ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuzluluğu Artan Sularda Titanyum ve Alüminyum Nanopartikülleri Etkisinde Kalan Balıkların (*Oreochromis niloticus*) Ozmoregülasyon Sisteminin İncelenmesi

Nagihan PEPE

Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
1. GİRİŞ 1
1.1. Tuzluluk 1
1.2. Nanopartiküller 3
1.3. Ozmoregülasyon Sistemi 3
1.4. Tatlısu Çuprası (*Oreochromis niloticus)* 6
1.5. Amaç 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 9
3. MATERYAL VE METOT 13
3.1. Materyal 13
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 13
3.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar 13
3.2. Metot 14
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı 15
3.2.2. ATPaz Aktivitelerinin Ölçümü 16
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini 17
3.2.4. Total Protein Analizi 17
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması 19
3.2.6. Dokularda Nanopartikül Birikiminin Ölçülmesi 20
3.2.7. Nanopartikül Karakterizasyonu 20
3.2.8. İstatistik 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1. Bulgular 23
4.1.1. Akut Deneyler 23
4.1.2. Kronik Deneyler 29
4.1.3. Metal Birikimi 35
4.2. Tartışma 38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 43
5.1. Sonuçlar 43
5.2. Öneriler 43
KAYNAKLAR 45

ÖZGEÇMİŞ 53

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuzluluğu Artan Sularda Titanyum ve Alüminyum Nanopartükülleri Etkisinde Kalan Balıkların (*Oreochromis niloticus*) Ozmoregülasyon Sisteminin İncelenmesi

Nagihan PEPE

Danışman: Prof. Dr. Mustafa CANLI
İkinci Danışman: Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Tatlı su balıklarının ozmoregülasyon sistemi suyun tuzluluğuna oldukça duyarlıdır. Tuzluluğu artan sularda nanopartikül etkisinde kalan Nil çuprası *O. niloticus*'un dokularında nanopartikül birikimi ve ozmoregülasyon sistemine özgün olan iyon ATPaz'ların (Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz, Ca-ATPaz) tepkileri hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, farklı tuzluluk (0 ve 10 ppt) derişimlerinde Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerinin farklı derişimleri (1 ve 10 mg/L) etkisinde akut (2 gün) ve kronik (20 gün) olarak maruz kalan balıkların kas ve solungaç dokularında alüminyum ve titanyum birikimleri ile solungaç ve bağırsak dokularında ATPaz'ların tepkileri incelenmiştir. Veriler nanopartiküllerin yüksek ve düşük tuz derişimlerinde dokularda birikmekle beraber ($p<0.05$), en yüksek birikimin solungaç dokusunda olduğunu göstermiştir. Tuzluluk artışı akut süreçlerde nanopartikül birikimini arttırırken, kronik süreçlerde azaltmıştır ($p<0.05$). Bağırsakta ATPaz aktivitelerinde hiçbir koşul altında anlamlı bir değişim görülmezken ($p>0.05$), solungaçta ATP aktivitelerinde anlamlı değişimler görülmüştür ($p<0.05$). Solungaç dokusunda, yüksek tuzluluk derişiminde kontrol balıklarının ATPaz aktivitelerinde anlamlı ($p<0.05$) azalmalar olmuştur. Benzer şekilde, tuz+nanopartikül etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktiviteleri tuz kontrolü aktivitesine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer yandan, tuz+nanopartikül etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktiviteleri tek başına nanopartikül etkisinde kalan balıklardaki aktivitelere göre daha düşük ($p<0.05$) olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tatlısu balığı, Nanopartikül, Tuzluluk, ATPaz, Ozmoregülasyon

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Investigation on the Osmoregulation System of Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Titanium and Aluminum Nanoparticles in Water With Increased Salinity

Nagihan PEPE

Advisor: Prof. Dr. Mustafa CANLI
Co-Advisor: Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI

