
4.1.1.4. Krom Etkisinde Kalan Balıklar ……32
4.1.2. Uzun Süreli (144 saat) Metal Etkisi ……..34
4.1.2.1. Kontrol Küçük Balıklarda ATPaz Aktivitesi …….34
4.1.2.2. Kontrol Büyük Balıklarda ATPaz Aktivitesi……..34
4.1.2.3. Bakır Etkisinde Kalan Balıklar……...35
4.1.2.4. Krom Etkisinde Kalan Balıklar……...36
4.1.3. Total Metal Düzeyi……48
4.1.4. Total İyon Düzeyi…….....48
4.1.5.Total Protein Düzeyi……..50
4.2. Tartışma.....62
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....72
5.1.Sonuçlar.....72
5.2. Öneriler.....72
KAYNAKLAR.....74
ÖZGEÇMİŞ.....86

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. Akut (48 saat 20 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel sonuçları ……...46

Çizelge 4.2. Uzun süreli (144 saat 10 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel sonuçları ……..46

Çizelge 4.3. Akut (48 saat 20 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin % olarak hesaplanması ……...47

Çizelge 4.4. Uzun süreli (144 saat 10 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin % olarak hesaplanması …..47

Çizelge 4.5. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……..51

Çizelge 4.6. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……..52

Çizelge 4.7. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……53

Çizelge 4.8. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……54

Çizelge 4.9. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……55

Çizelge 4.10. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri ……56

Çizelge 4.11. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri 57

Çizelge 4.12. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri 58

Çizelge 4.13. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'da Cu ve Cr birikimi, iyon ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait istatistiksel sonuçlar…….59

Çizelge 4.14. Yumuşak ve sert su ortamında ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'da Cu ve Cr birikimi, iyon ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait istatistiksel sonuçlar…….60

Çizelge 4.15. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'ın solungaç dokusunda toplam protein miktarları (mg/g yaş ağırlık) …….61

Çizelge 4.16. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'ın kas dokusunda toplam protein miktarları (mg/g yaş ağırlık) …….61

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Ağır metallerin balık dolaşım sistemine alındıktan sonra izleyebileceği olası yollar üzerine şematik bir şekil…….. 5

Şekil 1.2. Na^+/K^+-ATPaz tarafından Na^+ ve K^+ iyonlarının taşınma mekanizmalarına ait şematik görüntü ……....7

Şekil 1.3. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz enzmine ait şematik görüntü…….. 7

Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……18

Şekil 3.2. Sığır albumininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……..21

Şekil 3.3. Bakır derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki …… 24

Şekil 3.4. Krom derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki ……25

Şekil 3.5. Na^+ derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……...26

Şekil 3.6. K^+ derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki…….....26

Şekil 3.7. Mg^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki …… 27

Şekil 3.8. Ca^{+2} derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki……..27

Şekil. 4.1.Akut (48 saat 20 µM) periyotda bakır etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi …….....38

Şekil. 4.2. Akut (48 saat 20 µM) periyotda bakır etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi…….39

Şekil. 4.3. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda bakır etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi…….40

Şekil. 4.4. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda bakır etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz,

Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi ……41
Şekil. 4.5. Akut (48 saat 20 µM) periyotda krom etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi ……42
Şekil. 4.6. Akut (48 saat 20 µM) periyotda krom etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi ……43
Şekil. 4.7. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda krom etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi ……44
Şekil. 4.8. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda krom etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi ……45

1. GİRİŞ

Doğal ve insan kaynaklı (endüstri, ziraat, madencilik vs.) olabilen bakır, civa, krom, kurşun, kadmiyum vb ağır metaller farklı formlarda (katı, sıvı, gaz) çevreye salınmaktadır. Kaynağı ne olursa olsun, çevreye salınana ağır metaller, yağmur sularının yıkayıcı etkisi ile sucul ekosistemlere taşınmakta, orada birikmekte ve böylece ekolojik tehlike oluşturmaktadır. Herhangi bir şekilde çevreye salınan ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılmasının zorluğu göz önüne alındığında, çevre kirliliğindeki önemi ve tehlikesi daha da iyi anlaşılmaktadır.

Sucul organizmalar, özellikle denizlere oranla su hacmi çok daha düşük olan ve bu nedenle kirlenme potansiyeli yüksek olan tatlı sularda yaşayanlar, ağır metal kirliliği tehdidine daha yüksek oranlarda maruz kalabilmektedir. Civa, kadmiyum, kurşun ve gümüş gibi bazı ağır metallerin canlı organizmalar için gerekli olduğuna ilişkin herhangi bir kanıt bulunamamaktadır. Bunun yanında bakır, çinko, krom ve demir gibi diğer ağır metaller ise organizmalar için alınması zorunlu metallerdir ve bunların yokluğunda birçok metabolik reaksiyonun gerçekleşme olanağı ortadan kalkmaktadır. Ağır metaller herhangi bir yolla vücuda alındığında, metabolik yollar bu metalleri besin değerlerine veya toksik özelliklerine dayanarak elimine etmekte, alıkoymakta ya da bu metallerden faydalanabilmektedir (Engel ve Brouwer, 1984). Metabolizma için gerekli olan metaller ya organizmanın bulunduğu ortamdan direkt olarak, ya da besinle organizmaya girebilirler. Dolaşım sistemi tarafından emilimlerinin ardından metaller normal metabolizmada kullanıldıkları, atıldıkları veya alı kondukları spesifik organlara taşınmaktadırlar. Bu metallerin alınım yolları onların dokulara dağılımını da etkileyebilmektedir (Engel ve Brouwer, 1984; Brouwer ve ark., 1986).

Metabolizma için gerekli olan ağır metaller gereğinden fazla alındığında ve gereksiz metaller en düşük dozlarda bile alındıklarında organizmada çeşitli reaksiyonlarla ya belirli moleküllere bağlanarak etkisizleştirilmekte ya da atılarak uzaklaşması sağlanmaktadır. Böylece biyolojik öneme sahip moleküllerle etkileşimleri önlenmektedir (Engel ve Brouwer, 1984). Çevreden alınan metaller genellikle proteinlere bağlanarak kan yoluyla, depo bölgelerine veya transformasyon yada depolama için karaciğere taşınmaktadır. Karaciğer tarafından transforme edilen

metaller burada depolanmakta veya safraya gönderilmekte yada böbrekler tarafından atılmak üzere kana geri dönmektedir (Şekil 1.1.).

Sucul organizmalar suda bulunan ağır metallerle sürekli etkileşim içerisinde olduklarından, onların potansiyel zararlı etkileri ile belkide en fazla karşı karşıya gelen organizmalardır. Ağır metallerin balık biyokimyasında ve fizyolojisinde önemli değişimlere neden olmakta ve onların işleyiş mekanizmalarını bozabilmektedir. Özellikle yapısal moleküllere veya enzimlerin fonksiyonel gruplarının (imidazol, histidil, karboksil ve sülfidril gibi) etkin olan bölgelerine bağlanabilen ağır metaller, enzimlerin üç boyutlu yapısını değiştirerek enzim aktivitelerinde bir azalmaya veya artışa neden olabilmektedir (Heath, 1987; Atli ve Canli, 2007; Oner ve ark., 2008). Vücuda herhangi bir yolla alınan ağır metallerin toksik etkileri, metabolik, depolama, detoksifikasyon ve atılım mekanizmalarının alınım oranına yetemedikleri durumda ortaya çıkmaktadır (Ay ve ark., 1999).

Ağır metallerin balıklardaki biyolojik etkileri belirlerken kullanılan moleküler ve hücresel biyoindikatörler, ekotoksikolojik çalışmalarda son yıllarda giderek önem kazanmaktadır (Monserrat ve ark., 2007). Çünkü bu biyoindikatörler metallerin neden olduğu strese hızla tepki verdiklerinden organizmaların sağlık durumlarının değerlendirilmesinde etkin bir şekilde kullanılabilmektedirler. Ancak ağır metallerin etkileri; metal tipi ve derişim, etkide kalma süresi, balık türü, suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri gibi birçok faktöre bağlıdır.(Heath, 1987). Özellikle suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak metal toksisitesinde meydana gelen değişimler son yıllarda ilgi çeken konular arasındadır. Bunlardan tuzluluk, alkalinite, sertlik, organik karbon miktarı ve pH sudaki serbest metal oluşumunu ve dolayısıyla da balıklar tarafından emilimini etkilemektedir (Lauren ve McDonald, 1986; Heath, 1987). Metal toksisitesinin sudaki EDTA, hidroksit, karbonat ve humik asit gibi şelat oluşturucu ajanların varlığında azaldığı ve aynı zamanda sert sulara göre yumuşak sularda da artış gösterdiği bilinmektedir (Meinelt ve ark., 2001). Balıklar ortamdaki metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorbsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Viarengo, 1989). Solungaçlar gaz alış verişi, asit baz dengesi, iyon (Na^+, Cl^- ve Ca^{2+}) taşınması ve nitrojenli atıkların atımında görev alan çok fonksiyonlu bir organdır. Karaciğer, dalak ve böbrek ise, su veya diyet kaynaklı

uzun süreli metal etkisinde zarar gören organlardır (Olsvik ve ark., 2001). Metabolik bakımdan aktif olan bu organların birikimde öncelik göstermesi, ağır metallerin metabolizmayı etkilemesi ve bu organların metal detoksifikasyonu ile yakından ilişkili olmalarından ileri gelmektedir (Sarkar ve ark., 1989). Akut metal etkisi sonucu balıklarda en fazla hasar gören organın solungaç olduğu kabul edilmektedir. Çünkü solungaçlar çevredeki metal iyonları ile direkt olarak ve sürekli etkileşim içerisindedirler (Olsvik ve ark., 2001). Karaciğer, dalak ve böbrek ise, su veya diyet kaynaklı uzun süreli metal etkisinde zarar gören organlardır (Spry ve Wiener, 1991; Olsvik ve ark., 2001). Kas ise genellikle ağır metal birikim organı olarak kabul edilmemekle birlikte, civa gibi ağır metallerin birikiminde önemli yer tutan bir dokudur (Canlı ve Erdem 1994).

1.1. Bakır

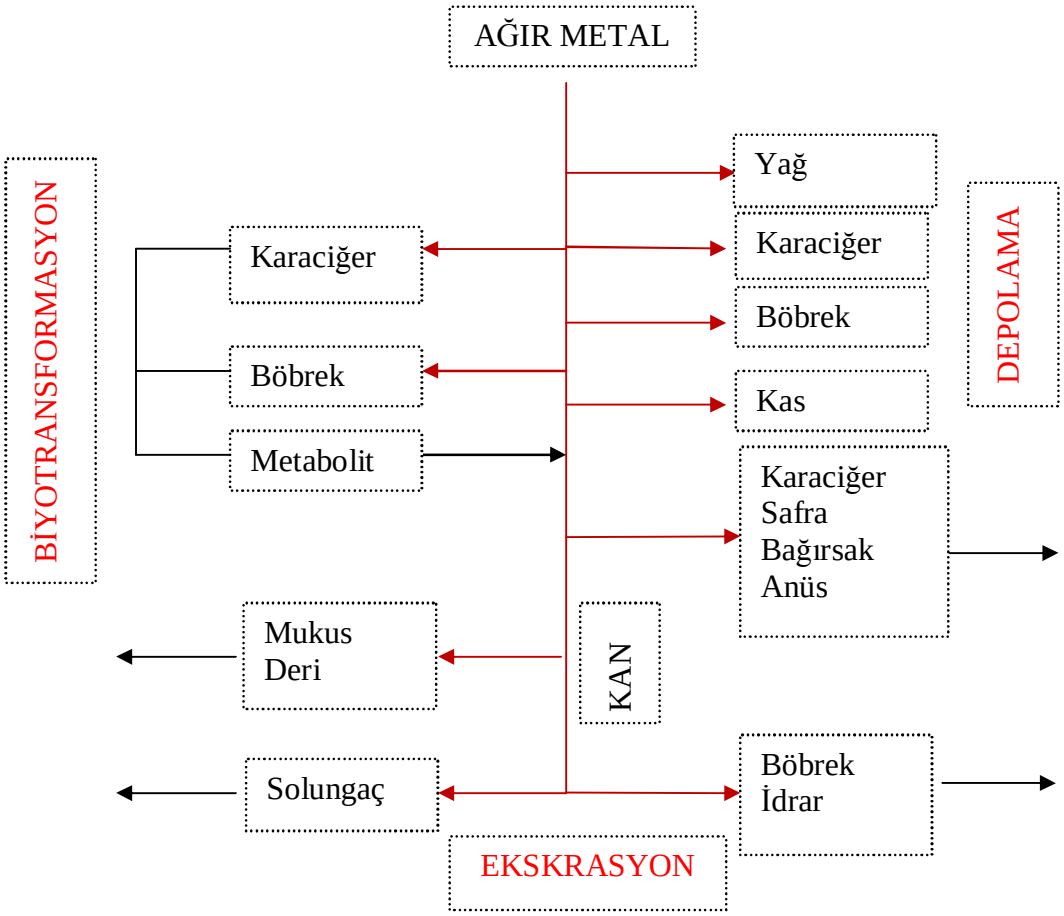
Bakır, endüstrinin bir çok alanında kullanılmaktadır. Bunlar arasında elektrik endüstrisi, alaşım, kimyasal katalizör, boya, algisit ve ahşap koruyucu yapımı gibi çeşitli alanlar sayılabilir. Biyolojik olarak bakır tüm ökaryotik hücrelerin solunumları için gerekli bir metalloenzim bileşenidir. Bakır bir çok enzimin yapısına girerek önemli fonksiyonlar üstlenmiştir. Bunlar arasında askorbik asit oksidaz, sitokrom oksidaz, lizil oksidaz, monoamin oksidaz, superoksit dismutaz enzimleri sayılabilir. Ayrıca omurgalıların kan plazmasında bulunan seruloplazmin, beyinde bulunan serebrokuprein, karaciğerde hepatokuprein bakır içeren proteinlerdir. Omurgasız hayvanlardan arthropodlarda solunum pigmenti olan hemosiyanin bakır içeren bir solunum pigmentidir (George, 1991).

Yapılan araştırmalar bakırın tatlı su balıklarında toksik etkilerinin ilk olarak solungaçlarda olduğunu göstermiştir. Bakır birikimini düzenleyen organlar arasında karaciğer, solungaç ve bağırsaklar başta gelmektedir (Kamunde ve ark., 2002; Gagnon ve ark., 2006). Mide ve bağırsak çeperinden kan plazmasına geçen bakır, bu esnada öncelikle Na^{+}' ya duyarlı yolları tercih eder. Daha sonra plazma içerisinde albumin ve aminoasitlerle zayıf bağ yaparak karaciğere ve böbreklere taşınır. Bakır metabolizma için gerekli bir ağır metal olmasına karşın fazlası toksik etki

göstereceğinden karaciğerde metallothioneinlere bağlanarak depo edilir ve seruloplazmin aracılığıyla diğer dokulara taşınır (Cousins, 1985; Viarengo, 1989). Diğer metallerde de olduğu gibi besin yoluyla alınan bakırın su yoluyla alınan bakırdan daha az toksik olduğu bilinmektedir. Bakır toksisitesi genellikle balıklarda büyüme geriliğine, solunum hasarına, iyon kaybına, besin alımında bir azalmaya, solungaç ve böbrek dokularında histolojik değişikliklere ve sonuçta ölüme neden olabileceği bildirilmiştir (McGeer ve ark., 2000; Handy ve ark., 2002).

1.2. Krom

Krom insan yaşamında çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle krom tabaklama endüstrisi krom kirliliğinin en önemli kaynaklarından biri olarak gösterilmektedir. Yer kabuğunda yaygın olarak bulunan bir element olan kromun biyolojik olarak önemli olan ve doğada en stabil formları Cr^{+3} ve Cr^{+6} olmasına karşın, +2'den +6'ya kadar çeşitli formlarda bulunmaktadır. Trivalent Cr gerekli bir eser elementken, hekzavalent Cr esansiyel olmayan, toksik ve kanserojen özellikte olup, alerjik reaksiyonlara, dermatite, sindirim kanalı, karaciğer ve böbrek hasarına yol açmaktadır (Tagliari ve ark., 2004). Cr^{+6}'nın, Cr^{+3} ile karşılaştırıldığında daha toksik olması biyolojik olarak aktif Cr^{+6}'nın daha hızlı alımından kaynaklanmaktadır (Arunkumar ve ark., 2000). Kromun (Cr^{+6}) glukoz toleransı, hiperglisemi, glikozuri ve hipoglisemiye neden olarak karbohidrat metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (Pan ve ark., 2003). Kromun balıklardaki toksik etkilerinden biri de balıklardaki bağışıklık sistemine olan etkisidir. Bu etki viral mücadele esnasında kromun balığın humoral bağışıklık cevabını baskılaması şeklinde olmaktadır (O'Neill, 1981). Ayrıca alkalen fosfataz ve Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinin Cr^{+6} toksisitesine gösterdikleri duyarlılık nedeniyle önemli belirteçler olarak kullanılabileceğini bildirilmiştir (Boge ve ark., 1989).



Şekil 1.1. Ağır metallerin balık dolaşım sistemine alındıktan sonra izleyebileceği olası yollar üzerine şematik bir şekil (Heath, 1987).

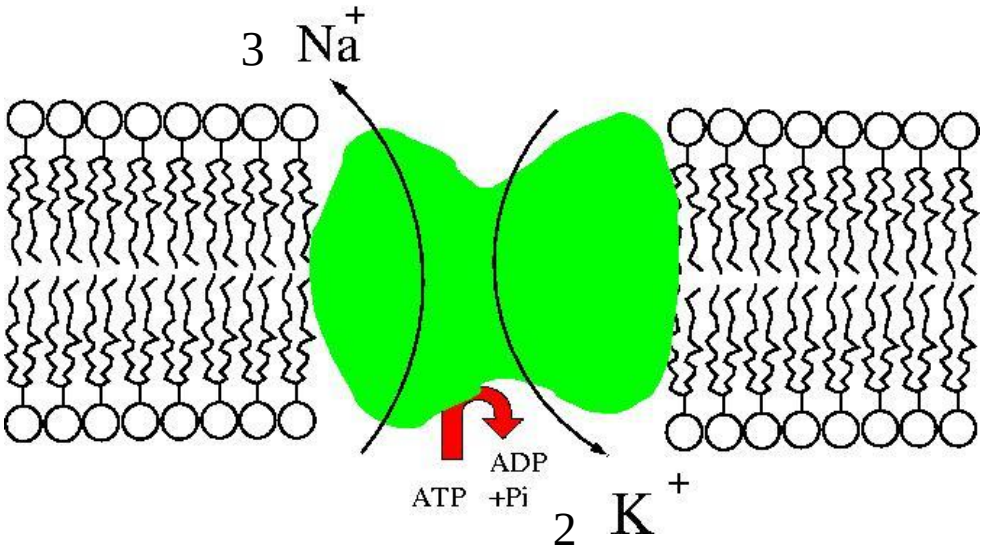
1.3. ATPaz Enzimleri

İyon dengesinin korunması için gerekli olan ve ATP tarafından sağlanan enerjiye gereksinim duyan Na^+/K^+-ATPaz, balıkların osmoregülatör dokuları olan solungaç, böbrek ve bağırsak epitelinde anahtar rolü üstlenen önemli bir enzimdir. Bu enzim, 3 Na^+ iyonunu hücre dışına, 2 K^+ iyonunu ise hücre içine transfer etmek için ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır. Bu sayede hücrede veya hücre ile hücre dışı ortam arasında iyon taşınımı ve elektrokimyasal gradientin

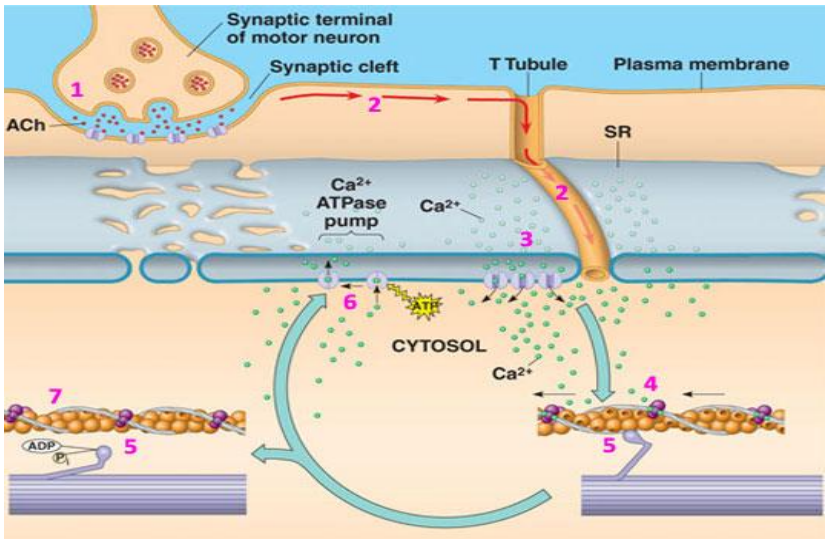
korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir (Şekil 1.2.). Na^+/K^+-ATPaz'ın ağır metallerin hem in vivo hem de in vitro etkilerine çok duyarlı olduğu gösterilmiştir (Canli ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003; Atlı 2009). Metaller, moleküler yapı ve enzimlerin fonksiyonel gruplarının etkinliğine bağlı olarak enzim sistemlerine bağlanabilmektedir. Enzim molekülü üzerindeki aktif bölgelere metallerin bağlanması, enzim aktivitelerinde inhibisyon veya uyarılma ile sonuçlanmaktadır (Watson ve Beamish, 1981). Ca^{+2}-ATPaz hücrede sarkoplazmik retikulum tübüllerinde bulunur. Hücre membranının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2}'nin nM düzeylerindeki miktarlarında aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2}'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücresel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Şekil 1.3.). Ca^{+2}-ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile enzim aktivitesinin ölçümü, kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Wong ve Wong, 2000). Hücre zarının bütünlüğü ve geçirgenliğinin stabilizasyonunda önemli göreve sahip Mg^{+2}'nin taşınmasında görev alan Mg^{+2}-ATPaz iyon regülasyonunda önemli bir göreve sahiptir (Canli ve Stagg, 1996).