Department of Biology

ABSTRACT

The osmoregulation system of freshwater fish is very sensitive to salinity increase in water. There is not enough data on the accumulation of nanoparticles in tissues of the Nile tilapia *O. niloticus* exposed to nanoparticles in increased salinities, and the responses of ion ATPases (Na,K-ATPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase) belonging to the osmoregulation system. In this study, the accumulation of aluminium and titanium in muscle and gill tissues and, also the responses of ATPases in the gill were investigated following exposures to different concentrations (1 and 10 mg/L) of Al_2O_3 and TiO_2 nanoparticles in acute (2 days) and chronic (30 days) durations. The data showed that although nanoparticles accumulated in all tissues at both salinities ($p<0.05$), the highest accumulation occurred in gill tissues. Although the increase in salinity increased the accumulation of nanoparticles in acute duration, it decreased in chronic duration ($p<0.05$). Although there was no significant alteration ($p>0.05$) in the activity of ATPases in the intestine, there were significant changes ($p<0.05$) in ATPase activities in the gill. There were significant ($p<0.05$) decreases in gill ATPase activities of control fish at high salinity. Similarly, salt+nanoparticle exposures caused significant decreases in gill ATPase activities compared to salt control. Similarly, significant decreases in gill ATPase activities were observed in salt+nanoparticle exposure compared to nanoparticle exposure alone.

Keywords: Freshwater fish, Nanoparticle, Salinity, ATPase, Osmoregulation

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yazımı ve yürütülmesi aşamasındaki katkılarıyla birlikte, bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa CANLI'ya en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim. İkinci tez danışmanım Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI'ya laboratuvar çalışmalarım ve enzimlerin aktivite ölçümleri esnasında vermiş olduğu desteklerden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Ahmet BAYKÖSE'ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Diğer yandan, Biyoloji Bölümü yöneticileri başta olmak üzere, Fen Bilimleri Enstitüsü ve Bilimsel Araştırmalar Birimi çalışanlarına da tezim ve projem sırasındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Benden desteğini esirgemeyen ve güven veren sevgili eşim Barış PEPE'ye ve bu süreci hep destekleyen babam İhsan KOYUNCU'ya en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneyler sırasında sularda yapılan ölçümlerde elde edilen fiziksel ve kimyasal veriler. (Akut ve kronik deneylerde ölçülen parametrelerde istatistiki olarak önemli farklar olmadığından ($p>0.05$) ortalama değerler ± standart hatalar tabloda verilmiştir). 15

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri (Atlı, 2009). 16

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Na,K-ATPaz enziminin çalışması ile ilgili şematik görünüm 5

Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki. 17

Şekil 3.2. Sığır albümini ile hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki. 19

Şekil 3.3. $Al_2O_{3\,(A)}$ ve TiO_2 (B) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri. 21

Şekil 4.1. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. * normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir. 24

Şekil 4.2. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur..... 24

Şekil 4.3. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. * normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları, # tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,..... 25

Şekil 4.4. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında toplam protein derişimi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur..... 26

Şekil 4.5. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur. 27

Şekil 4.6. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur..... 27

Şekil 4.7. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur..... 28

Şekil 4.8. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6

balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 28
Şekil 4.9. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. 29
Şekil 4.10. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. 30
Şekil 4.11. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. 31
Şekil 4.12. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 32
Şekil 4.13. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 33
Şekil 4.14. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 33
Şekil 4.15. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 34
Şekil 4.16. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı (p>0.05) fark yoktur. 34
Şekil 4.17. Akut ve kronik süreçlerde tuz ve nanopartikül etkisinde kalan balıkların kas dokularında Al ve Ti birikimi. 36
Şekil 4.18. Akut ve kronik süreçlerde tuz ve nanopartikül etkisinde kalan balıkların solungaç dokularında Al ve Ti birikimi. 37

1. GİRİŞ

Sucul ekosistemler hem doğal hem de insan aktivitelerinden kaynaklı, sürekli bir şekilde kirleticilere maruz kalmaktadır. Sucul ekosistemlerin doğal yoldan etkisinde kaldığı kirleticiler, yanardağ patlamaları, orman yangınları, toz fırtınaları, rüzgarlar, seller ve depremler sonucu oluşabilmektedir. İnsan aktivitelerinden kaynaklı kirleticiler de, evsel atık sularla sucul ekosisteme giriş yapan; ilaçlar, antibiyotikler, kozmetik ürünleri ve gıda katkı maddeleri, yağmur suları ve atmosferden sucul ekosisteme giriş yapan; pestisitler, egzoz ve sigara dumanı ve bunların yanı sıra endüstriyel kaynaklı kimyasal madde kalıntıları ve metaller sayılabilir. Özetle kirleticilerin nihai varış noktası Dünya'nın 2/3ünü kaplayan sucul ekosistemlerdir.