Ağır metallerin ATPaz enzimleri üzerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Atli and Canli, 2007). Özellikle bakır, gümüş, kadmiyum, çinko ve cıva gibi ağır metallerin teleost balıklarda ATPaz inhibisyonuna neden olarak osmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları görülmüştür (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2005). Örneğin 14 gün kadmiyum (1.6 mg Cd/L) etkisinde kalan *Cyprinus carpio*'nun solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin % 30 inhibe olduğu, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 70 oranında arttığı gösterilmiştir. Balıklar Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün bekletildiğinde sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol düzeyine yaklaştığı gözlenmiştir (De la Torre ve ark. 2000). Benzer şekilde, Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0.5-4.0 mg/L) etkisinde 14 gün kalan *Tilapia zillii*'nin solungacında Na^+/K^+-ATPaz enzim aktivitesinin önemli oranda azaldığını göstermiştir. Atli ve ark. (2007), *Oreochromis niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkileri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz

aktivitesini ölçmüşlerdir. Enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğu, yalnızca solungaçta 20 µM Pb^{+2} etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2}-ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir.



Şekil 1.2. Na^+,K^+-ATPaz tarafından Na^+ ve K^+ iyonlarının taşınma mekanizmalarına ait şematik görüntü (www.wikipedia.com).



Şekil 1.3. Sarkoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz enzmine ait şematik görüntü.

1.4. İyonlar

ATPaz aktivitesinde meydana gelebilecek değişimlere bağlı olarak iyon dengesinde de önemli oranda artış yada azalışlar olabilmektedir. Pelgrom ve ark. (1995), *Oreochromis mossambicus*'un ağır metallerin plazma ve tüm vücut Na^{+}, Ca^{2+} ve Cl^{-} düzeylerini değiştirdiğini göstermiştir. Benzer şekilde ağır metal etkisinde kalan *Oreochromis niloticus*'un serum Na^{+}, Mg^{+2}, Ca^{+2} ve Cl^{-} düzeylerinde önemli oranda değişimler meydana gelmiştir (Oner ve ark., 2008). Humik maddeleri ve Ca^{+2}'nin zebra balığı *Danio rerio'*da Cd^{+2} toksisitesine olan etkisinin incelendiği çalışmada Ca^{+2} ve humik maddelerinin balığı Cd^{+2} toksisitesine karşı koruduğu gözlenmiştir. Cd^{+2}'nin Ca^{+2}'ye göre humik maddelerine daha ilgili olduğu ve bu nedenle de humik maddelerinin fonksiyonel gruplarının Cd^{+2} ile dolarak koruyucu bir rol üstlendiği ve metallere karşı detoksifikasyon potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir (Meinelt ve ark., 2001). McGeer ve ark. (2002) , Cu^{+2} etkisindeki *Onchorhynchus mykiss* ile yaptıkları çalışmada çözünmüş organik madde varlığında etki süresi sonunda plazma Na^{+} düzeyinde gözlenen düzelmenin artan Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile ilişkili olabileceğini kaydetmişlerdir. Sonuç olarak araştırıcılar balıkta büyüme, dokulardaki Cu^{+2} birikiminin kronik Cu^{+2} etkilerini değerlendirmede zayıf bir belirteç olduğunu ve humik maddelerin kronik Cu^{+2} etkinliği, birikim ve toksisitelerini azaltarak düzenleyici rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın diğer metallere göre yüksek toksisiteye sahip Ag^{+} etkisindeki *O. mykiss*'de vücut Na^{+} düzeyindeki düşüşü içeren iyonoregülatör hasarla ilişkili gözlenen balık ölümlerinde çözünmüş madde varlığındaki azalışın gözlenmesine karşın, Na^{+} ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivite düzeyine bağlı iyonoregülatör hasarı önlemede bunların yetersiz kaldığı kaydedilmiştir (Brauner ve Wood ve ark., 2002). Cleveland ve ark. (1991) Ca^{+2} derişimi ve pH düzeylerindeki azalmanın balıkta iyon düzenlenmesinde hasara özellikle de Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, P ve Cl^{-} düzeylerinde indirgenmeye yol açtığını kaydetmişlerdir.

Çevre toksikolojisi açısından, sadece bir ekosistem bileşeni değil aynı zamanda insan beslenmesinde önemli bir besin kaynağı olan balıklar, oldukça değerli birer test modeli olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, tatlı su balığı

Oreochromis türlerinin tatlı su kültür balığı olarak yaygın kullanımları ve dirençli bir tür olmaları nedeniyle tuzluluk çalışmalarında iyi bir model olduğunu göstermiştir (Sardella ve ark. 2004; Kamal ve Mair 2005).

Fizikokimyasal analizlere dayanan tatlı su kirliliği ile ilgili klasik çalışmalara ek olarak, su toksisitesinin tanımlanması için yeni yaklaşım ve araçları belirleme çalışmaları yapılmaktadır. Doku ve vücut sıvılarında kimyasal maddelerin analizi, toksik metabolitler, enzim aktiviteleri ve diğer biyokimyasal değişkenler biyolojik sistemlerle toksik madde etkileşimlerini belirlemede sıklıkla kullanılması önerilmektedir (Monserrat ve ark. 2007). Bu bilgiler ışığında ATPazlar gibi osmoregülatör enzimler üzerinde ağır metallerin inhibitör etkileri sucul organizmalarda yararlı belirteçler olabilmektedir (Blanchard ve Grosell, 2006).

Sucul ortamlar metal kirliliğinin araştırılması amacıyla sıklıkla gözlenmesine karşın, sudaki metal düzeylerinin belirlenmesi özellikle subletal metal etkilerinde kirlilik düzeyi hakkında tek başına yeterli bilgi sağlamamaktadır. Bu amaçla metal kirliliğinin daha iyi değerlendirilmesinde su organizmalarının dokularında aynı zamanda bazı fizyolojik parametrelerin kullanımı da gerekmektedir. Akuatik toksikolojide biyokimyasal belirteç kullanımı eser metallerin toksisitesini belirlemede oldukça yaygındır. Bazı araştırıcılar metale duyarlı belirteçlerin metallothionein uyarılmasını, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz inhibisyonu ve elektrolit düzeyindeki değişiklikleri içerdiğini belirtmişlerdir. Bu belirteçler, kullanıldığında organizmaların toksik metallerin etkisinde kalıp kalmadığını ve metallerin biyolojik yan etkilere neden olan ajanlar olup olmadığını belirlemede yardımcı olabilmektedir (Bouskilla ve ark., 2006; De la Torre ve ark. , 2000). Solungaç ATPaz aktiviteleri, bu enzimlerin dış ortamla doğrudan ilişkili ve metal etkilerinin hedefi olmalarından dolayı metal kirliliğinin belirlenmesinde duyarlı belirteçler olarak kullanılabilir (Canlı ve Stagg, 1996; Wang ve ark., 2002).

Sucul ekosistemlerde kimyasalların biyolojik etkileri sadece geleneksel olarak akut toksisite testlerine ait veriler bazında değerlendirilirse, bu veriler subletal etkilerin yol açtığı zararların tanımlanmasında yetersiz olabilir (Bury ve ark., 2003). Nil çuprası *Oreochromis niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuarda çalışılması ve toksikolojik araştırmalarda kirleticilere olan olası uyumların çalışılmasındaki

kolaylıklar nedeniyle iyi bir biyolojik model olarak tanımlanan en önemli balık gruplarından birine ait bir türdür (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). Bununla birlikte Tilapia (tatlı su çuprası), tatlı sudan deniz suyuna kadar oldukça geniş tuzluluk değerlerinde yaşayabilen bir örihalin balık türüdür (Sardella ve ark., 2004; Kamal ve Mair, 2005). Kolayca üreyebilmesi ve beslenme problemi olmaması nedeniyle önemli bir kültür balığı olan *O. niloticus*, çevresel kirliliğe karşı da oldukça dirençlidir (Sarıhan ve Toral, 1982; Canlı ve Erdem, 1994).

Biyolojik belirteçlerin çeşitli toksik moleküllere gösterdikleri tepkileri değerlendirirken abiyotik faktörlerin etkilerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Monserrat ve ark., 2007). 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 (Heath, 1987; Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar-Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000).

Bu çalışmada iki farklı sertlik değerine sahip tatlısu ortamlarında ağır metal stresi altında yaşayan tatlı su balıklarının osmoregülasyon sistemindeki değişimler araştırılacaktır. Model balık olarak bir tatlı su balığı olan *Oreochromis niloticus* kullanılacaktır. *Oreochromis niloticus* farklı sertlik değerlerine sahip ortamlarında (82 mg $CaCO_3$/L ve 300 mg $CaCO_3$/L), bakır ve krom (10 ve 20 µM) etkisinde 2 gün ve 6 gün sürelerle tutulacaktır. Bu süreler sonunda balıkların solungaç ve kas dokularında ATPaz enzimlerinin (Total-ATPaz, Na, K-ATPaz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz) aktiviteleri ölçülecektir. Dokularda Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++} ve Cl^- iyonu ölçümleri de yapılarak iyon dengesinin yukarıda belirtilen etmenlerden hangi ölçülerde etkilendiği belirlenmeye çalışılacaktır. Ayrıca doku metal birikim düzeyleri de belirlenerek, bunun enzim aktiviteleri ve iyon düzeyleri arasındaki ilişkileri de ortaya konacaktır. Böylece, bu enzimlerin ve iyon miktarlarının ağır metal etkisinde kalan büyük ve küçük balıkların osmoregülasyon sisteminin yumuşak ve sert sularda ne tür bir tepki verdiği belirlenerek, bu enzim aktivitelerinin hassas bir biyoindikatör olarak kullanılabilme potansiyeli de belirlenmeye çalışılacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pelgrom ve ark. (1995), tatlısu balığı *Oreochromis mossambicus*'u bakır (50, 100, 200 µg/l), kadmiyum (20, 35, 70 µg/L) etkisine 6 gün süreyle bırakmışlardır. Deney sonunda balıkların plazma Na^{+}, Cl^{-} ve Ca^{+2} düzeylerinin önemli düzeyde azaldığını, ayrıca balığın tüm vücut Na^{+} düzeylerinin de azaldığını, buna karşın Ca^{+2} düzeyinin ise yüksek derişimlerde artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Fuentes ve ark. (1996), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss* 'in iki farklı boy grubuna sahip bireylerin farklı tuzluluk değerlerine sahip ortamlarda ATPaz enzim aktivitelerinin nasıl etkilendiğini araştırmışlardır. Küçük balıkların böbrek Na^{+},K^{+}-ATPaz aktivitesinin tuzlu suya transferden sonra arttığı buna karşın, büyük balıkların bu transferden etkilenmediğini gözlemlenmiştir. Benzer şekilde Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi de belirli düzeylerde artış göstermiştir. Büyük balıkların Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi de herhangi bir şekilde tuzluluk artışından etkilenmemişlerdir.

Li ve ark., (1998) , 28 gün boyunca *Oreochromis mossambicus*'u 3.2 µM bakır etkisinde bıraktıktan sonra, solungaç dokusunda bulunan klorit hücre sayısı ve yapısında değişiklikler olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna bağlı olarak solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ve plazma Na^{+} derişiminde azalma görülmüştür. Araştırıcılar bakır etkisi sırasında iyonik toksik etkinin giderilmesi, homeostazisinin korunması ve iyon alımının düzenlenmesi için balıkların çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmaları aktive ettiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar klorit hücre sayısındaki artışı olarak Ca^{+2} ve Na^{+} dengesini düzenlemek adına telafi mekanizmalarının verdiği tepki değerlendirmişlerdir.

McGeer ve ark. (2000), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss* in sert suda kronik olarak subletal kadmiyum (3 µg/L), bakır (75 µg/L) ve çinko (250 µg/L) etkisine bırakılması sonucu balıklarda büyüme, beslenme alışkanlığı, iyon regülasyonu, yüzme performansı ve oksijen tüketimi gibi parametreleri incelemişlerdir. Farklı derecelerde olsa da, genelde üç metal etkisinde de incelenen parametrelerde bir bozulmanın yada normalden sapmanın olduğu, bazı parametrelerde telafi mekanizmalarının işlediği ve sonunda stabilizasyona uğradığı

görülmüştür. Büyüme etkilenmezken beslenmede artış veya azalışlar olduğu tespit edilmiştir. Bakır etkisinde kalan balıklarda yüzme hızı azalmasına karşın oksijen tüketimi artmıştır. Solungaç Na^+,K^+-ATPaz aktivitesi bakır etkisinde kalan balıklarda artarken, kadmiyum etkisinde bir değişiklik göstermemiştir. Başlangıçta Na^+ ve Ca^{+2} iyon balansında bozulmalar olsa da uzun sürede kontrol ile bir fark görülmemiştir. Özellikle kadmiyum etkisinde kalanlarda Ca^{+2} iyon seviyesinin normale dönmesi yaklaşık 1 ayı bulmuştur.

Grosell ve ark. (2003), kemikli bir balık türü olan *Myoxocephalus octodecemspinosus*'u 0.52 ve 1.73 mM bakır etkisinde 7 gün tutulduktan sonra, solungaç ve bağırsak Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ile plazma Na^+, Mg^{+2} ve Cl^- düzeylerini araştırmışlar ve bakırın dokularda birikimine bağlı olarak bu parametrelerde değişimler olduğunu göstermişlerdir. Araştırıcılar solungaçlarda metal birikiminin, sudan net apikal metal girişi ile solungaç hücrelerinden kana net bazolateral geçiş arasındaki fark ile gerçekleştiğini söylemişlerdir.

Canpolat ve Calta (2003) , Keban Barajı'nda yaşayan *Capoeta capoeta*'nın ağır metal birikimin balık boyu, ağırlık ve mevsimle olan ilişkisini araştırmıştır. En düşük metal birikiminin kas ve deri dokusunda olduğunu bulmuşlardır. Balık dokularındaki metal düzeyinin boy, cinsiyet ve mevsimlere göre farklılıklar gösterdiğini vurgulamışlardır.

Farkas ve ark. (2003), tatlı su balığı *Abramis brama*'nın solungaç, kas ve karaciğerindeki ağır metal içeriğinin balık yaşı ve boyu arasındaki ilişkileri incelemiştir. En yüksek metal düzeylerinin solungaç veya karaciğerde olduğunu belirten araştırıcılar, civa söz konusu olduğunda en yüksek birikimin kas dokusunda olduğunu vurgulamışlardır. Civa miktarı ile balık yaşı veya boyu arasında pozitif ilişki bulunurken, diğer metallerde bu ilişki negatif olarak bulunmuştur. Araştırıcılar balıkların metal içeriğinde meydana gelen değişimlerin ise örnekleme alanının kirlilik düzeyinin değişimden değil balığın kondisyon faktöründe meydana gelen değişimlerden kaynaklandığını vurgulamışlardır.

Canli ve Atli (2003), Akdeniz'de yaşayan 6 balık türünün dokularında 6 ağır metal düzeylerini ölçmüşler ve bunun balık boyu ve ağırlığı ile olan ilişkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar hemen hemen bütün balıklarda büyüklük ile metal birikimi

arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Araştırıcılar bunu örnekleme alanının metal kirliliği düzeyinin balık metabolizmasının düzenleme kapasitesinden fazla olmadığı şeklinde yorumlarken, büyük hayvanların düşük metabolik hızlarının bu birikim azlığında rolünün olabileceğini vurgulamışlardır.

De Boeck ve ark. (2007), köpekbalığı *Squalus acanthias*'ı 500-1500 µg/L bakır etkisinde 72 ila 96 saat arasında tutmuştur. Araştırıcılar solungaç ile böbrek dokularında derişime bağlı bakır birikiminin gözlendiğini belirtirken, yüksek bakır derişimlerinde solungaç yapısındaki hasara bağlı Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin sırasıyla % 45 ve % 62 azalış gösterdiğini vurgulamışlardır.

Zhang ve ark. (2007), biyokinetik model uygulayarak Karadeniz çapak balığı *Acanthopagrus schlegeli*'nin farklı boylardaki genç bireylerinde metal birikimini araştırmışlardır. Araştırıcılar sudan Cd^{+2}, Se ve Zn^{+2} 'nin alınımı ile ilgili kinetik parametrelerini ve diyet içerisinde bulunan metallerinde sindirilme ve atılım oranlarını ve sonuçta da balık boyuna bağlı olarak büyüme oranlarını incelemişlerdir. Balık boyu arttıkça metal alınım oranlarında azalmalar olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde metallerin dokulara geçmesi de balık boyu ile ters ilişki göstermiştir. Fakat besinden metal alınımı kadmiyum dışında balık boyu ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1.Metaller ve Asitler

Bakır klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$, Merck)
Potasyum kromat (K_2CrO_4, 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)
EGTA [Etilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N′,N′-tetraasetikasit, Sigma]
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, Fluka)
Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)
Bakır(II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)
Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)
Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2.Kullanılan Aletler

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: Hettich Universal 30RF
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

Tatlısu balığı *Oreochromis niloticus* Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınarak deneylerin yapıldığı akvaryum odasına getirildi. Bu laboratuarın sıcaklığı 20±1 ^0C ye, aydınlatılması ise 12 saat olacak şekilde ayarlandı. Balıklar yaklaşık 3 ay boyunca 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 40 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda tutularak laboratuar koşullarına adaptasyonları sağlandı. Deneylerin başlamasından önce balıkların bir kısmının iki hafta süreyle yumuşak suya adaptasyonu sağlandı. Sert ve yumuşak suya adaptasyon esnasında akvaryum koşulları ölçülerek balıklar için ortam kalitesi belirlemeye

çalışıldı. Sert suyun bulunduğu akvaryumlardaki oksijen miktarı 5.9 ± 0.77 mg/L, pH 8.1 ± 0.23, toplam sertlik 301.4 ± 21.2 µg $CaCO_3$/mL olarak ölçüldü. Yumuşak suyun bulunduğu akvaryumlarda ise oksijen miktarı 6.1 ± 0.67 mg/L, pH 6.9 ± 0.23, toplam sertlik 61.5±3.20 µg $CaCO_3$/mL olarak ölçüldü Sert su deneyleri için Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesindeki laboratuarımızdan sağlanan çeşme suyu kullanılırken, yumuşak su deneyleri için Pınar şirketi tarafından temin edilen damacana sular (Pınar Çamlıca) kullanılmıştır. Bütün balıklar ağırlıklarının % 2-3'ü kadar hazır balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) ile her gün beslendi Balık yeminde bulunan mikro element düzeyleri şu şekildedir; 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. Yemde bulunan makro elementlerin miktarları ise şu şekildedir; % 2-2.5 Ca, % 0.2-1 Na, % 1 P ve yem içeriğindeki ham protein ise en az % 40'dır. Adaptasyon sırasında akvaryum suları 2 günde bir olmak üzere dinlendirilmiş çeşme suyu kullanılarak değiştirildi.