Her ne kadar sucul ekosistemlere birçok çeşitte kirletici girdisi bulunsa da metaller bu kirletici grupları içerisinde çok büyük bir yer kaplamaktadır. Metal girdilerinin çoğunluğunun kaynağı endüstriyel kuruluşlardır. Bu kuruluşlar, yaptıkları üretimin çeşidine ve işlem süreçlerine göre sucul ekosisteme, kadmiyum, bakır, çinko, alüminyum, nikel, kurşun, cıva, gümüş, krom, arsenik ve kobalt gibi metalleri deşarj ederler. Normal şartlarda metaller, suda, düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Canlılar maruz kaldıkları metallerin zararlı etkisini depolama ve detoksifikasyon mekanizmaları ile önleyebilirler. Ancak metal konsantrasyonları, yükseldiğinde, canlının metabolizma faaliyetlerini etkileyerek toksik etki gösterebilir (Atlı ve ark., 2006, Atlı ve Canlı, 2007, Öner ve ark., 2008, Eroğlu ve ark., 2015). Canlının metale, akut ya da kronik maruz kalmasına bağlı olarak, letal ya da subletal toksik etki gözlenebilir (Heath, 1987, Atlı ve Canlı, 2011). Ayrıca metaller canlı dokusunda birikebilir (Canlı ve ark., 1998, Kalay ve ark., 1999, Canlı ve ark., 2001, Karayakar ve ark., 2022a). Dokulardaki metal birikiminin, metallerin sudaki derişimleri, maruz kalma süresi, sıcaklık, tuzluluk, sertlik, iletkenlik ve pH gibi parametrelerden ve canlının, boyutu ve cinsiyeti gibi özelliklerinden etkilendiği laboratuvar ve saha çalışmaları ile kanıtlanmıştır (Canlı ve Atlı, 2003, Baykan ve ark., 2007, Baysoy ve ark., 2012, Kulaç ve ark., 2013, Sağlam ve ark., 2013, Doğan ve ark., 2014, Canlı ve Canlı, 2015, Karayakar ve ark., 2022b).

1.1. Tuzluluk

Sudaki tuz içeriğinin bir ölçüsü olan tuzluluk, balıklar ve çevreleri üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Yüksek tuzluluk seviyeleri balıklar için stresli olabilir ve davranış, büyüme ve hayatta kalmada değişikliklere yol açabilir. Ek olarak, yüksek tuzluluk, belirli balık türlerinin dağılımında ve bolluğunda değişikliklere neden olabilir. Örneğin, bazı türler yüksek tuzluluğa daha toleranslı olabilir ve acı su ortamlarında hayatta kalabilirken, diğerleri daha hassas olabilir ve yalnızca tatlı suda bulunabilir (Smyth ve Elliott, 2016). Ancak, balıklar için sorun teşkil edebilecek tek şey yüksek tuzluluk seviyeleri değildir. Düşük tuzluluk veya tatlı su ortamları, özellikle tuzlu su ortamlarına uyum sağlamış olanlar olmak üzere belirli türler için zorlayıcı olabilir. Bu türler, düşük tuzluluktaki ortamlarda elektrolit dengelerini ve ozmotik basınçlarını düzenlemede zorluk yaşayabilir. Sonuç

olarak, tuzluluktaki değişikliklerin popülasyonları üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirirken balık türlerinin doğal tuzluluk aralıklarını ve tolerans düzeylerini dikkate almak önemlidir (Kaushal ve ark., 2021). Balıklar üzerindeki doğrudan etkilerine ek olarak, tuzluluğun genel su ekosistemi üzerindeki etkileri yoluyla balıklar üzerinde dolaylı etkileri de olabilir. Örneğin, tuzluluktaki değişiklikler, planktonun dağılımını ve bolluğunu değiştirebilir ve bu da balıklar için besin mevcudiyetini etkileyebilir. Tuzluluk, kirleticilerin sudaki çözünürlüğünü ve toksisitesini de etkileyerek balıkların sağlığını potansiyel olarak etkileyebilir. Bu nedenle, su ekosistemlerinin genel sağlığını ve sürdürülebilirliğini değerlendirirken tuzluluğun birden fazla düzeydeki potansiyel etkilerini dikkate almak önemlidir (Vaz ve ark., 2015, Ersoy ve ark., 2022).

Tuzluluk, balık sağlığını ve hayatta kalmasını etkileyebilecek tek faktör değildir. Su kirliliği, özellikle metal kirliliği de balık popülasyonları üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilir. Kurşun, cıva ve kadmiyum gibi ağır metaller balıkların dokularında birikebilir ve büyüme ve üreme başarısının azalması, davranış değişikliği ve ölüm oranının artması gibi bir dizi olumsuz etkiye neden olabilir. Balıklar üzerindeki doğrudan etkilerine ek olarak, metal kirliliğinin besin ağı ve genel su kalitesi üzerindeki etkileri yoluyla su ekosistemleri üzerinde dolaylı etkileri de olabilir (Elbeshti ve ark., 2018).

Tuzluluk ve metal kirliliği arasındaki ilişki, metal toksisitesinin suda yaşayan organizmalarda tuzluluk tarafından değiştirilebileceğini gösteren bazı çalışmalarla karmaşık olabilir. Örneğin, yüksek mineral konsantrasyonunun bağlanma yerleri için metallerle rekabet edebildiği sert sularda metaller daha az toksik etkiye sahip olabilir. Bununla birlikte, metalin türü ve çözünürlüğü, suyun pH'ı, metali absorbe edebilen ligandların konsantrasyonu, mineral bileşenlerin oksidasyon durumu ve metal iyonları için bağlanma yerleri gibi diğer faktörler de metallerin sudaki toksisitesine etki edebilir (Riba ve ark., 2004).

Hem metal nanopartikülleri hem de ağır metaller dahil olmak üzere tuzluluk ve su kirliliği arasındaki ilişki karmaşık olabilir. Benzer şekilde, nanopartiküllerin balıklar üzerindeki etkileri, nanopartikülün türü ve konsantrasyonunun yanı sıra suyun pH'ı ve sıcaklığı gibi diğer faktörlere bağlı olabilir (Khan ve ark, 2019). Genel olarak, tuzluluğun, nanopartiküllerin ve de ağır metallerin, balıklar ve su ekosistemleri üzerindeki potansiyel etkilerini dikkate almak önemlidir. Bu faktörler arasındaki karmaşık etkileşimleri anlamak, bu önemli kaynakları korumak ve muhafaza etmek için etkili yönetim ve koruma stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Araştırmacıların ve politika yapıcıların bu faktörlerin balık ekosistemler üzerindeki potansiyel etkilerini dikkatli bir şekilde değerlendirmesi ve olumsuz etkileri en aza indirmek için kamu ve yerel yönetimlerin nanopartiküller ve metal emisyonlarının izlenmesi ve düzenlenmesi ve su kaynaklarının kirlenmesini önlemek için uygun atık yönetiminin uygulanması gibi uygun önlemleri alması önemlidir.

1.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller, ölçüleri nanometre (1-100 nm) ölçeğinde olan parçacıklardır. Nanopartiküller, küçük boyutları nedeniyle özel özelliklere sahiptirler ve bu özellikler sayesinde birçok alanda kullanılmaktadırlar. Çeşitli malzemelerden üretilebilirler ve metal, polimer, seramik veya bir karışım olabilirler. Nanopartiküllerin özellikleri, üretim yöntemlerine ve kullanılan malzemelere göre değişebilir (Canlı ve Canlı, 2019). Küçük boyutları nedeniyle, standart parçacıklardan daha fazla yüzey alanına sahiptirler. Yüksek yüzey alanı, nanopartiküllerin reaktif olmalarına neden olur ve bu özellikleri sayesinde nanopartiküller birçok alanda kullanılır. Örneğin, farmasötik endüstrisinde nanopartiküller, ilaçların vücutta daha etkili bir şekilde kullanılmasını sağlar. Nanopartiküller, ayrıca, enerji üretiminde, elektronik cihazların üretiminde, katkı maddesi olarak gıda ve kozmetik üretiminde ve birçok diğer alanda kullanılır).