3.2.1.Deneylerin Yapılışı

Balıklar 6 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda bakır ($CuCl_2.2H_2O$) ve krom (K_2CrO_4) un iki farklı derişimine iki farklı zaman diliminde bırakılmışlardır. Kısa süreli deneyler 48 saat ile sınırlandırılırken, metal derişimleri 20 µM olarak uygulanmıştır. Uzun süreli deneyler ise 144 saat sürdürülmüş olup, metal derişimi 10 µM olarak uygulanmıştır. Bütün akvaryumlarda metallerin akvaryum tabanına çökmesini önlemek amacıyla trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) kullanılmıştır. Deneylerde ayrıca iki farklı büyüklük grubuna giren balıklar kullanılarak balık boyunun etkileri de araştırılmıştır. Buna göre küçük balıklar (8.40±0.98 cm ve 12.6±1.21 g) ve büyük balıklar (15.2±1.94 cm ve 64.3±3.71 g) her iki metal deneyi için ayrı ayrı kullanılmışlardır. Farklı deney grupları arasında kullanılan küçük balıkların kendi aralarında ve büyük balıklar kendi aralarında istatistiksel olarak bir ayırım göstermemiştir ($P>0.05$).

Ağır metallerin deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunması ve akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerden dolayı akvaryumlardaki ağır metal

derişimleri azalabilmektedir. Akvaryumlardaki metal derişimlerini istenen düzeylerde tutabilmek için akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirilmiştir. Balıkların beslenmesi, ağır metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yapılmıştır.

3.2.2.Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Balıklar dissekte edilmeden önce spinal yapılarak ölümleri gerçekleştirildi. Daha sonra kurutma kağıdı ile kurulanarak boyları en yakın mm ve ağırlıkları en yakın g cinsinden ölçüldü. Balıklar steril aletlerle dissekte edilerek solungaç ve kas dokuları alındı. Tartımı yapılan dokular uygun paketlemeler yapılarak kullanılıncaya kadar -80 ^{0}C'de saklandı. Homojenizasyon işlemi için dondurucudan alınan dokular 250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base, 1 mM EDTA (pH 7.8) içeren homojenizasyon tamponu ile (1/10, w/v) 9500 rpm'de birkaç dk süreyle buz üstünde homojenize edildi. Homojenatlar eppendorf tüplerine aktarılarak +4 ^{o}C de 13.000 g'de 20 dk santrifüj edildi. Supernatantlar kısımları enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanılmak üzere ependorf tüplerine aktarılarak buz üzerinde saklandı.

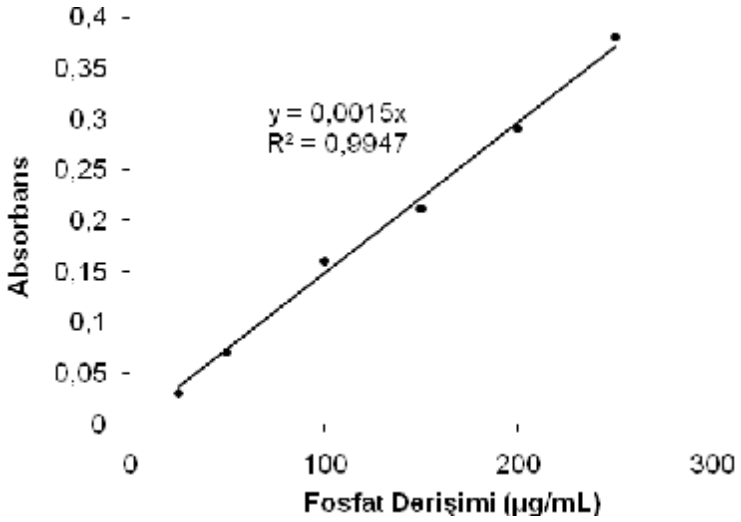
ATPazların optimum çalışma koşulları laboratuarımızda önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Atli ve Canli, 2009). Buna göre enzim aktivitelerinin saptanması için iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son optimum koşulları sağlamak üzere 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek kondu ve sıcak su banyosunda 37 ^{0}C'de 5 dk inkübe edildi. Deney tüplerinin üzerlerine 100 µL 3 mM Na_2ATP konmasıyla reaksiyon başlatıldı ve 30 dk süreyle inkübasyon sürdürüldü. Tüplere 500 µL soğuk saf su (+4 ^{o}C) ile edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Tüm bileşenlerin bulunduğu fakat ATP bulunmayan tüpler ATP körü olarak, sadece örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanıldı. Solungaç dokusunda spesifik aktivite tayini için tüplerin oubain içerip içermemesi prensibinden yararlanıldı. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi, Total-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz (Ouabain içeren) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplandı. Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ise

$CaCl_2$ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farka dayanarak hesaplandı. ATPaz aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. olarak verildi.

3.2.3.İnorganik Fosfat Tayini

İnorganik fosfat tayini için Atkinson et al. (1973) metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre ATP'den açığa çıkan Pi Polioksietilen 10 Lauril eter ile reaksiyona girerek fosfomolibdat denen sarı renkli bileşiğin oluşması esasına dayanmaktadır. Oluşan bu sarı rengin absorbansının 390 nm'de ölçülerek toplam Pi miktarı tayin edilmektedir. Kullanılan ayıraçların hazırlanması aşağıdaki gibidir.

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 bekletilmelidir.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözülür.
3. Ana ayıraç: 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlanır.



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Deney tüplerinde bulunan 1.5 mL örnek üzerine hazırlanan ana ayıraçtan 3 mL konarak oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Oluşan sarı rengin absorbansı 390 nm'de okundu. Sonuçların kantitatif değerlendirilebilmesi için seri Pi standartları hazırlandı. Bunun için 25, 50, 100, 150, 200, 250 μM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi (Şekil 3.1.)

3.2.4.Total Protein Analizi

Doku homojenatlarındaki toplam protein analizi Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile yapıldı.

Bu metod proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarı belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfo molibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi renk verirler. Bu yöntem 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 B_1: % 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. Daha sonra uygun seyreltmeler yapılarak son derişimlerin 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/mL olması sağlandı.

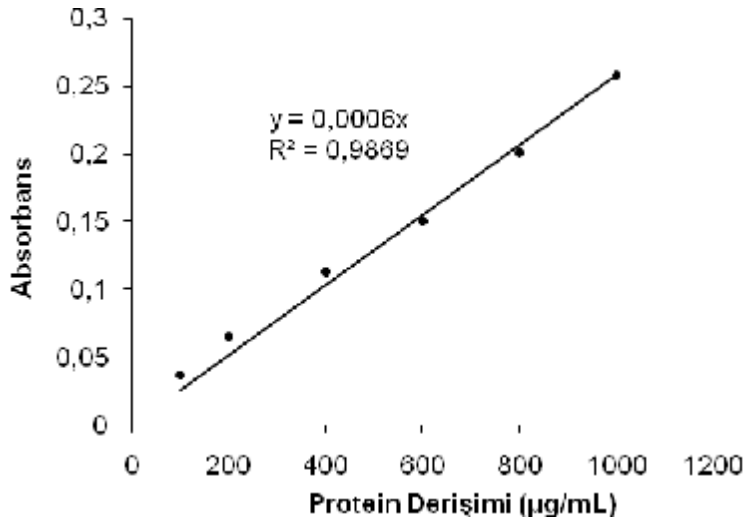
Hazırlanan standart çözeltilerden ve örneklerden 0.3 mL alınarak örnek tüplerine konuldu ve bunun üzerine 3 mL ayıraç C eklenerek çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dk bekletilen tüplerin üzerine 0.3 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi konularak iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk daha bekletildi. Oluşan 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 =0,0014x olarak bulunmuştur (Şekil 3.2.). Burada y absorbans değerini, x ise derişimi göstermektedir.

Yukarıda anlatılanların aşağıda detaylı olarak gösterilmektedir. 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

	Kör	**Doku homojenatı**	**Standart (BSA)**
Örnek (mL)	-	0.03	0.3
Saf su (mL)	0.3	0.27	-
Ayıraç C (mL)	3.0	3.0	3.0
Karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında beklenir.			
Folin-Ciocalteu (mL)	0.3	0.3	0.3
Karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında beklenir.			



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

20 µg Cu/L etkisinde sert suda kalan küçük balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 48 saat sonunda total protein düzeyi:

y = 0.0006x

Absorbans: y = 0,721

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,721}{0,0006}$$

Derişim =1,2 mg/mL

Doku tamponla 10 mL'ye seyreltildiği için

Derişim =1,2 x 10 x 10

Derişim =120 mg prot./mL

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

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0.0015^{*} \text{ x } 4.5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0.03 \text{ (mL) x } 0.5 \text{ (sa.) x mg prot./mL}}$$

= µmol Pi/mg prot./sa.

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y = 0.0015x)

20 µg Cu/L etkisinde sert suda kalan küçük balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 48 saat sonunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi:

Absorbans: y = 0.067

$$Na^+/K^+\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0.067/0.0015 \text{ x } 4.5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0.03 \text{ (mL) x } 0.5 \text{ (sa.) x } 10.8 \text{ mg prot./mL}}$$

Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi = 1.24 µmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6.Ağır Metal ve İyon Analizleri

Dissekte edilen dokular total ağır metal ve iyon analizlerine başlamak amacıyla etüve (Nüve) konuldu ve 105 ^{0}C'de 5 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 tamamen çeker ocaklı bir ortamda yapıldı. Tamamen berrak bir çözelti haline gelinceye kadar yakılan örnekler soğumaya bırakıldı ve plastik tüplere alınarak 10 mL'ye distile su ile seyreltildi.

Daha sonra çözelti içerisindeki ağır metallerin absorbansı atomik absorbsiyon spektrofotometresinde (Perkin Elmer 3100) okundu. İyonlar absorbans değerleri standart değerlerini aştığında ilave seyreltmeler yapılarak okuma yapıldı. Atomik absorbsiyon spektrofotometresinin ve ölçümleri doğruluğu referans materyal (TORT 1 istakoz hepatopankreası, National Research Council, Canada) kullanılarak test edildi ve ölçümlerin% 10 aralığında aynı olduğu belirlendi.

3.2.7.Ağır 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 bakır standartlarının (1,0 , 2.0, 3,0 , 4,0 , 5,0 ppm) absorbans değerleri ile y = 0,0357x regresyon eşitliği elde edildi (Şekil 3.3.). Aynı şekilde krom etkisinde kalan örneklerde, krom birikimini belirlemek amacıyla stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan krom standartlarının (1,0 , 2.0, 3,0 , 4,0 , 5,0 µg/ml) absorbans değeri ile y = 30x regresyon eşitliği elde edildi. Denklemdeki y absorbansı, x ise metal derişimini göstermektedir (Şekil 3.4.). Örnek hesaplama şu şekilde yapıldı.

20 µg Cu/L etkisinde sert suda kalan küçük balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 48 saat sonunda bakır derişimi:

Absorbans: y = 0.0040x

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0.0040}{0.0357}$$

Derişim = 0.112 µg/mL Cu

Doku asitle yakıldıktan sonra 10 mL'ye tamamlandığı için

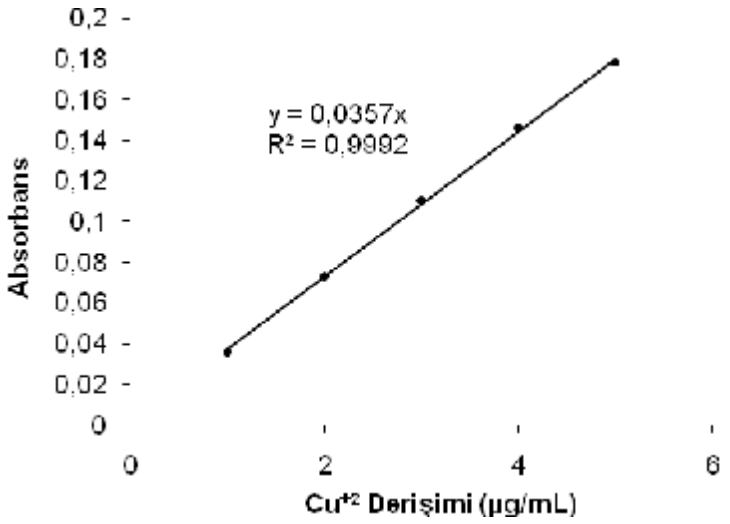
Derişim = 0.112 x 10

Derişim = 1.12 µg Cu

Cu etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0.106 g olarak tespit edildi. Buna göre 1 g dokudaki Cu derişimi:

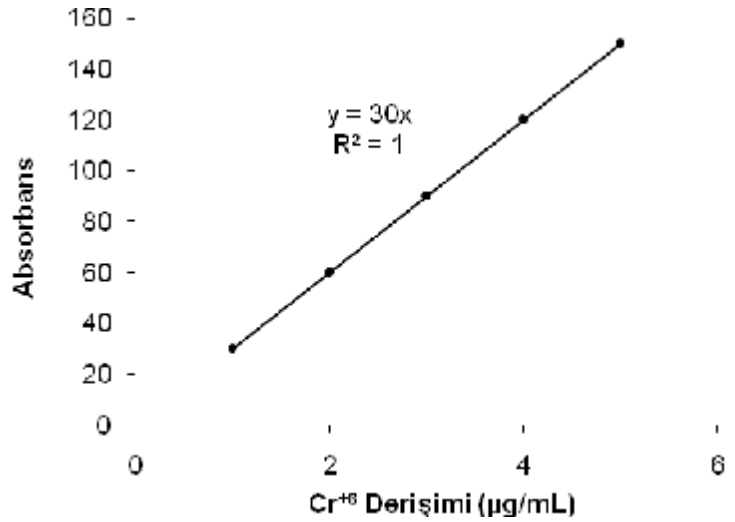
$$\text{Derişim} = \frac{1.12}{0.106}$$

Derişim = 10.55 µg Cu/g k.a.



Şekil 3.3. Bakır derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Total metal düzeyi krom deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı. Bütün sonuçlar µg metal/g. k.a. olarak verildi.



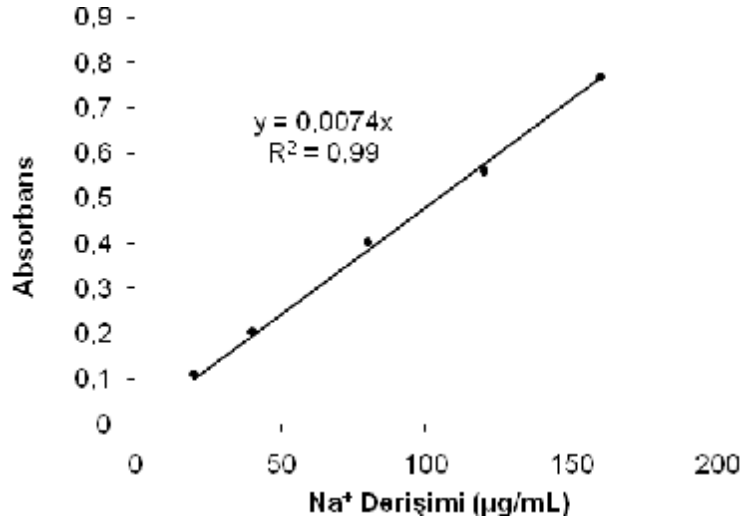
Şekil 3.4. Krom derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.8.İyon Derişiminin Hesaplanması

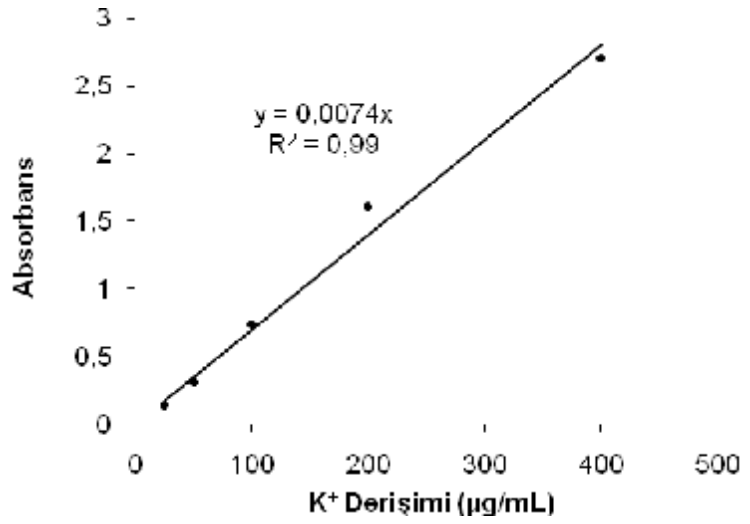
Total iyon düzeyleri, kontrol ve metal etkisinde kalan gruplarda Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} standartları ile absorbans değerleri arasındaki ilişkileri gösteren standart eğriler (Şekil 3.5.-3.8.) kullanılarak hesaplandı ve bu değerler Çizelge 3.1'de gösterildi.

Çizelge 3.1.İyon standartları ile absorbansları arasındaki regresyon eşitlikleri.

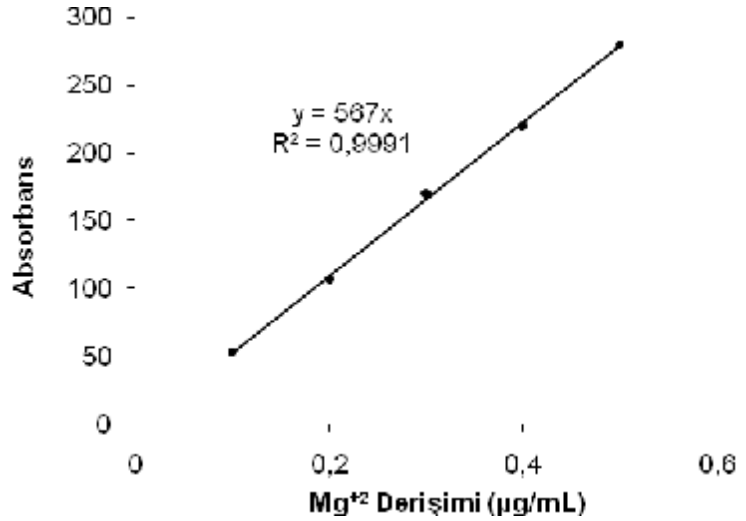
İyon	**Derişim (µg/mL)**	**Regresyon eşitliği**
Na^{+}	20, 40, 80, 120, 160	y = 0.0074x
K^{+}	25, 50, 100, 200, 400	y = 0.0074x
Mg^{+2}	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5	y = 567x
Ca^{+2}	1, 2, 3, 4, 5	y = 46,3x



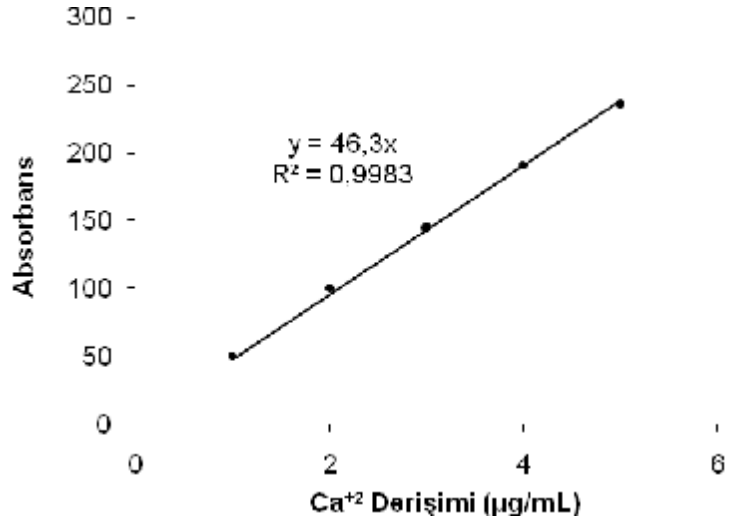
Şekil 3.5.Na^+ derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.



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 ilişki.

20 µg Cu/L etkisinde sert suda kalan küçük balıklardan 1 numaralı olan balığın solungacında 48 saat sonunda Ca^{+2} derişimi:

y = 46,3x
Absorbans: y = 280

$$\text{Derişim (x)} = \frac{280}{46.3}$$

Derişim = 6.047 µg/mL Ca^{+2}

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 = 6.047 x 1000
Derişim = 6047 mg Ca^{+2}

Cu etkisindeki deney grubunda solungaç dokusunun kuru ağırlığı 0.106 g olarak ölçüldü. Buna göre 1 g dokudaki Ca^{+2} derişimi:

$$\text{Derişim} = \frac{6047}{0.106}$$

Derişim = 57.04 mg Ca^{+2}/g k.a.

Total iyon düzeyi diğer bakır ve krom etkisinde kalan deney grupları ve kontrol grupları için de aynı şekilde hesaplandı.

3.2.9.İstatistiksel Analizler

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin aritmetik ortalaması, standart sapmaları ve standart hataları bu program yardımıyla hesaplandıktan sonra tablo ve grafiklerde kullanıldı. Regresyon Analizi standart çözeltilerin analizinde One-way ANOVA analizleri de kontrol ve diğer deney koşulları arasındaki farkların araştırılmasında kullanıldı. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde ($P<0.05$), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden LSD-test kullanılarak belirlendi. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Akut (48 saat) Deneyler

4.1.1.1. Kontrol Küçük Balıklarda ATPaz Aktivitesi

O. niloticus, Cu^{+2} ve Cr^{+6} nın 20 µM derişimlerinin etkisine 48 saat süre ile bırakıldı ve bu süreler sonunda solungaç dokusunda Total-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler, yumuşak suda yaşayan kontrol balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 1.30±0.79 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 2.06±1.84 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 3.37±2.35 µmol Pi/mg prot./sa. olduğunu göstermiştir. Aynı koşullarda yaşayan kontrol balıklarında kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.31±0.36 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1.). Sert suda yaşayan küçük kontrol balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 1.36±0.53 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 4.92±0.74 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesi 6.28±1.23 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 4.06±4.73 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.).

Yumuşak ve sert suda 48 saat kalan kontrol balıkların ATPaz aktivitelerinin istatistiksel karşılaştırması sonucu sadece Mg^{+2}-ATPaz ve Total-ATPaz aktivitelerinde önemli farklar olduğu görülmüştür ($P<0.05$) (Tablo 4.1). Akut metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri Tablo 4.3 de verilmiştir.

4.1.1.2. Kontrol Büyük Balıklarda ATPaz Aktivitesi

Akut (48 saat) denemelerde kontrol büyük balıkların solungaç dokusunda Total-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler, yumuşak suda yaşayan kontrol

balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 4.68±3.18 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 8.4262.93 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 13.10±5.81 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu gözlenmiştir. Aynı koşullarda yaşayan kontrol balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.12±0.56 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.2.). Sert suda yaşayan balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 3.58±0.52 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 6.02±0.50 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 9.60±0.63 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 2.27±0.65 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.).

Yumuşak ve sert suda 48 saat kalan kontrol balıkların ATPaz aktivitelerinin istatistiksel karşılaştırması sonucu sadece Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinde önemli ($P<0.05$) farklar olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). Akut metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri Tablo 4.3 de verilmiştir.

4.1.1.3. Bakır Etkisinde Kalan Balıklar

Küçük balıkların 48 saat süre ile 20 µM Cu^{+2} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde kontrole göre %74 oranında azalırken, aktivite değeri 0.34±0.18 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) bulunmuştur. Buna karşın Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri sırasıyla %52 ve %131 oranlarında artış gösterirken, aktivite değerleri sırasıyla 5.12±1.16 ve 4.78±1.11 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu artışlardan sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesindeki artış istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1.78±0.86 µmol Pi/mg prot./sa. ölçülmüş olup, bu artış (%36) anlamlı ($P<0.05$) bulunmamıştır. (Şekil 4.1.)

Sert suda yaşayan küçük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde %37 azalışa rağmen istatistiksel olarak önemli bir fark göstermezken ($P>0.05$), aktivite değeri 0.86±0.54 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri de kontrol ile karşılaştırıldığında

istatistiksel olarak anlamlı fark göstermezken (P>0.05), aktivite değeri sırasıyla 5.68±2.62 ve 4.82±2.21 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür (%9 ve %2 azalış) (Şekil 4.1.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 4.52±2.92 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüş olup, bu artış (%12) anlamlı bulunmamıştır (P<0.05).

Büyük balıkların 48 saat süre ile 20 µM Cu^{+2} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 77 oranında azalırken aktivite değeri 1.07±0.53 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı (P<0.01) bulunmuştur. Total- ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri %30 ve % 4 oranında azalırken aktivite değerleri 9.15±1.65 µmol Pi/mg prot./sa. ve 8.06±1.62 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Ancak bu azalışlar istatistiksel olarak (P>0.05) anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1.85±0.61 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüş olup, bu artış (%65) anlamlı olmamıştır.(P<0.05).

Sert suda yaşayan büyük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde önemli oranlarda (% 55) azalma gösterirken (P<0.01), aktivite değeri 1.60±1.53 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda Total-ATPaz, ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri de kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar göstermezken (P>0.05), aktivite değeri sırasıyla 8.70±1.10 ve 7.104.82±2.21 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür (%9 azalış ve %18 artış) (Şekil 4.2.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 2.99±1.25 olarak ölçülmüş olup, bu artış (%32) anlamlı bulunmamıştır.(P>0.05).

4.1.1.4. Krom Etkisinde Kalan Balıklar

Küçük balıkların 48 saat süre ile 20 µM Cr^{+6} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 72 oranında artarken aktivite değeri 2.23±1.47 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı (P>0.05) olmamıştır. Ancak Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri sırasıyla % 89 ve % 100 oranlarında artış gösterirken, aktivite değerleri

sırasıyla 6.36±2.44 ve 4.13±1.11 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Her iki aktivitedeki artış istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.5.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1.44±0.66 olarak ölçülmüş olup, bu artış (% 10) anlamlı olmamıştır ($P>0.05$).

Sert suda yaşayan küçük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde % 90 artış göstermiş olmasına karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Bununla birlikte enzim aktivite değeri 2.58±1.05 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Fakat Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkların ($P<0.05$) olduğu görülmüştür. Aktivite değeri sırasıyla 8.97±1.43 ve 6.38±0.85 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Bu artma sırasıyla % 43 ve % 30 Artışa denk gelmektedir (Şekil 4.5.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 4.34±4.44 olarak ölçülmüş olup, bu artış (%87) anlamlı olmamıştır.($P>0.05$).

Büyük balıkların 48 saat süre ile 20 µM Cr^{+6} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 41 oranında azalırken aktivite değeri 2.78±0.37 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) bulunmamıştır. Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri %20 ve %9 oranında azalırken aktivite değerleri 10.43±0.91 µmol Pi/mg prot./sa. ve 7.65±0.90 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Ancak bu azalışlardan sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi istatistiksel olarak ($P<0.05$) anlamlı bir atış göstermiştir (Şekil 4.6.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1.97±1.24 olarak ölçülmüş olup, bu artış (%76 artış) anlamlı olmamıştır ($P>0.05$).

Sert suda yaşayan büyük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde önemli oranlarda (% 6) azalma gösterirken ($P>0.05$) aktivite değeri 3.35±0.48 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri sırasıyla % 20 ve % 35 artışlar gösterirken aktivite değeri sırasıyla 11.5±1.11 ve 8.14±1.20 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.6.). Aynı koşullarda kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 2.46±1.27 olarak ölçülmüş olup, kontrole göre gösterdiği %21'lik artış anlamlı bulunmamıştır.

4.1.2. Uzun Süreli (144 saat) Metal Etkisi

4.1.2.1. Kontrol Küçük Balıklarda ATPaz Aktivitesi

O. niloticus, Cu^{+2} ve Cr^{+6} nin 20 µM derişimlerinin etkisine 144 saat süre ile bırakıldı ve bu süreler sonunda solungaç dokusunda Total-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçüldü.

Uzun süreli deneylerden elde edilen veriler, yumuşak suda yaşayan kontrol balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 1.86±0.45 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 7.28±1.59 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 9.15±1.28 µmol Pi/mg prot./sa. olduğunu göstermiştir. Aynı koşullarda yaşayan kontrol balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.97±1.78 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3.). Sert suda yaşayan küçük kontrol balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 4.06±1.44 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 7.98±0.84 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 12.04±2.27 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 3.90±2.82 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülmüştür.

Yumuşak ve sert suda 144 saat kalan kontrol küçük balıkların ATPaz aktivitelerinin istatistiksel karşılaştırması sonucu Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Total-ATPaz aktivitelerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür.($P<0.05$) (Tablo 4.2.). Uzun süreli metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri Tablo 4.4. verilmiştir.

4.1.2.2. Kontrol Büyük Balıklarda ATPaz Aktivitesi

Uzun süreli (144 saat) denemelerde kontrol balıkların solungaç dokusunda Total-ATPaz, Na^{+}/K^{+}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler, yumuşak suda yaşayan kontrol balıklarda solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin 2.38±0.62 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 7.73±1.36 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 10.10±1.66 µmol Pi/mg prot./sa. olduğunu göstermiştir. Aynı koşullarda yaşayan

kontrol balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 4.45±2.78 µmol Pi/mg prot./sa. düzeyinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3.). Sert suda yaşayan balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi 1.95±0.82 µmol Pi/mg prot./sa., Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin 6.18±0.66 µmol Pi/mg prot./sa., Total-ATPaz aktivitesinin 8.13±1.18 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 2.68±1.40 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülmüştür.

Yumuşak ve sert suda 144 saat kalan kontrol büyük balıkların ATPaz aktivitelerinin istatistiksel karşılaştırması sonucu hiçbir anlamlı farkın olmadığı görülmüştür.($P>0.05$) (Tablo 4.2.). Uzun süreli metal etkilerinde ölçülen ATPaz aktivitelerinin % değerleri Tablo 4.4. de verilmiştir.

4.1.2.3. Bakır Etkisinde Kalan Balıklar

Küçük balıkların 144 saat süre ile 10 µM Cu^{+2} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 6 oranında artarken aktivite değeri 1.97±1.72 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Buna karşın, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.($P>0.05$). Total-ATPaz, ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde sırasıyla % 39 ve % 47 oranlarında artışlar görülürken, aktivite değerleri sırasıyla 12.70±2.80 ve 10.71±1.41 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Her iki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.($P<0.05$) (Şekil 4.3.).Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 4.37±3.51 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken, bu artış (%122) anlamlı değildir.($P>0.05$).

Sert suda yaşayan küçük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cu^{+2} etkisinde % 36 azalışa rağmen istatistiksel olarak önemli bir fark göstermemiş ($P>0.05$), ve aktivite değeri 2.60±1.37 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan balıkların Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri kontrol ile karşılaştırıldığında, sırasıyla % 6 azalış ve % 10 artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.). Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark sadece Total-ATPaz aktivitesinde görülmüştür ($P<0.05$). Enzim aktivite değeri sırasıyla 11.36±0.95 ve 8.76±1.65 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise

2.92±1.86 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken,(%-31) bu azalış anlamlı olmamıştır (Şekil 4.3.).

Büyük balıkların 144 saat süre ile 10 µM Cu^{+2} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi (1.50±0.95µmol Pi/mg prot./sa) Cu^{+2} etkisinde kontrole göre % 37 oranında azalırken, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (P>0.05). Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri % 18 ve % 12 oranında azalırken, aktivite değerleri 8.29±1.80 µmol Pi/mg prot./sa. ve 6.80±0.99 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Ancak bu azalışlar istatistiksel olarak (P>0.05) anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.4.). Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.47±1.02 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken, (% 67) oranındaki bu azalmanın önemli (P<0.05) olduğu görülmüştür.

Sert suda yaşayan büyük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi % 25 oranında azalma gösterirken, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı (P>0.05) olmamıştır. Enzim aktivite değeri 1.47±0.99 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri de kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılıklar göstermezken (P>0.05), aktivite değeri sırasıyla 6.8±0.77 ve 5.31±0.71 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür(%16 ve %14 azalış) (Şekil 4.4.). Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.50±0.71 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken,%42'lik bu azalış istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.(P>0.05).

4.1.2.4. Krom Etkisinde Kalan Balıklar

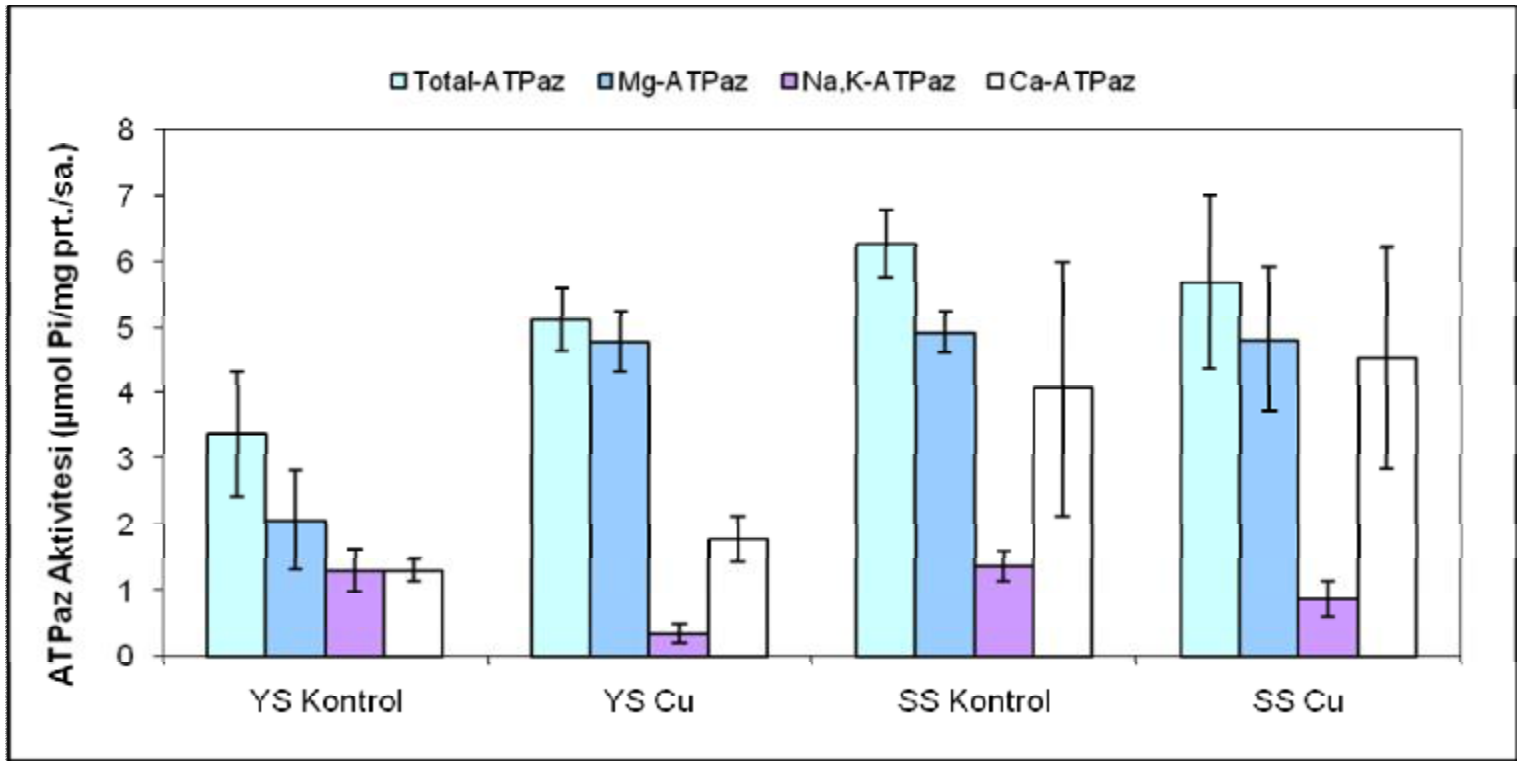
Küçük balıkların 144 saat süre ile 10 µM Cr^{+6} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde kontrole göre % 20 oranında artarken aktivite değeri 2.24±1.02 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı (P>0.05) olmamıştır. Buna karşın, Total-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktiviteleri sırasıyla % 32 ve % 35 oranlarında artış gösterirken, aktivite değerleri sırasıyla 12.05±1.73 ve 9.81±1.57 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05)

(Şekil 4.7.). Kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 3.56±4.05 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken, % 83'lük bu artış anlamlı bulunmamıştır (P>0.05).

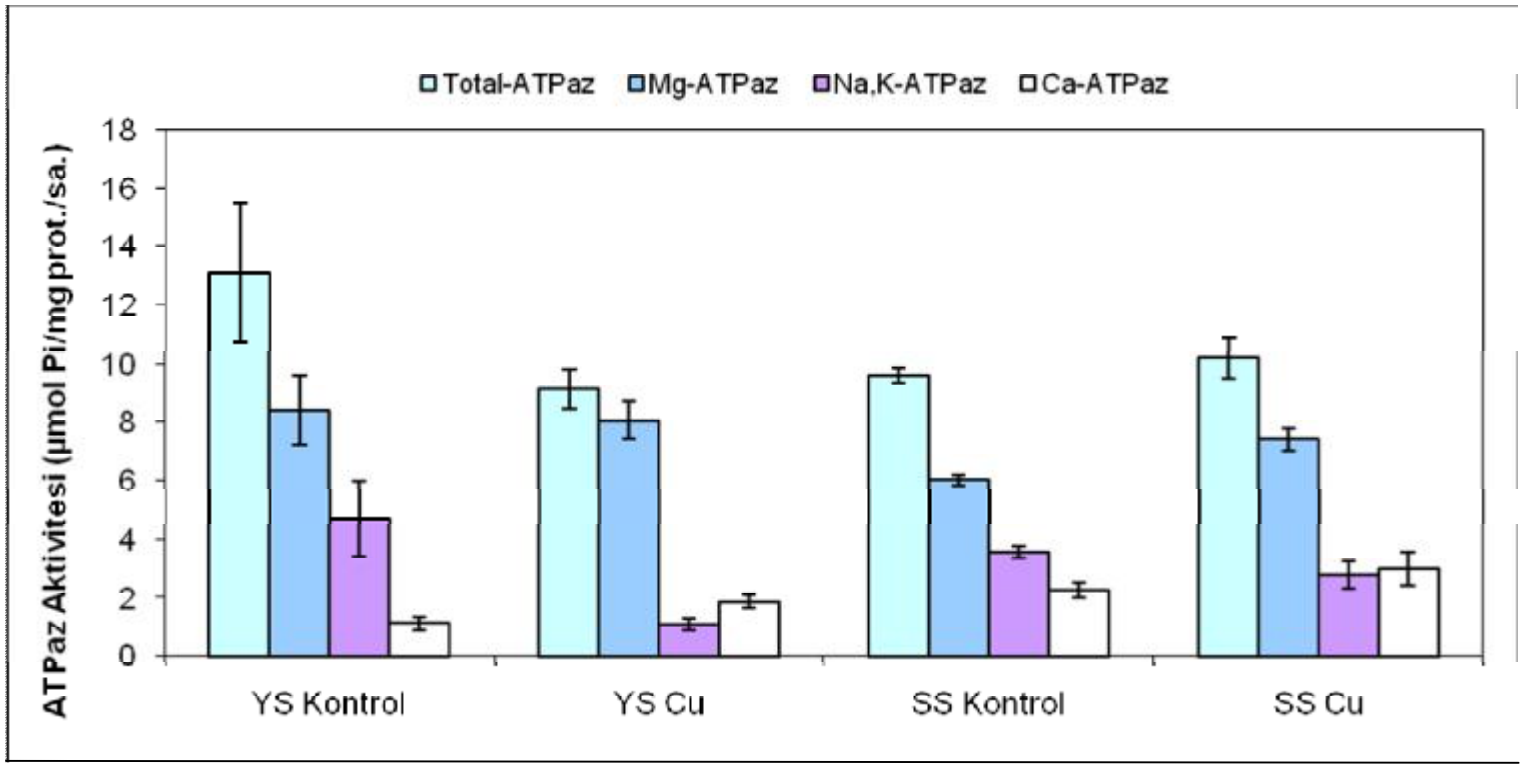
Sert suda yaşayan küçük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde % 16 oranında azalma göstermiş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (P>0.05). Enzim aktivite değeri 3.42±2.31 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda Total-ATPaz aktivitesi ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 11 ve % 1 azalış göstermiş fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (P>0.05). Aktivite değerleri sırasıyla 10.77±2.34 ve 7.93±1.57 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür (Şekil 4.7.). Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 4.74±2.06 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken (%22) bu artış anlamlı (P>0.05) olmamıştır (Şekil 4.7.).

Büyük balıkların 144 saat süre ile 10 µM Cr^{+6} etkisinde kalması sonucu enzim aktivitelerinde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yumuşak suda yaşayan balıkların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi kontrole göre % 11 oranında azalırken, aktivite değeri 2.11±0.97 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (P>0.05). Total-ATPaz aktivitesi ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi % 3 ve % 1 oranındaki azalırken aktivite değerleri 9.80±3.79 µmol Pi/mg prot./sa. ve 7.69±2.90 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür. Ancak bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.(P>0.05) (Şekil 4.8.). Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 3.47±2.83 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken,%22 oranındaki bu azalış anlamlı bulunmamıştır.(P>0.05).

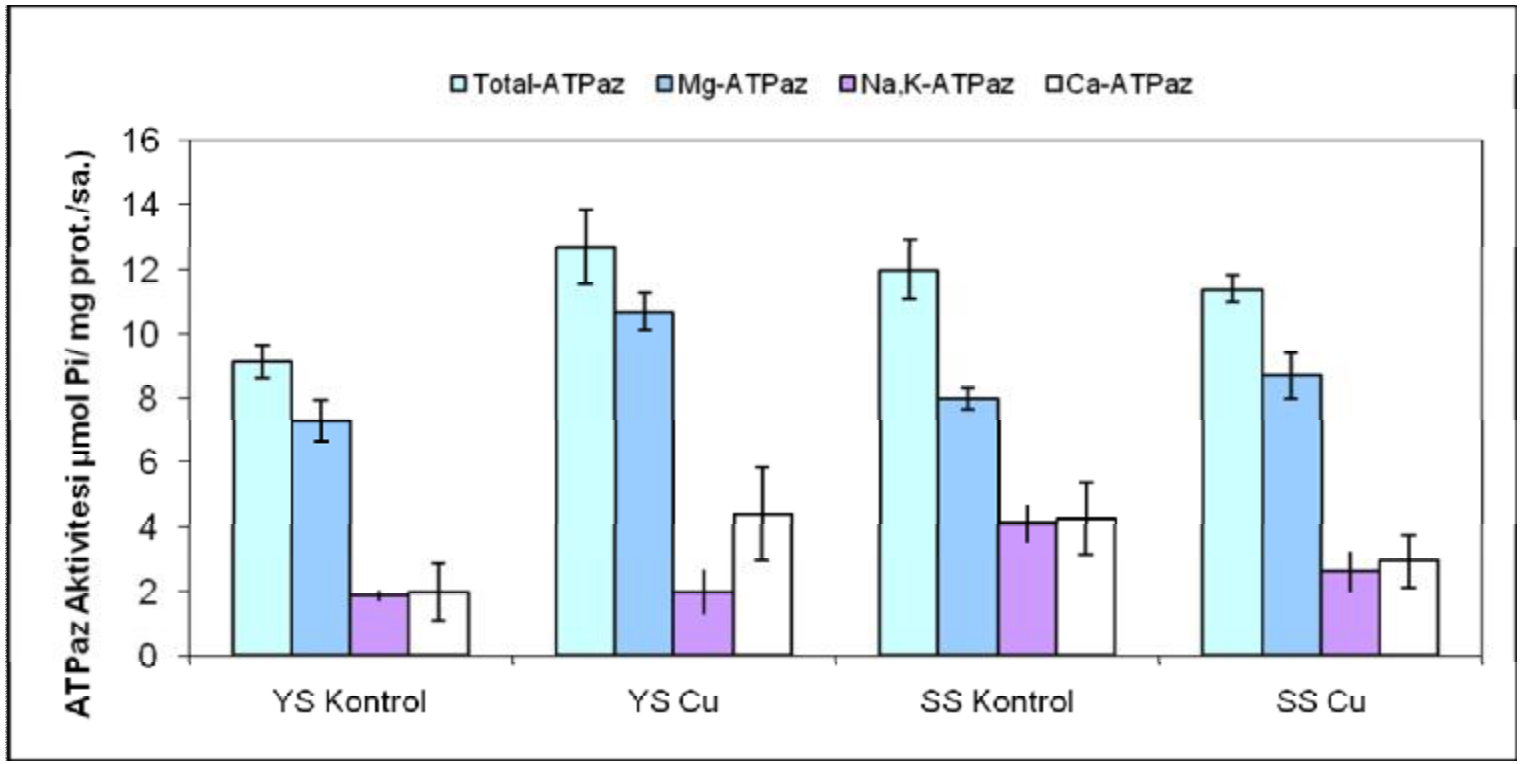
Sert suda yaşayan büyük balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi Cr^{+6} etkisinde % 26 oranında artış gösterirken aktivite değeri 2.46±1.83 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı (P>0.05) bulunmamıştır. Ancak aynı balıkların Total-ATPaz aktivite ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde sırasıyla % 4 ve % 14 azalmalar görülmesine karşın bu artışlar kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0.05). Enzim aktivite değeri sırasıyla 7.80±2.35 ve 5.34±0.92 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür. (Şekil 4.8.). Aynı balıkların kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise 1.740±0.69 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu görülürken,%35'lik bu azalış anlamlı olmamıştır (P>0.05).



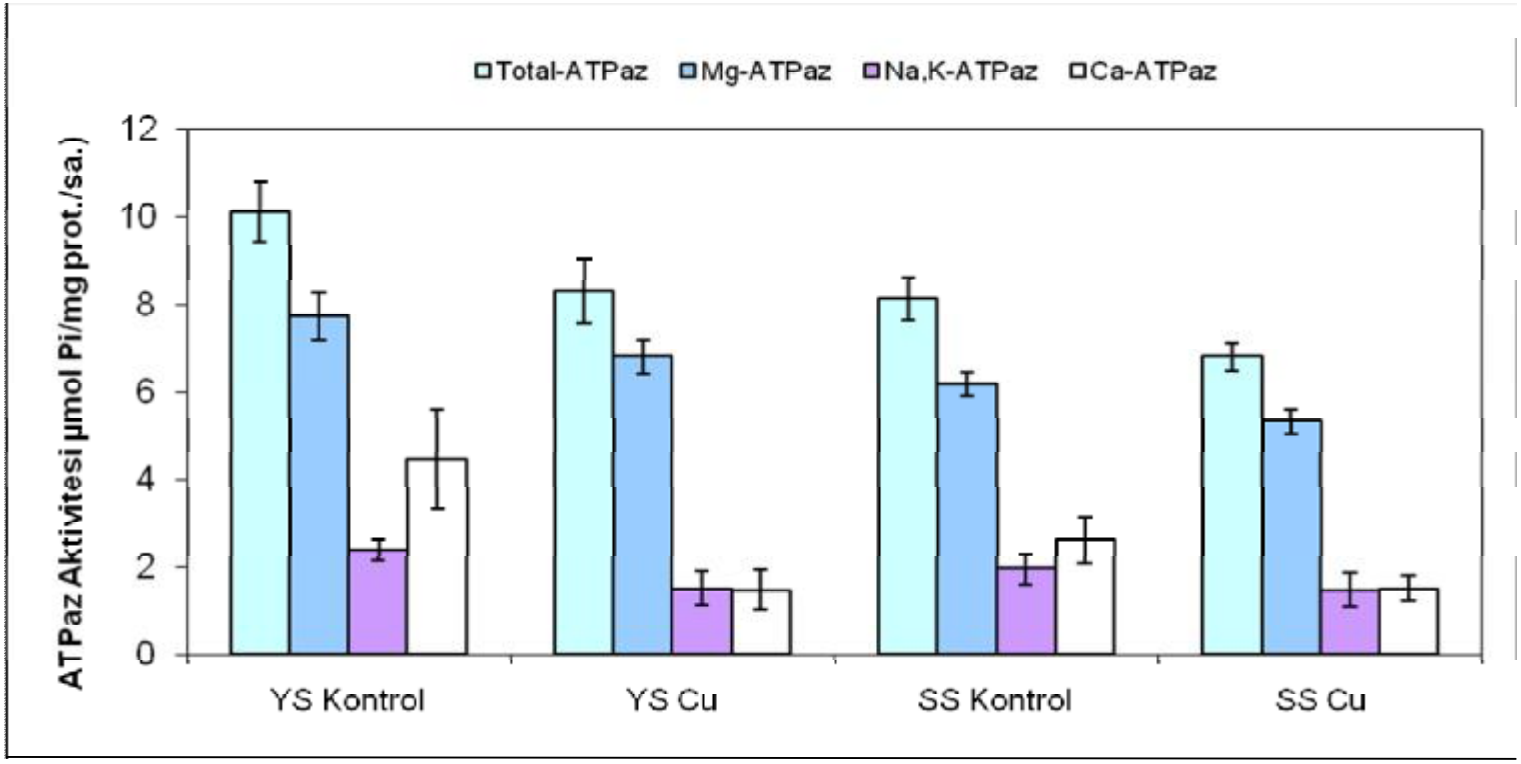
Şekil. 4.1. Akut (48 saat 20 µM) periyotda bakır etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.3. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



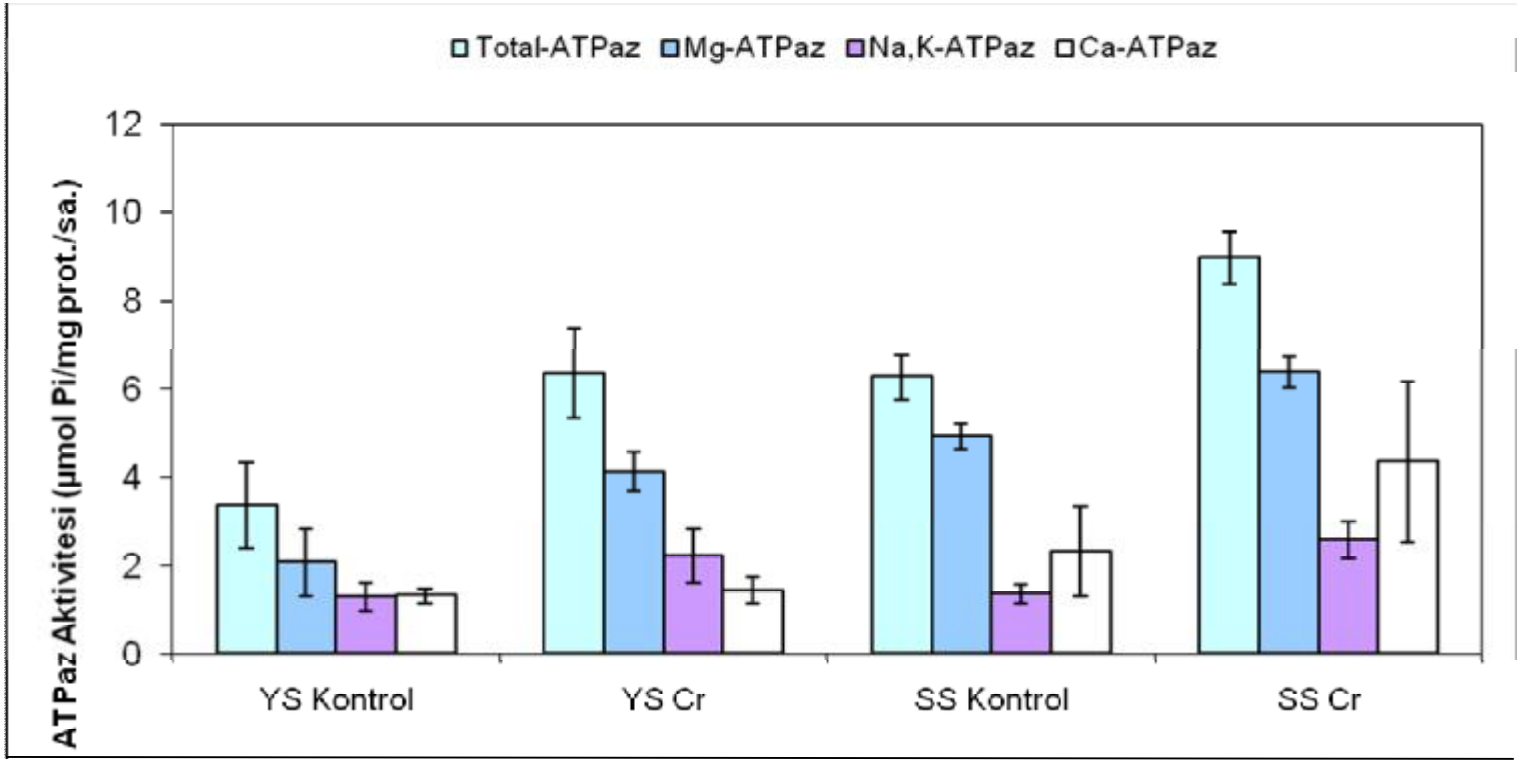
Şekil. 4.2. Akut (48 saat 20 µM) periyotda bakır etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.3. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



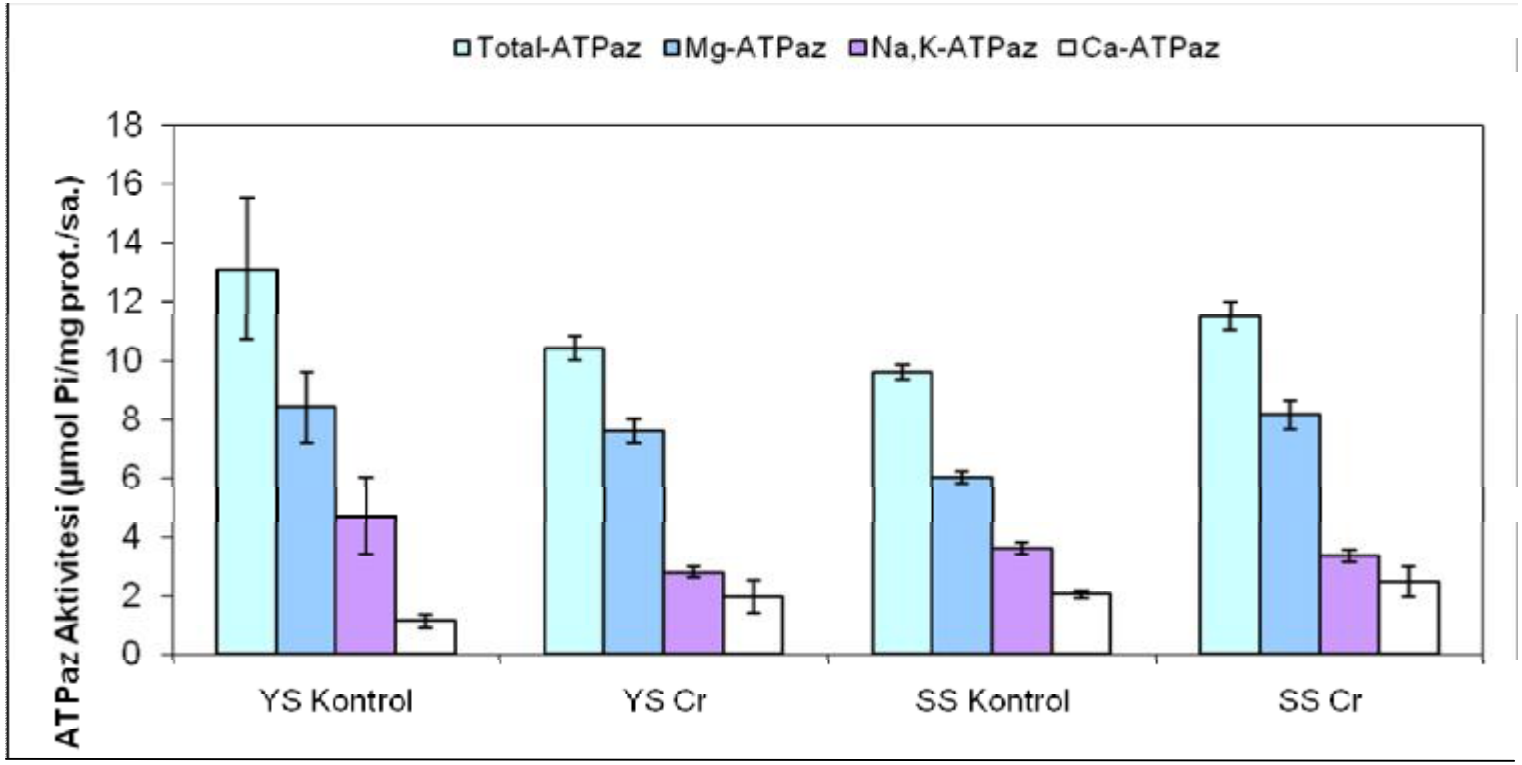
Şekil. 4.3. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda bakır etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.4. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



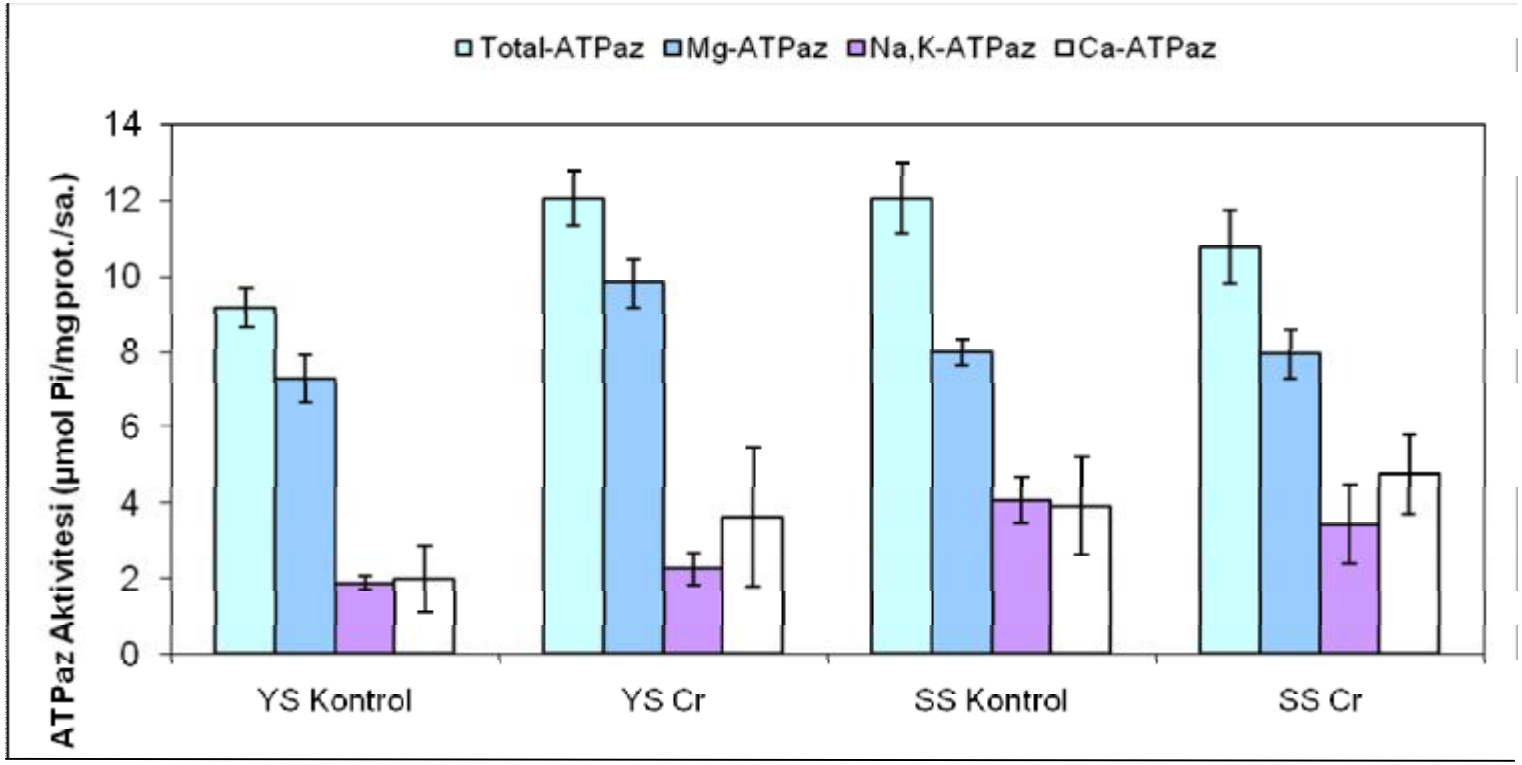
Şekil. 4.4. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda bakır etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.4. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



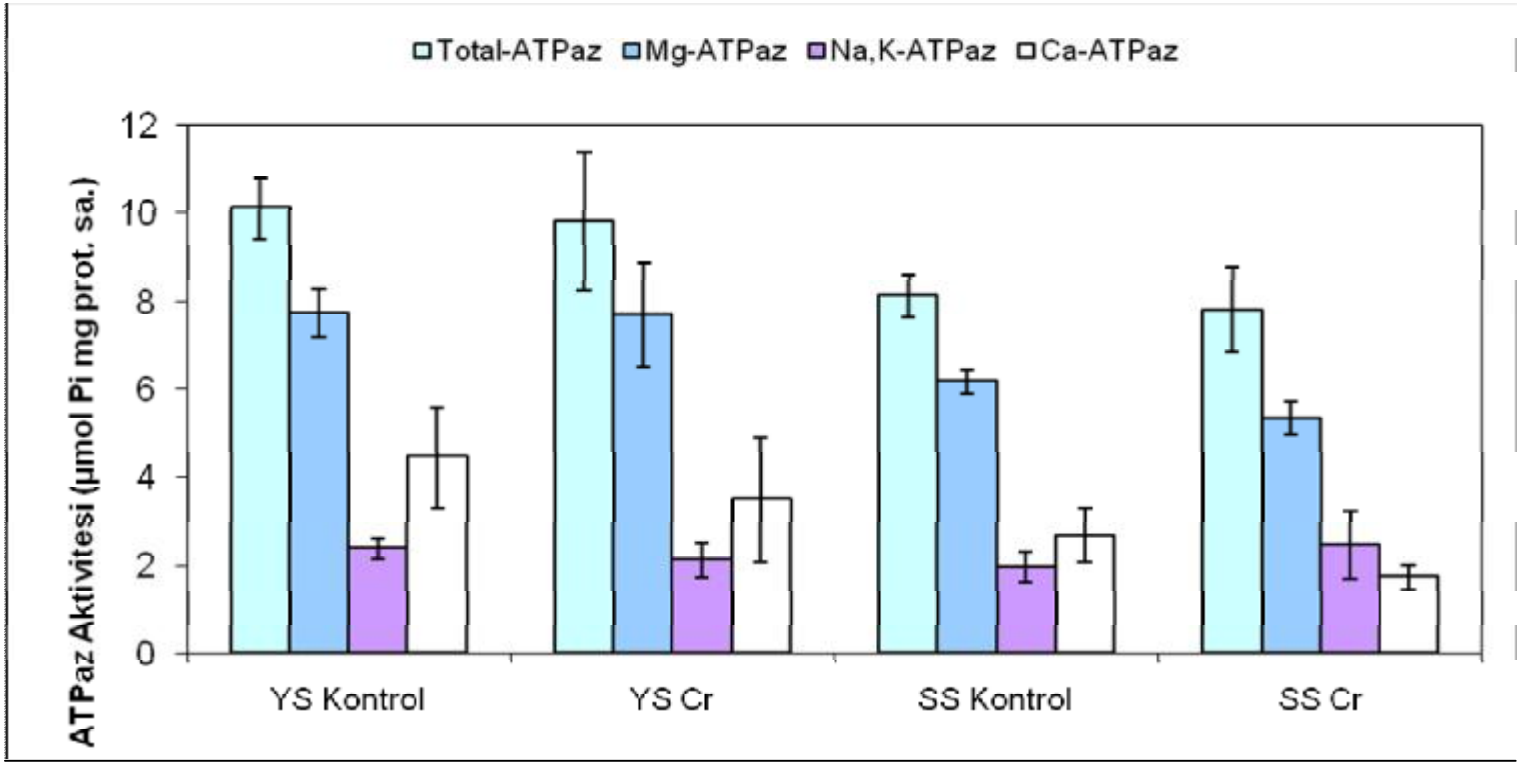
Şekil. 4.5. Akut (48 saat 20 µM) periyotda krom etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.3. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



Şekil. 4.6. Akut (48 saat 20 µM) periyotda krom etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.3. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



Şekil. 4.7. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda krom etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.4. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.



Şekil. 4.8. Uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotda krom etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda Total ATPaz, Mg-ATPaz ve Na,K-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler ortalama (n=6) ve standart hatayı göstermektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1. de verilmiştir. Kontrol ortalama değerleri baz alınarak ATPaz aktivitelerinde meydana gelen % değişimler Tablo 4.4. de verilmiştir. YS=yumuşak su, SS=sert su.

Çizelge 4.1. Akut (48 saat 20 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel sonuçları. X= P<0.05, boşluklar önemsiz (P>0.05) sonuçları göstermektedir. Tot.= Total ATPaz, Mg = Mg-ATPaz, Na,K = Na,K-ATPaz, Ca = Ca-ATPaz

Deney	Karşılaş-tırılanlar	48 saat küçük balıklar				48 saat büyük balıklar			
		Tot.	Mg	Na,K	Ca	Tot.	Mg	Na,K	Ca
Kontrol	Y. Su S. Su	X	X				X		X
Cr	Y. Su S. Su	X	X						
Cu	Y. Su S. Su			X					X
Y. Su	Kont. Cr	X	X						
Y. Su	Kont. Cu	X					X		
S. su	Kont. Cr		X	X		X		X	
S. su	Kont. Cu								

Çizelge 4.2. Uzun süreli (144 saat 10 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel sonuçları. X= P<0.05, boşluklar önemsiz (P>0.05) sonuçları göstermektedir.

Deney	Karşılaş-tırılanlar	144 saat küçük balıklar				144 saat büyük balıklar			
		Tot.	Mg	Na,K	Ca	Tot.	Mg	Na,K	Ca
Kontrol	Y. Su S. Su	X		X		X	X		
Cr	Y. Su S. Su						X		
Cu	Y. Su S. Su								
Y. Su	Kont. Cr	X	X						
Y. Su	Kont. Cu								
S. su	Kont. Cr	X	X			X			X
S. su	Kont. Cu								

Çizelge 4.3. Akut (48 saat 20 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin % olarak hesaplanması. – olanlar azalışı + olanlar artışı göstermektedir. Tot.= Total ATPaz, Mg = Mg-ATPaz, Na,K = Na,K-ATPaz, Ca = Ca-ATPaz.

Metal	Deney ortamı	48 saat küçük balıklar				48 saat büyük balıklar			
		Tot.	Mg	Na,K	Ca	Tot.	Mg	Na,K	Ca
Cr	Y. Su	+89	+99	+71	+10	-20,4	-9	-40	+76
Cr	S. Su	+43	+29	+90	+87	+20	+35	-6	+21
Cu	Y. Su	+52	+308	-85	+36	-30	-4	-77	+65
Cu	S. Su	+6	-4	-37	+11	-9	+18	-55	+32

Çizelge 4.4. Uzun süreli (144 saat 10 µM) olarak yumuşak su ve sert su ortamında bakır ve krom etkisinde kalan *O. niloticus*'da ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin % olarak hesaplanması. – olanlar azalışı + olanlar artışı göstermektedir.

Metal	Deney ortamı	144 saat küçük balıklar				144 saat büyük balıklar			
		Tot.	Mg	Na,K	Ca	Tot.	Mg	Na,K	Ca
Cr	Y. Su	+31	+34	+20	+83	-3	-0,5	-11	-22
Cr	S. Su	-10	-0,6	-16	+21	-4	-13	+26	-35
Cu	Y. Su	+38	+47	+6	+122	-18	-11	-37	-67
Cu	S. Su	-5	+9	-36	-31	-16	-14	-24	-42

4.1.3. Total Metal Düzeyi

Cu^{+2} ve Cr^{+6} etkisinde akut ve uzun süreli etkide kalan *O. niloticus*'un kas ve solungaç dokularında bakır düzeyleri artış gösterirken, krom düzeylerinde önemli bir artış görülmemiştir. Solungaç dokusunda yumuşak ve sert suda yaşayan küçük kontrol balıklarda hem akur hem de uzun süreli deneylerde bakır ölçülememiştir (SS<0.02). (Tablo 4.5.-4.7.). Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise bakır düzeyleri sırasıyla 1,5±2,6 ve 3,46±3,04 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 2,63±2,39 ve 3,38±1,25 olarak ölçülmüştür (Tablo 4.6.-4.8.).

Kas dokusunda da yumuşak ve sert suda yaşayan küçük kontrol balıklarda hem akur hem de uzun süreli deneylerde bakır ölçülememiştir (<0.02). (Tablo 4.9.-4.11.). Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise akut periyotta bakır ölçülemezken, uzun süreli deneylerde sadece sert su da 2,83±2,46 düzeyinde bakır ölçülmüştür (Tablo 4.10-4.12).

İstatistiksel farklar (P<0.05) Tablo 4.13 ve 4.14 den de görüleceği gibi genelde bakır deneylerinde olmuştur. Krom düzeyleri genelde AAS cihazının ölçüm sınırları altında kalmıştır (Cu için <0.02 µg/ml, Cr için <0.03 µg/ml).

4.1.4. Total İyon Düzeyi

O. niloticus'un akut ve uzun süreli olarak Cu^{+2} ve Cr^{+6} etkisinde kalması sonucu solungaç dokularında iyon düzeyleri birkaç istisna dışında önemli bir değişim göstermemiştir (Tablo 4.5.-4.8.). Solungaç dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda Na^{+} düzeyleri sırasıyla 19,4±1,7 ve 18,16±2,35 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 21,69±2,37 ve 20,8±3,41 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Na düzeyleri sırasıyla 13,78±4,53 ve 14,25±3,48 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 10,37±2,06 ve 10,61±1,37 olarak ölçülmüştür. Solungaç dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda K düzeyleri sırasıyla 11,96±1,51 ve 11,06±0,58 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 12,09±4,46 ve 9,76±0,22 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda

yaşayan büyük balıklarda ise K düzeyleri sırasıyla 8,16±2,17 ve 9,5±1,35 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 8,14±0,87 ve 8,46±1,17 olarak ölçülmüştür. Solungaç dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda Mg düzeyleri sırasıyla 1,4±0,19 ve 1,52±0,28 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 1,73±0,36 ve 1,47±0,12 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Mg düzeyleri sırasıyla 1,16±0,28 ve 1,12±0,24 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 0,98±0,13 ve 1,08±0,21 olarak ölçülmüştür. Solungaç dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda Ca düzeyleri sırasıyla 55,56±5,5 ve 63,36±13,63 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 69,99±15,57 ve 67,82±6,08 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Ca düzeyleri sırasıyla 55,86±14,7 ve 53,41±12,97 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 44,31±6,88 ve 46,88±8,46 olarak ölçülmüştür.

Kas dokusunda da iyon düzeyleri birkaç istisna dışında önemli değişimler göstermemiştir (Tablo 4.9.-4.12.). Akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda Na düzeyleri sırasıyla 10,93±0,4 ve 11,2±2,88 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 12,8±1,21 ve 13,23±1,1 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Na düzeyleri sırasıyla 6,9±1,11 ve 7,93±0,38 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 7,73±2,74 ve 6,93±1,56 olarak ölçülmüştür. Kas dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda K düzeyleri sırasıyla 19,23±0,65 ve 19,23±0,65 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 22,26±0,61 ve 21,23±1,88 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise K düzeyleri sırasıyla 18,73±2,64 ve 19,7±1,59 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 19,9±1,4 ve 20,36±0,71 olarak ölçülmüştür. Kas dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda Mg düzeyleri sırasıyla 1,28±0,07 ve 1,17±0,11 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 1,30±0,86 ve 1,29±0,11 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Mg düzeyleri sırasıyla 1,26±0,04 ve 1,25±0,05 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 1,26±0,052 ve 1,23±0,06 olarak ölçülmüştür. Kas dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol

küçük balıklarda Ca düzeyleri sırasıyla 9,67±5,58 ve 7,9±1,55 olarak ölçülürken bu değerler uzun süreli deneylerde 9,86±4,15 ve 6,83±4,47 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise Ca düzeyleri sırasıyla 2,63±1,6 ve 4,63±1,29 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 3,7±0,87 ve 4,23±3 olarak ölçülmüştür.

İstatistik analizlere ait sonuçlar ayrı tablolar halinde verilmiştir. Solungaç dokusunda (Çizelge 4.13) ve kas dokusunda (Çizelge 4.14) metal ve iyon düzeylerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel olarak özellikle iyonlar için çok az olduğu görülmektedir.

4.1.5.Total Protein Düzeyi

Akut ve uzun süreli olarak Cu^{+2} ve Cr^{+6} etkisinde kalan *O. niloticus* kas ve solungaç dokularında ölçülen toplam protein miktarları Tablo 4.15 ve 4.16 da verilmiştir. Solungaç dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol küçük balıklarda toplam protein miktarları sırasıyla 82,82±50,72 ve 171,52±44,45 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 141,25±48,89 ve 104,16±33,85 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise protein düzeyleri sırasıyla 34,94±19,91 ve 47,5±39,09 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 51,12±16,61 ve 61,61±20,3 olarak ölçülmüştür.

Kas dokusunda akut deneylerde yumuşak ve sert suda yaşayan kontrol balıklarda toplam protein miktarları sırasıyla 27,5±14,66 ve 59,3±20,02 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 68,39±24,2 ve 69,28±45,59 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.16). Aynı koşullarda yaşayan büyük balıklarda ise protein düzeyleri sırasıyla 24,03±4,77 ve 27,37±6,64 olarak ölçülürken, bu değerler uzun süreli deneylerde 24,73±6,57 ve 26,94±9,10 olarak ölçülmüştür.

Buna göre toplam protein miktarları her iki dokuda da sadece kontrol balıklarda anlamlı bir fark göstermiş, diğer durumlarda istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bir değişim görülmemiştir. İstatistiksel sonuçlar iyonlarla birlikte Çizelge 4.13 ve 4.14 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı göstermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.13 de verilmiştir.

Deney	Ortam	48 saat Küçük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,4.0±0,19	55,5±5,5	19,4±1,7	11,9±1,51
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,52±0,28	63,3±13,63	18,1±2,35	11,0±0,58
Cr	YS		<0.03	1,35±0,17	57,7±4,14	18,8±1,97	10,4±1
Cr	SS		<0.03	1,30±0,90	58,3±5,27	17,2±2,59	8,70±1,13
Cu	YS	12,1±10,5		4,435±5.51	180,4±219,7?	22,8±9,35	13,6±7,71
Cu	SS	20,4±13,9		1,50±0,24	62,8±8,13	15,0±0,14	8,70±1,31

Çizelge 4.6. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.13 de verilmiştir.

Deney	Ortam	48 saat Büyük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,16±0,27	55,86±14,7	13,78±4,53	8,16±2,17
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,12±0,26	53,41±12,97	14,25±3,48	9,5±1,35
Cr	YS		<0.03	1,15±0,24	47±7,69	9,35±1,32	8,14±1,59
Cr	SS		<0.03	1,05±0,07	44,92±3,46	9,1±1,33	7,7±0,7
Cu	YS	10,41±2,09		1,22±0,21	57,56±13,14	11,21±1,34	7,8±0,89
Cu	SS	8,22±1,5		1,15±0,21	46,99±2,97	9,43±0,008	8,29±0,008

Çizelge 4.7. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.14 de verilmiştir.

Deney	Ortam	144 saat Küçük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,73±0,36	69,99±15,57	21,69±2,37	12,09±4,46
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,47±0,12	67,82±6,08	20,8±3,41	9,76±0,22
Cr	YS		<0.03	1,51±013	66,95±4,14	20,43±2,27	10,29±0,3
Cr	SS		<0.03	1,20±0,13	54,2±4,42	15,45±2	8,41±0,73
Cu	YS	10,73±7,76		1,35±0,42	62,99±12,56	18,21±1,74	7,96±1,16
Cu	SS	13,42±1,87		1,33±0,40	58,83±17,27	16,27±3,46	8,9±0,95

Çizelge 4.8. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un solungaç dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.14 de verilmiştir.

Deney	Ortam	144 saat Büyük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	0,98±0,13	44,31±6,88	10,37±2,06	8,14±0,87
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,08±0,21	46,88±8,46	10,61±1,37	8,46±1,17
Cr	YS		<0.03	1,15±0,07	51,56±3,45	11,21±1,66	7,95±0,06
Cr	SS		<0.03	1,04±0,03	46,57±4,11	10,58±1,68	7,95±0,37
Cu	YS	14,45±4,07		0,98±0,12	44,72±2,59	9,16±0,95	6,94±0,87
Cu	SS	14,18±0,67		1,10±0,07	46,4±5,84	8,62±0,97	7,62±0,08

Çizelge 4.9. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.13 de verilmiştir.

Deney Kas	Ortam	48 saat Küçük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,28±,07	9,67±5,58	10,93±0,4	19,23±0,65
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,17±,112	7,9±1,55	11,2±2,88	19,23±0,65
Cr	YS		<0.03	1,34±,072	5,83±1,11	16,6±2,82	20,06±1,88
Cr	SS		<0.03	1,48±,122	17,23±13,34	14,8±0,53	18,53±0,8
Cu	YS	<0.02		1,61±,153	12,62±10,97	13,95±2,	16,67±4,02
Cu	SS	<0.02		1,46±,049	10,15±2,76	13,1±4,38	13,85±3,75

Çizelge 4.10. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.13 de verilmiştir.

Deney Kas	Ortam	48 saat Büyük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,26±0,04	2,63±1,6	6,9±1,11	18,73±2,64
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,25±0,05	4,63±1,29	7,93±0,38	19,7±1,59
Cr	YS		<0.03	1,26±0,02	4±1,82	7,53±2,18	16,57±1,43
Cr	SS		<0.03	0,82±0,71	2,37±2,3	5,13±4,45	11,8±10,22
Cu	YS	2,85±5,7		1,33±0,08	6,25±0,7	7,52±2,18	16,57±1,43
Cu	SS	0,95±1,34		1,25±0,02	7,25±1,2	5,75±1,2	14,75±1,48

Çizelge 4.11. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.14 de verilmiştir.

Deney Kas	Ortam	144 saat Küçük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,30±0,08	9,86±4,15	12,8±1,21	22,26±0,61
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,29±0,11	6,83±4,47	13,23±1,1	21,23±1,88
Cr	YS		<0.03	1,75±0,23	17,43±20,42	23,3±0,81	15,23±2,76
Cr	SS		<0.03	1,54±0,23	13,63±11,68	13,6±2,5	20,86±1,3
Cu	YS	1,77±3,55		1,34±0,21	12,1±4,72	10,35±1,62	16,95±1,32
Cu	SS	<0.02		1,43±0,13	12±5,37	12,05±4,59	17,4±0

Çizelge 4.12. Yumuşak (YS) ve sert (SS) su ortamında uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'un kas dokusunda ağır metal ve iyon düzeyleri. Veriler ortalama (µg/g k.a.) ve standart sapmayı içermektedir. Bu tabloya ait istatistiksel karşılaştırmalar Çizelge 4.14 de verilmiştir.

Deney Kas	Ortam	144 saat Büyük balıklar					
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Na^{+}	K^{+}
Kontrol	Y S	<0.02	<0.03	1,26±0,05	3,7±0,87	7,73±2,74	19,9±1,4
Kontrol	SS	<0.02	<0.03	1,23±0,06	4,23±3	6,93±1,56	20,36±0,71
Cr	YS		<0.03	1,39±0,11	8,73±0,75	7,1±1,59	18,9±3,57
Cr	SS		<0.03	1,40±0,17	5,06±3,7	5,4±1,23	18±4,92
Cu	YS	<0.02		1,41±0,10	9,75±6,53	6,3±1,56	17,27±0,21
Cu	SS	<0.02		1,32±0,11	11,05±5,02	7,45±0,49	17±0,14

Çizelge 4.13. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'da Cu ve Cr birikimi, iyon ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait istatistiksel sonuçlar. Bu tabloya ait veriler Tablo 4.5 de verilmiştir. Bu tabloda sadece $P<0.05$ değerinde olan sonuçlar farklı işaretlerle gösterilmiştir. ▲= Solungaç proteini, □ = Kas Proteini, X = Solungaç iyonları, O = Kas iyonları.

Deney	Karşılaştırılan Faktörler	48 saat Küçük Balıklar							48 saat Büyük Balıklar						
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	K^{+}	Na^{+}	Prt	Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	K^{+}	Na^{+}	Prt
Kontrol	Y. Su							□							□
Cr	Y. Su														
Cu	Y. Su	**X**													
Y. Su	Kontrol														
Y. Su	Kontrol	**X**		**O**					**X**			**O**			
S. Su	Kontrol			**O**				▲				**X**		**X**	
S. Su	Kontrol	**X**		**O**		**O**			**X**						

Çizelge 4.14. Yumuşak ve sert su ortamında ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'da Cu ve Cr birikimi, iyon ve protein düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait istatistiksel sonuçlar. Bu tabloya ait veriler Tablo 4.6. da verilmiştir. Bu tabloda sadece $P<0.05$ değerinde olan sonuçlar farklı işaretlerle gösterilmiştir. ▲= Solungaç protein, □ = Kas protein, X = Solungaç iyonları, O = Kas iyonları.

Deney	Karşılaştırılan Faktörler	144 saat Küçük Balıklar							144 saat Büyük Balıklar						
		Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	K^{+}	Na^{+}	Prt	Cu^{+2}	Cr^{+6}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	K^{+}	Na^{+}	Prt
Kontrol	Y. Su							□							□
Cr	Y. Su														
Cu	Y. Su	**X**													
Y. Su	Kontrol														
Y. Su	Kontrol	**X**		**O**					**X**			**O**			
S. Su	Kontrol			**O**				▲				**X**		**X**	
S. Su	Kontrol	**X**		**O**		**O**			**X**						

Çizelge 4.15. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'ın solungaç dokusunda toplam protein miktarları (mg/g yaş ağırlık). Bu değerlere ait istatistiksel sonuçlar Tablo 4.13. ve 4.14 da verilmiştir. YS= yumuşak su, SS= sert su.

Deney		48 saat Küçük alıklar	48 saat Büyük balıklar	144 saat Küçük balıklar	144 saat Büyük balıklar
Kont.	YS	82,82±50,72	34,94±19,91	141,25±48,89	51,12±16,61
Kont.	SS	171,52±44,45	47,5±39,09	104,16±33,85	61,61±20,3
Cr	YS	155,42±42,6	43,39±17,43	129,52±42,16	38,98±29,01
Cr	SS	100,21±25,74	47,25±27,82	119,17±31,52	57,34±22,74
Cu	YS	137,88±69,35	56,43±18,01	65,21±30,68	48,65±23,36
Cu	SS	136,51±44,15	50,65±27,12	98,78±20,77	53,46±20,37

Çizelge 4.16. Yumuşak ve sert su ortamında akut (48 saat 20 µM) ve uzun süreli (144 saat 10 µM) periyotta Cu ve Cr etkisinde kalan küçük ve büyük boy grubuna ait *O. niloticus*'ın kas dokusunda toplam protein miktarları (mg/g yaş ağırlık). Bu değerlere ait istatistiksel sonuçlar Tablo 4.13. ve 4.14 da verilmiştir. YS= yumuşak su, SS= sert su.

Deney		48 saat Küçük balıklar	48 saat Büyük balıklar	144 saat Küçük balıklar	144 saat Büyük balıklar
Kontrol	YS	27,5±14,66	24,03±4,77	68,39±24,2	24,73±6,57
Kontrol	SS	59,3±20,02	27,37±6,64	69,28±45,59	26,94±9,10
Cr	YS	54,48±16,47	24,87±8,98	79,61±32,38	19,72±4,79
Cr	SS	59,3±20,02	26,57±7,1	69,28±45,59	26,94±9,1
Cu	YS	52,48±8,70	25,85±5,96	42,65±17,57	19,51±8,33
Cu	SS	64,2±41,2	25,63±9,61	38,35±11,7	24,85±5,5

4.2. Tartışma

Bu çalışmada iki farklı sürede, iki farklı sertlik değerine sahip sularda, iki farklı bakır ve krom derişimleri etkisinde kalan, iki farklı boy grubuna ait balıkların osmoregülasyon sisteminin verdiği tepkiler ve bu tepkilerin farklı parametrelere göre değişimleri incelenmiştir. Akut (48 sa.) ve uzun süreli (144 sa.) olmak üzere iki farklı periyotta, 10 ve 20 µM bakır veya krom etkisinde kalan tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un osmoregülasyon sisteminin verdiği tepkiler yumuşak su (~60 mg $CaCO_3$/L) ve sert suda (~300 mg $CaCO_3$/L) araştırılmıştır. Büyük ve küçük balıkların fizyolojik farklılıkları ve metabolik hızlarının farklı olma olasılığı da göz önüne alınarak bütün deneyler hem küçük hem de büyük balıklar kullanılarak denenmiştir. Osmoregülasyon sistemi olarak ele alınan parametreler solungaç dokusunda çok önemli rolleri olan ATPaz enzimleridir (Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz, Total-ATPaz). Buna ilave olarak kas dokusunda sarkoplazmik retikulumlarda bulunan ve kas kasılmasında rolü olan Ca^{+2}-ATPaz enzim aktiviteleri de incelenerek, kas dokusunda meydana gelebilecek fizyolojik değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Ölçülen parametrelerin metal alınımı ile ilgisini araştırmak için dokulardaki toplam bakır ve krom birikimi de ölçülmüştür.

Genel olarak bakılırsa, bu çalışmadan elde edilen kontrol ATPaz aktivite değerleri,literatür veriler ve bizim laboratuarımızda yapılan önceki çalışmalardan elde edilen verilerle uygunluk göstermektedir (Ventrella ve ark., 1990; Diaz ve ark., 1998; Ay ve ark. 1999; Atli and Canli, 2009). ATPaz enzim aktiviteleri, akut dönem metal etkileri sonunda genellikle azalma veya artma şeklinde değişimler göstermiştir. ATPaz enzimlerinin metal tipi, derişimi ve doku tipine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte azalış yönünde tepki vermesi bu alanda yapılan çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007; Atli, 2009). Total protein düzeyi ise genelde önemli bir değişim göstermezken, total metal düzeyleri bakır dışında artış göstermemiştir.

Yapılan araştırmalar ağır metallerin sucul ortamlardaki etkilerinin oldukça karmaşık olduğunu ve suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Bu kapsamda bu çalışmada su sertliğinin metal toksisitesi üzerine olan

etkileri incelenmiştir. Balık osmoregülasyon sisteminin önemli bir parçası olan ATPaz enzimlerinin bu koşullardan nasıl etkilendiğinin araştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Suyun kimyasal özelliklerinin metal toksisitesi üzerine olan etkileri bilinmektedir (Heath,1987) Bunlardan tuzluluk, alkalinite, sertlik, pH ve çözünmüş organik maddeler sudaki serbest metal oluşumunu ve dolayısıyla da balıklar tarafından emilimini etkilemektedir (Lauren ve McDonald, 1986; Heath, 1987). Buna uygun olarak bu çalışmada kontrol koşullarında yumuşak ve sert suda yaşayan balıkların arasında önemli farklar olması, balık fizyolojisi açısından suyun sertliğinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Metal toksisitesinin sudaki çeşitli iyonların, EDTA, hidroksit, karbonat ve humik asit gibi şelat oluşturucu ajanların varlığında azaldığı ve aynı zamanda sert sulara göre yumuşak sularda da artış gösterdiği bilinmektedir (Meinelt ve ark., 2001). Bu nedenle, biyolojik belirteçlerin çeşitli toksik moleküllere gösterdikleri tepkileri değerlendirirken abiyotik faktörlerin etkilerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir (Monserrat ve ark., 2007). Bu çalışmada yumuşak suda ve sert suda metal etkisinde kalma sonucu meydana gelen farklar buna uygunluk göstermektedir. Bununla birlikte metallerin etkileri yumuşak suda daha fazla bulunmuştur. Sert sularda metal aktivitesi metallerin Ca^{+2} ve CO_3 ile bileşik oluşturmasına bağlı olarak düşüş gösterirken, yumuşak sularda düşük Ca^{+2} düzeyi nedeniyle toksik etki göstermektedir (Heath, 1987). Kadmiyumun Ca^{+2} analogu olarak Ca^{+2} kanallarına yüksek ilgi duyduğu ve yumuşak sularda toksisitesinde artış olduğu belirtilirken, sert sularda ise Cd^{+2} toksisitesi Ca^{+2} kanalları için Ca^{+2} ile büyük yarış nedeniyle düşmektedir (Verbost ve ark., 1989; Pratap ve Wendelaar-Bonga, 1993; Hollis ve ark., 2000). Benzer şekilde organik madde bakımından zengin olan humik maddeler ise serbest metal iyonları ile kompleks oluşturmaktadırlar. Metallerle olan bu etkileşimleri şelat oluşturma, kompleks bağlanma, iyon değişimi, yüzey bağlanması ve koagulasyon reaksiyonları şeklinde gerçekleşebilmektedir. Humik maddelerle metallerin kompleks oluşturmasının genellikle karboksilik ve fenolik hidroksil grupları aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Petersen ve ark., 1987; Meinelt ve ark., 2001; Playle ve ark., 1993; Van Ginneken ve ark., 2001). Bir diğer abiyotik faktör olan pH'nın ise sudaki düşük ve yüksek değerlerinin balıklar için toksik olduğu

belirtilirken, düşük pH'da Na^+ ve Cl^- iyonlarının solungaçlardan alımında inhibisyon, yüksek pH'da ise amonyak atımının bloke olduğu bilinmektedir (Heath, 1987). Sudaki pH etkisinin metal bileşiklerinin çözünürlüğü ve ayrışması üzerine olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde ortam tuzluluğunda meydana gelen değişimlerden de balıklarının osmoregülasyon sistemleri etkilemektedir. Laiz-Carrion ve ark. (2005), 38, 12 ve 6 ppt tuzluluk ortamlarında kalan *Sparus aurata*'da büyüme, osmoregülasyon ve metabolizma üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Plazma osmolalite, Na^+, Cl^- düzeylerini 12 ve 38 ppt tuz etkisindeki balıklarda benzer değerlerde gözlerken, 6 ppt tuz etkisindeki gruptan yüksek olduğunu bulmuşlardır. Solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin ise 6 ppt tuz etkisindeki grupta en yüksek değerde olduğunu ve bunu 38 ppt ve 12 ppt tuz etkisindeki grubun izlediğini gözlemlemişlerdir. Güner ve ark. (2005), *Oreochromis niloticus*'un deniz suyuna (% 36) adaptasyonlarını gösterdikleri çalışmalarında solungaç klorit hücre sayısının azaldığını, klorit hücre boyutlarında ise artış olduğunu ve solungaç Na,K-ATPaz aktivitesinin % 5 ve % 10 tuzluluk oranlarında düşüş gösterirken, % 25 tuzlulukta ise en yüksek değerine ulaştığını kaydetmişlerdir.

ATPaz enzimleri oldukça hassas olan ve çevresel koşullardan en fazla etkilenen enzimler arasındadır. Bu nedenle farklı çalışmalar arasında enzim aktiviteleri bakımından farklı değerlerin bulunması sıklıkla karşılaşılabilmektedir.Balık ATPaz kontrol aktiviteleri aynı grup hayvanlar arasında, hatta farklı mevsimlerde, farklı laboratuar koşullarında bile değişebilmektedir. Bu hassasiyeti göz önüne alarak örneklemenin yapıldığı her periyot için farklı kontrol balıkları kullanılmıştır. Bunlardan Na^+/K^+-ATPaz, hem deniz hem tatlı su teleostlarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organlara özgü bir enzimdir. Bu enzim hücre içi homeostazisin korunmasından sorumlu olup, 3 Na^+ iyonunu hücre dışına 2 K^+ iyonunu hücre içine taşıyarak osmotik dengeyi sağlamaktadır. Bunun için gerekli olan enerji ATP den sağlanmaktadır. (Heath, 1987; Diaz ve ark., 1998; Ribeiro ve ark., 2002). Mg^{+2}-ATPaz ise hücre zarının bütünlüğü ve geçirgenliğinin korunmasında görev alan bir enzim olup Mg^{+2}'nin taşınmasından sorumludur. Özellikle mitokondriyal zarlarda bulunan Mg^{+2}-ATPaz, önemli enerji bağıntılı enzimdir ve Mg^{+2}-ATPaz inhibisyonu oksidatif fosforilasyonu

etkilemektedir. Ca^{+2}-ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olmakta olup, hücre zarının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2} iyonlarının varlığı ile aktive olmaktadır. Bu enzimde ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} iyonlarının uzaklaştırılmasın sağlayarak hücre içeriğindeki düşük Ca^{+2} seviyesinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark., 2000).

Ağır metallerin ATPaz enzimlerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Atli and Canli, 2007). Özellikle bakır, gümüş, kadmiyum, çinko ve civa gibi ağır metallerin teleost balıklarda ATPaz inhibisyonuna neden olarak osmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları görülmüştür (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2005). Örneğin 14 gün kadmiyum (1.6 mg Cd/L) etkisinde kalan *Cyprinus carpio*'nun solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin % 30 inhibe olduğu, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin ise % 70 oranında arttığı gösterilmiştir. Balıklar Cd^{+2} içermeyen suda 19 gün bekletildiğinde sadece Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol düzeyine yaklaştığı gözlenmiştir (De la Torre ve ark. 2000). Benzer şekilde, Ay ve ark. (1999), Cu^{+2} ve Pb^{+2} (0.5-4.0 mg/L) etkisinde 14 gün kalan *Tilapia zillii*'nin solungacında Na^{+}/K^{+}-ATPaz enzim aktivitesinin önemli oranda azaldığını göstermiştir. Atli ve ark. (2007), *Oreochromis niloticus* ile yaptıkları çalışmada 5, 10 ve 20 µM derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkileri sonunda solungaç ve bağırsak dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, kas dokusunda ise Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Enzimlerin metaller tarafından etkilendiği belirtilirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin bütün metal etkilerinde inhibe olduğu yalnızca solungaçta 20 µM Pb^{+2} etkisinde artış gösterdiği, kas Ca^{+2}-ATPaz enziminin ise Cu^{+2} dışındaki diğer metal etkilerinde inhibe olduğu bildirilmiştir. ATPaz aktivitesinde meydana gelebilecek değişimlere bağlı olarak iyon dengesinde de önemli oranda artış yada azalışlar olabilmektedir. Pelgrom ve ark. (1995), *Oreochromis mossambicus*'un ağır metallerin plazma ve tüm vücut Na^{+}, Ca^{2+} ve Cl^{-} düzeylerini değiştirdiğini göstermiştir. Benzer şekilde ağır metal etkisinde kalan *Oreochromis niloticus*'un serum Na^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} ve Cl^{-} düzeylerinde önemli oranda değişimler meydana gelmiştir (Oner ve ark., 2008). Humik maddeleri ve Ca^{+2}'nin zebra balığı *Danio rerio*'da Cd^{+2} toksisitesine olan etkisinin incelendiği çalışmada,Ca^{+2} ve humik

maddelerinin balığı Cd^{+2} toksisitesine karşı koruduğu gözlenmiştir. Cd^{+2}'nin Ca^{+2}'ye göre humik maddelerine daha ilgili olduğu ve bu nedenle de humik maddelerinin fonksiyonel gruplarının Cd^{+2} ile dolarak koruyucu bir rol üstlendiği ve metallere karşı detoksifikasyon potansiyeli gösterdiği belirtilmiştir (Meinelt ve ark., 2001). McGeer ve ark., (2002) Cu^{+2} etkisindeki *Onchorhynchus mykiss* ile yaptıkları çalışmada çözünmüş organik madde varlığında etki süresi sonunda plazma Na^{+} düzeyinde gözlenen düzelmenin artan Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi ile ilişkili olabileceğini kaydetmişlerdir. Sonuç olarak araştırıcılar balıkta büyüme, dokulardaki Cu^{+2} birikiminin kronik Cu^{+2} etkilerini değerlendirmede zayıf belirteçler olduğunu ve humik maddelerin kronik Cu^{+2} etkinliği, birikimi ve toksisitesini azaltarak düzenleyici rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Buna karşın diğer metallere göre yüksek toksisiteye sahip Ag^{+} etkisindeki *O. mykiss*'de vücut Na^{+} düzeyindeki düşüşü içeren iyonoregülatör hasarla ilişkili gözlenen balık ölümlerinde çözünmüş madde varlığındaki düşüşün gözlenmesine karşın, Na^{+} ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivite düzeyine bağlı iyonoregülatör hasarı önlemede bunların yetersiz kaldığı kaydedilmiştir (Brauner ve Wood ve ark., 2002). Carvalho ve Fernandes (2006),düşük pH değerinde tropikal balık *Prochilodus scrofa*'nın hematokrit değerlerinde artış, hemoglobin değerlerinde ise azalış kaydetmişlerdir. Araştırıcılar sonuç olarak pH farklılığına bağlı olarak balığın hematolojik değerlerinde gözlenen değişikliklerin karmaşık olmakla birlikte iyonoregülatör ve solunum sistemlerindeki bozuklukları işaret ettiğini belirtmişlerdir. Somon *Salmo salar* ile yapılan çalışmada ise düşük pH ve inorganik aluminyum etkisindeki balıkların solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin indirgendiği ve aynı zamanda plazma Cl^{-}, kortizol ve glukoz düzeylerinde değişiklik gözlendiği belirlenmiştir (Monette ve McCormick, 2008). Araştırıcılar azalan enzim aktivitesinin, apopitoz ve nekroz ile artan klorit hücre ölümü ve Al iyonlarının enzim molekülüne doğrudan bağlanmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır. Bununla birlikte, Cleveland ve ark. (1991) Ca^{+2} derişimi ve pH düzeylerindeki azalmanın balıkta iyon düzenlenmesinde hasara özellikle de Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2}, P ve Cl^{-} düzeylerinde indirgenmeye yol açtığını kaydetmişlerdir.

Enzimler ağır metal iyonlarından çeşitli şekilde etkilenerek aktivitelerinde değişim meydana gelmektedir. Öncelikle enzimlerin yapısında bulunan –SH grupları

metal iyonlarının birinci hedefleri arasındadır. Bu bağlanma enzimin üç boyutlu yapısında bozulmalara neden olduğundan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olabilmektedir. Karbonik anhidraz enziminin yapısındaki Zn^{+2} gibi bazı enzimlerin yapısında ağır metal iyonları vardır.Bazı metaller enzimin yapısındaki gerekli metal ile yer değiştirerek yine onun üç boyutlu yapısında değişikliklere neden olabilmekte, bu da doğal olarak aktivitedeki değişime neden olmaktadır. Bir diğer etki şekli de metal iyonlarının proteinlerin yapısına girerek şelat veya tuz oluşturmasıdır (Dawson, 1982; Brooks ve Mills, 2003).

Hücre zarlarına bağlı bulunan ATPazlar zar geçirgenliği, osmotik basınç ve doku iyon hareketleri üzerinde önemli görevlere sahiptir. Bu enzimlerin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine hassas olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Özellikle balıklar için çevre suyunda bulunan bu metallerin ATPaz enzimleri üzerine olan direkt etkileri nedeniyle önemi daha da fazladır. Çünkü balıklar suyun osmolaritesine karşı kendi hücrelerindeki osmotik dengeyi sağlamak için özellikle solungaç dokusunun aktif çalışmasına gereksinim duymaktadır. Solungaç dışında böbrek ve bağırsak da osmoregülasyonda önemli olan organlardır. Osmotik basıncın düzenlenmesinde başlıca Na^{+} ve Cl^{-} iyonları ve daha sonra K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları önemli rol oynamaktadır (Larsson ve ark., 1985; Pinkney ve ark., 1989; Simkiss ve Taylor, 1989; Pelgrom ve ark., 1995; De La Torre ve ark., 2000).Balıkların çevre koşullarına olan hassasiyeti incelerken, onun anatomik yapısını da iyi bilmek gerekir. Solungaç dokusu epiteli gazları, elektrolitler, su ve azotlu atıkların iletilmesinde görev alan en önemli ve karmaşık epitellerden biridir. Solungaç dokusunu oluşturan filamentler ve onların yapısını meydana getiren lameller o kadar büyük yüzey alanı oluştururlar ki bu alan neredeyse balığın total yüzey alanının % 50 kadarına denk gelebilmektedir. Bu kadar geniş yüzey alanına sahip bir dokunun sürekli çevredeki toksik metal iyonları ile yüz yüze gelmesi sonucu etkilenme kaçınılmaz olabilmektedir. Kas dokusu bu şekilde metal iyonları ile temas etmese bile besin zincirinde önemli bir yer tutabilir. Çünkü yenilebilen organ olduğundan birikmiş toksik maddelerin iletilmesinde aracı olabilir. Ayrıca sarkoplazmik retikulumlarda yer alan ve kas kasılmasında görevi olan Ca^{+2}-

ATPaz'ın yüksek miktarlarda bu dokuda bulunması toksikolojik çalışmalarda önemini artırmıştır (Heath, 1987; De La Torre ve ark., 2007).

Bu çalışmada olduğu gibi organizmanın büyüklüğü metal alınımında ve metabolizmasında, sonuçta da metal toksistesinde çok önemli yer tutmaktadır. Ortamdaki metal düzeyi,sucul organizmaların metabolize etme kapasitelerinin altında ise metal alınımı ve metal atılımı dengede olacağından önemli bir doku birikimi olmamaktadır ve organizma büyüdükçe doku derişimi azalabilmektedir. Canli ve Atli (2003) yaptıkları çalışmada, Akdeniz'de yaşayan 6 balık türünün dokularında ağır metal birikimini incelemişler ve bunun balık boyu ile ilişkisini araştırmışlardır. Sonuçlar,balık boyu arttıkça metal derişiminin azalma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Bu durumu, Akdeniz'de örnekleme alanındaki metal derişiminin balıkların düzenleme eşiğinin altında kalması sonucu birikim olmamasına ve büyüme ile azalmayı da küçük balıkların hızlı metabolik aktivitelerine bağlamışlardır. Fakat burada civa gibi metaller genellemenin dışında tutulmalıdır, çünkü civa özellikle kas dokusunda sürekli birikme eğilimindedir (Canlı ve Erdem 1994). Balık boyu ile civa birikimin doğru orantılı olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Farkas ve ark., 2003; Canpolat ve Calta, 2003). Bu çalışmada genel olarak bakıldığında küçük balıkların daha fazla etkilendiği görülmektedir. Bunun yorumlanması da yine büyük balıklara oranla daha hızlı metabolik aktiviteye sahip olmaları ve bu nedenle enzimlerin daha sıklıkla metal iyonları ile temas etmesi şeklinde yapılabilir. Fuentes ve ark. (1996), gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in farklı boylara sahip bireylerinde ATPaz enzimlerinin nasıl etkilendiğini araştırmışlardır.

Metaller alındıktan sonra çeşitli yolları izleyerek metabolizmaya katılırlar.İlk aşama öncelikle epitel hücrelerle temas ile başlayan bir süreçtir. Bu metal iyonlarının bir kısmı zara bağlanırken bir kısmı hücreye giriş yaparak hücre içi etkileşime girer. Daha sonra kana geçen metaller farklı organlara iletilerek, depo edilirler veya atılırlar. Bir kısmı önemli moleküllere bağlanarak onlar üzerinde toksik etki yaratırlar. Na^+ iyonu elektrokimyasal gradiente göre dış ortamdan hücre içine girer, hücreden kana geçişi de Na^+/K^+-ATPaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Metal iyonları örneğin bakır da Cu^{+2} veya Cu^+ formunda zarlardan geçebilmekte ve zar

potansiyelini bozabilmektedir. Böylece Na^+ kanallarından iletilen bakır iyonları Na^+/K^+-ATPaz enziminin aktivitesini değiştirebilmektedir.Na^+/K^+-ATPaz aktivitesini enzimin inhibisyonu bakırın tiyol gruplarına veya Mg^{+2} bağlama bölgelerine bağlanması sonucu oluşmaktadır (Handy ve ark., 2002). Araştırmalar bakırın Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki azalmanın ,doku Na^+ iyon düzeyinin azalması sonucu ortaya çıktığını göstermiştir.(Li ve ark., 1998; Handy ve ark., 2002) Bakır etkisinde ayrıca K iyonlarının Na^+/K^+-ATPaz tarafından alımının azalması sonucu doku K^+ düzeyinin de azaldığı vurgulanmıştır.

Krom bakır kadar toksik etki göstermese de özelikle ATPaz enzimleri üzerine etkileri görülmüştür. Kuhnert ve ark. (1976), alabalık *Salmo gairdneri*'yi 2.5 mg Cr^{+6}/L'nn etkisinde 48 saat tutmuşlardır. Sonuçta Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki inhibisyonu gözlerken, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde önemli bir değişikliğin olmadığını vurgulamışlardır. Midyelerle (*Perna viridis*) yapılan bir çalışmada, 1 mg Cr^{+2}/L etkisinde midyelerin farklı dokularında Na^+/K^+-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. Araştırıcılar bu azalmanın zarın lipit yapısının bozulması sonucu burada bulunan ATPaz enzimlerinin de etkilendiği sonucuna varmışlardır (Vijayavel ve ark., 2007).

Kronik metal etkileri her zaman toksik sonuç vermeyebilir. Özellikle enzimler söz konusu olduğunda akut olarak görülen etkilerin kronik süreçte çeşitli mekanizmalar ile telafi edildiği görülmüştür. Kronik (21 gün) bir denemede, *O. niloticus* 40 ve 400 µg Cu^{+2}/L etkisine bırakılmış ve deney sonunda solungaçta bakır birikimi olduğu, bununla ters orantılı olarak da Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Bununla birlikte % 100 Na^+/K^+-ATPaz inhibisyonunun 3. günde gözlenmesine karşın, plazma Na^+ ve Cl^- düzeylerindeki yavaş azalışın uzun süreli etkilerde telafi mekanizmalarının devreye girmesi ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Monteiro ve ark., (2005). McGeer ve ark., (2002) *O. mykiss*'i 30 gün süreyle 7 mg Cu^{+2}/L etkisine bıraktıktan sonra plazma Na^+ düzeyindeki azalışın Cu^{+2}'nin ilk etkisinin bir sonucu, Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin 29. günde artış göstermesinin ise homesotazisi düzenleme ve koruma amaçlı olduğunu belirtmişlerdir. Bakır 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 birikim sonrası tekrar eski düzeylerine dönebileceği kaydedilmiştir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki değişikliklerin balık türü, metal ve in vivo ile in vitro uygulamalarda olduğu gibi etki koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebileceği belirtilirken, derişime bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesindeki azalış sonucunda metallerin iyonoregülatör ve osmoregülatör mekanizmaları etkiledikleri vurgulanmıştır (Ay ve ark.1999). Otuz gün süre ile 12.8 ve 55.2 µM Cu^{+2} etkisine bırakılan balıkların (*Opsanus beta*) solungaç, karaciğer ve böbrek dokularındaki Cu^{+2} birikimine karşılık solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişikliğin olmadığın görülmüştür (Grosell ve ark., 2004). Buna karşın bizim laboratuarımızda yapılan önceki çalışmada bakır birikimi sonucu Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde azalmaların olduğu görülmüştür (Atli, 2009). Metal toksisitesinde türler arasında çeşitli farklar görülebilmektedir. Bunda en büyük etkenlerden bazıları türün biyolojik özellikleri, metallere duyulan duyarlılık, dokularda birikimi ile dağılımındaki farklılıklar ve antioksidant sistem gibi hücresel savunma mekanizmalarındaki farklar sayılabilir (Grosell ve ark., 2002; Taylor ve ark., 2003; Garcia-Santos ve ark., 2006). Aynı tür özellikleri olan ve aynı laboratuarda yürütülen bir çalışmada *Tilapia zillii* 0.5-4.0 mg/L derişim aralığındaki Cu^{+2} ve Pb^{+2} etkisine 2 hafta süre ile tutulmuşlardır. Çalışmanın solungaç dokusunda Cu^{+2} ve Pb^{+2} birikimi ve buna bağlı Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde inhibisyon görülmüştür (Ay ve ark.,1999) Uzun süreli bir denemede *Fundulus heteroclitus* 30 ve 150 µg Cu^{+2}/L etkisine 30 gün süre tutulmuştur. Balıkların Na^+ alımında azalma olduğu bununda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesind bir azalmaya yol açtığı ve sonuçta genel bir Na^+ azlığı meydana geldiği görülmüştür (Blanchard ve Grosell, 2006). Diğer toksik maddelerle karşılaştırıldığında Cu^{+2} toksisitesinin Hg^{+2}'den az Zn^{+2} ve Cd^{+2}'den yüksek olduğu bilinmektedir (Heath, 1987; Gagnon ve ark., 2006). İn vivo metal etkilerinde enzim inhibisyonun homeostatik düzenleme ile telafi edilmesi sonucu enzim aktivitesi normal düzeylerine dönebilmektedir. Bu durum da enzim sayısındaki ve turnover oranındaki artışla gerçekleşebilmektedir (Ay ve ark., 1999).

Thaker ve ark. (1996) *Periophthalmus dipes'*u farklı (5, 10 ve 15 mg/L) Cr^{+6} derişimlerinin etkisine 2, 4 ve 6 gün süreyle maruz bırakmış ve solungaç dokusunda

ATPaz enzim aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırıcılar etki süresinin daha önemli olduğunu fakat inhibisyonun derişime de bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. (Atli.,2009) *O. niloticus* ile yapılan çalışmada Cr^{+6}'nın akut süreçte Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesine olan etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmazken, kronik süreçte azalışa neden olduğunu vurgulamıştır. Araştırıcılar Cr^{+6}'nın dokularda osmoregülatör sistemi bozduğunu, ATPaz enzim sistemini inhibe ederek iyon ve metabolitlerin emiliminin azaldığını vurgulamışlardır (Thaker ve ark.,1996). *C. carpio*'da serum protein düzeyinin 2.0 ve 20 mg/L derişimindeki Cr^{+6} etkisinde 7 günde nemli oranda değişmediğini göstermiştir (Canli, 1995).

Bu çalışmanın sonuçları sucul ortamlarda ağır metal kirliliğinin tespitinde ve canlı organizmalara olan etkilerinin belirlenmesinde, su kimyasının ve organizmanın metabolik faaliyetlerinin önemli kriterler olabileceğini ve çevresel etki değerlendirilmeleri yapılırken bunların dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır. Sucul organizmalar, özellikle tatlı sularda yaşayanlar hem kısa süreli yüksek metal derişimlerine, hem de düşük derişimlerde kronik etkilere maruz kalabilirler. Özellikle ağır metal etkilerinin subletal düzeylerde belirlenmesi, canlı populasyonlarınn karşılaşabileceği kronik metal toksisitesi hakkında daha anlamlı sonuçlar verebilecektir. Bu çalışmada balık osmoregülasyon sisteminin ağır metal toksisitesine verdiği tapkiler farklı kimyasal özelliklerdeki sularda test edildi. Benzer şekilde diğer metabolik yolların nasıl tepkiler vereceği ile ilgili çalışmaların yapılması, organizmanın bir bütün olarak ağır metallerden nasıl ve ne kadar etkilendiği hakkında aydınlatıcı bilgiler verebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. İki farklı boy grubuna ait tatlısu balıkları *O. niloticus*, akut (20 µM 48 saat) ve uzun süreli (10 µM 144 saat) metal (Cu^{+2}, Cr^{+6}) etkisine bırakılmıştır. Bu sürelerde ve derişimlerde balık ölümleri gözlenmemekle beraber, kronik süreçte bakır etkisi sonucu 168 saatten sonra birkaç balık ölümü gözlenmiştir. Farklı deneylerde kullanılan balık boyları gruplar arasında fark göstermemiştir.

2. Balıkların solungaç dokusunda Total-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktiviteleri ölçülürken, kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür. Metal tipi, derişimi, etki süresi, su sertliği ve balık boyuna bağlı olarak genellikle ATPaz aktivitelerinde değişimler görülmüştür.

3. Su sertliğinin metal toksistesinde önemli etkileri olduğu ve ATPaz enzim aktivitelerine yumuşak suda yaşayan balıkların ATPaz aktivitelerinde genelde bir azalma olduğu görülürken, bu etki bakır deneyinde daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Farklı sularda yaşayan kontrol balıklarda da enzim aktivitelerinde önemli farklar görülmüştür.

4. Balık dokularında metal birikimlerinin atomik absorpsiyon yöntemi ile ölçülmesi sonucu bakır birikimin olduğu fakat krom birikiminin genellikle olmadığı veya ölçme sınırının altında kaldığı görülmüştür. Toplam protein miktarı ise hem solungaç hem de kas dokusunda genelde değişmemiştir.

5.2. Öneriler

1.Bu çalışma su sertliği ve balık büyüklüğünün metal toksisitesi ve bunun sonucu olarak ATPaz enzimlerinin çalışmasında meydana getirdiği değişimleri inceleyerek, balık osmoregülasyon sisteminin subletal metal kirliliği için iyi bir belirteç olup olamayacağı hakkında bazı fikirler edinmek üzere tasarlanmıştır. Bilindiği gibi metal toksisitesini etkileyen diğer faktörlerde bulunmaktadır. Bunlar arasında suyun pH'sı, organik madde içeriği ve tuzluluğu sayılabilir. Bunun gibi suyun diğer kimyasal

özelliklerini de çalışarak daha geniş bir araştırma alanı elde edilebilir ve karşılaştırmalı sonuçlar üretilebilir.

2. Balık biyolojisinin önemi metal toksisitesinde önemli olabilmektedir. Farklı balık türleri çalışılarak türler arasındaki direnç karşılaştırmaları yapılırken, türlerin metal toksisitesine verdikleri tepkilerde karşılaştırılabilir.

3. Bu çalışma temelde balıkların metal toksistesine verdikleri tepkilerin fizyolojik yönden incelenmesine dayanmaktadır. Farklı biyokimyasal belirteçlerin de araştırılmasıyla, konunun daha derin incelenmesi sağlanabilir, özellikle metallothionein gibi metal bağlayan proteinlerin araştırılması metal toksisitesinde önemli bir konu olabilir.

4. Antioksidan sistem çevresel stresten oldukça fazla etkilenebilmektedir. Metal toksistesi de bir stres unsuru olarak, toksikolojik çalışmalarda kullanılarak, konunun farklı yönden ele alınması sağlanabilir.

5. Doğal ortamlarda balık popülasyonlarının karşılaştığı metal stresi hakkında bilgi edinebilmek amacıyla, laboratuar ortamında yapılan çalışmaların arazi çalışmalarında da yapılması metal etkilerini gözlemde çok daha hassas ve doğru sonuçlar verebilir.

KAYNAKLAR

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.

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

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

ATLI, G.,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

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.

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

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

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

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

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

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

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

BOUSKILLA, N.J., HANDY, R.D., FORD, T.E., and GALLOWAYA, T.S., 2006. Differentiating Copper and Arsenic Toxicity Using Biochemical Biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 342–349.

BRAUNER, C.J., and WOOD, C.M., 2002. Effect of Long-term Silver Exposure on Survival and Ionoregulatory Development in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Embryos and Larvae, in the Presence and Absence of Added Dissolved Organic Matter. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 161–173.

BROOKS, S.J., and MILLS, C.L., 2003. The Effect of Copper on Osmoregulation in the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 135: 527–537.

BROUWER, M., WHALING, P., and ENGEL, D.W., 1986. Copper-metallothioneins in the American Lobster, *Homarus americanus*: Potential Role as Cu (I) Donors to Apohemocyanin. Environmental Health Perspectives, 65: 93-100.

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.

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

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

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

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

CANPOLAT,O. and CALTA,M. , 2003. Heavy metals in some tissues and organs of Capoeta capoeta umbla(Heckel,1843) fish species in relation to body size,age,sex and seasons.Fresenius Environmental Bulletin,12(9):961-966

CARVALHO C.S., Fernandes M.N.,2006 Effect of Temperature on Copper Toxicity and Hematological Responses in the Neotropical fish *Prochilodus scrofa* at Low and High pH, *Aquaculture*, 251, 109-17.

CLEVELAND L., Little E.E., Ingersoll C.G., Wiedmeyer R.H., Hunn J.B.,1991. Sensitivity of Brook Trout to Low pH, Low Calcium and Elevated Aluminum Concentrations during Laboratory Pulse Exposures, *Aquatic Toxicology*, 19,303-18

COUSINS, R.J., 1985. Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Physiological Review, 65: 238-309.

DAWSON, A.P., 1982. Kinetic Properties of the Ca^{2+}-accumulation System of a Rat Liver Microsomal Fraction. Biochemical Journal, 206: 73-79.

DE BOECK, G., HATTINK, J., FRANKLIN, N.M., BUCKING, C.P. WOOD, S., WALSH, P.J., and WOOD, C.M., 2007. Copper Toxicity in the Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) Urea Loss Contributes to the Osmoregulatory Disturbance. Aquatic Toxicology, 84: 133-141.

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

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

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

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

FARKAS, A, SALANKI, J and SPECZIAR, A , 2003. Age and size specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish Abramis brama L. Populating a low-contaminated site.Water Research, 37(5):959-964

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

GAGNON, A., JUMARIE, C., and HONTELA, A., 2006. Effects of Cu on Plasma Cortisol and Cortisol Secretion by Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 78: 59–65.

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.

GEORGE, S.G., 1991. Cell Biochemistry and Transmembrane Transport of Some Metals (E. MERIAN editör). Metals and Their Compounds in the Environment, New York, s.511-521.

GROSELL, M., HOGSTRAND, C., WOOD, C.M., and HANSEN, H.J.M., 2000. A Nose-to-nose Comparison of the Physiological Effects of Exposure to Ionic Silver Versus Silver Chloride in the European Eel (*Anguilla anguilla*) and the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 48: 327–342.

GROSELL, M., NIELSEN, C., and BIANCHINI, A., 2002. Sodium Turnover Rate Determines Sensitivity to Acute Copper and Silver Exposure in Freshwater Animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 133: 287–303.

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.

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.

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

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.

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

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

KAMAL, A.H.M.M., and MAIR, G.C., 2005. Salinity Tolerance in Superior Genotypes of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and Their Hybrids. Aquaculture, 247: 189-201.

KAMUNDE, C., CLAYTON, C., and WOOD, C.M., 2002. Waterborne vs. Dietary Copper Uptake in Rainbow Trout and the Effects of Previous Waterborne Copper Exposure. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 283: 69-78.

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

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

LAIZ-CARRION R., Sangiao-Alvarellos S., Guzman J.M., Martin del Rio M.P., Soengas J.L., Mancera J.M., 2005 Growth Performance of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* in Different Osmotic Conditions: Implications for Osmoregulation and Energy Metabolism, *Aquaculture*, 250, 849-861.

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.

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.

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.

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

MONETTE M.Y., McCormick S.D., 2008 Impacts of Short-term Acid and Aluminum Exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) Physiology: A Direct Comparison for Parr and Smolts, *Aquatic Toxicology*, 86, 216-26.

MONSERRAT, J.M., MARTINEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L., MARTINS, C.M.G., PINHO, G.L.L., CHAVES, I.S.C., FERREIRA-CRAVO, 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.

MORGAN, T.M., GROSELL, M., PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 2004. The Time Course of Silver Accumulation in Rainbow Trout during Static Exposure to Silver Nitrate: Physiological Regulation or an Artifact of the Exposure Conditions? Aquatic Toxicology, 66: 55–72.

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.

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

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

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

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

PETERSON R.C., Hargeby, A., Kullberg A.,1987 Biological Importance of Humic Material in Acidified Waters. A Summary of the Chemistry, Biology and Ecotoxicology of Aquatic Humus in Acidified Surface Waters, National Swedish Environment Protection Board, Solna (Sweden), p. 149

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.

PLAYLE R.C., Dixon D.G., Burnison K.,1993 Copper and Cadmium Binding to Fish Gills: Modification by Dissolved Organic Carbon and Synthetic Ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 2667-77.

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.

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

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

SARDELLA, B.A., COOPER, J., GONZALEZ, R.J., and BRAUNER, C.J., 2004. The Effect of Temperature on Juvenile Tilapia Hybrids (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) Exposed to Full-strength and Hypersaline Seawater. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 137: 621-629.

SARIHAN, E., and TORAL, Ö., 1982. Bir Tropikal Balık Türü Olan *Tilapia nilotica* (L.) 1758'in Çukurova Bölgesi'nde Yetiştirme Sorunları Üzerine Bir Tartışma. Tübitak 7. Bilim Kongresi (9 Eylül- 3 Ekim 1980). Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu Tebliğleri, Ankara, 33-44.

SARKAR, B., 1989. Metal-Protein Interactions in Transport, Accumulation, and Excretion of Metals. Biological Trace Element Research, 21: 137-144

SAXENA, T.B., ZACHARIASSEN, K.E., and JORGENSEN, L., 2000. Effects of Ethoxyquin on the Blood Composition of Turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127: 1–9.

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.

SPRY, D.J., and WIENER, J.G., 1991. Metal Bioavailability and Toxicity to Fish in Low-alkalinity Lakes a Critical Review. Environmental Pollution, 71: 243-304.

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

TAYLOR, L.N., WOOD, C.M., and McDONALD, D.G., 2003. An Evaluation of Sodium Loss and Gill Metal Binding Properties in Rainbow Trout and Yellow Perch to Explain Species Differences in Copper Tolerance. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 2159–2166.

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.

VAN GINNEKEN L., Bervoets L., Blust R.,2001 Bioavailability of Cd to the Common Carp, *Cyprinus carpio*, in the Presnce of Humic Acid, *Aquatic Toxicology*, 52, 13-27.

VENTRELLA, V., TROMBETTI, F., PAGLIARANI, A., TRIOARI, G., and ANNA BORGATTI, R., 1990. Gill (Na^+-K^+) - and Na^+-stimulated Mg^{2+}-dependent ATPase Activities in the Gilthead Bream *(Sparus auratus* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 95 (1): 95-105.

VERBOST, P.M., FLIK, G., PANG, P.K.T., LOCK, R.A.C., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1989. Cadmium Inhibition of the Erythrocyte Ca^{2+} Pump a Molecular Interpretation. The Journal of Biological Chemistry, 264: 5613-5615.

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

VIJAYAVEL, K., GOPALAKRISHNAN, S., and BALASUBRAMANIAN, M.P., 2007. Sublethal Effect of Silver and Chromium in the Green Mussel *Perna viridis* with Reference to Alterations in Oxygen Uptake, Fltration Rate and Membrane Bound ATPase System as Biomarkers. Chemosphere, 69: 979–986.

WANG, W.N., WANG, A.L., CHEN, L., LIU, Y., and SUN, R.Y., 2002. Effects of pH on Survival, Phosphorus Concentration, Adenylate Energy Charge and Na^+–K^+ ATPase Activities of *Penaeus chinensis* Osbeck Juveniles. Aquatic Toxicology, 60: 75–83.

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.

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.

ZHANG,L and WANG,WX ,2007. Size-dependence of the potential for metal biomagnification in early life stages of marine fish.Environmental Toxicology and Chemistry, 26(4):787-794

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Gaziantep'te doğdum. İlk öğrenim sürecim Samsun Havza 25 Mayıs İlköğretim Okulu'nda başladı.1993 yılından itibaren İskenderun Demir-Çelik İlköğretim Okulu'nda Orta öğrenimimi, 2002 yılında İskenderun Demir-Çelik Anadolu Lisesi'nde lise Öğrenimimi tamamladım.

2002 yılında kazanmış olduğum Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne yatay geçiş yaptım ve buradan mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimime başladım.