Nanopartiküllerin kullanımının yaygınlaşması ile birlikte, etkileri üzerine yapılan araştırmalar da artmıştır. İnsan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır ancak sonuçlar kesin olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalar, nanopartiküllerin insan vücuduna girdiğinde toksik etkiler oluşturabileceğini ve çevreye zarar verebileceğini göstermiştir (Ray ve ark., 2009). Ancak diğer çalışmalar ise nanopartiküllerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Örneğin, tümörleri yok etmede etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, nanopartiküllerin etkileri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Zolnik ve ark., 2010). Ayrıca nanopartiküllerin etkileri üzerine yapılan çalışmalar, bu parçacıkların çeşitli canlı türlerine zarar verebileceğini göstermiştir. Özellikle, balıklarda yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin balıkların sağlığı üzerinde olumsuz etkilerini ortaya koymuştur. Örneğin, balıklarda oksidatif stres, DNA hasarı ve histopatolojik değişiklikler gibi olumsuz etkilerinin olabileceğini belirtilmiştir (Canlı ve ark., 2018, Canlı ve Canlı, 2020a, b, Canlı ve Canlı, 2021, Pepe ve ark., 2022). Bu nedenle, nanopartiküllerin kullanımı ile ilgili olarak, balıklar üzerinde olası etkilerinin araştırılması ve dikkatli bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Bu sayede, atık yönetiminde alınacak önlemler ile balıkların sağlığının korunması ve çevre üzerindeki etkilerinin minimize edilmesi mümkün olabilir. Bu araştırmalar sayesinde, nanopartiküllerin potansiyel etkilerinin belirlenmesi ve kontrol altına alınması mümkün olabilir.

1.3. Ozmoregülasyon Sistemi

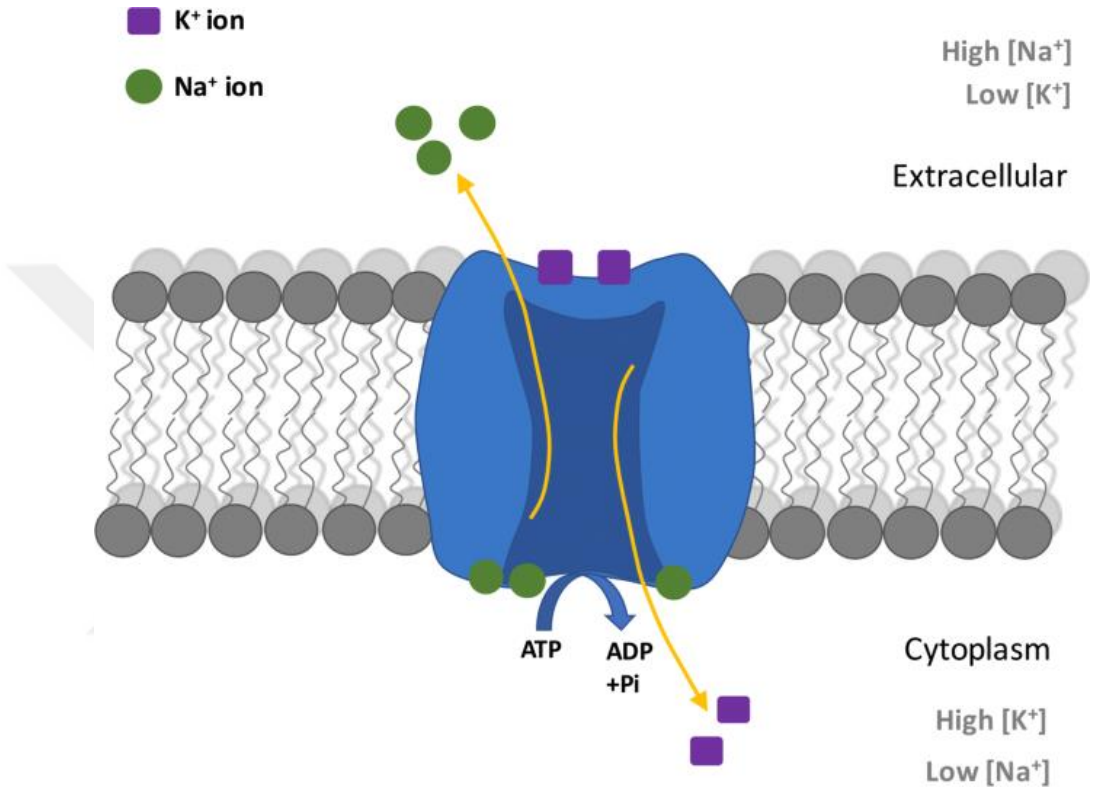
Balıklar, çeşitli tuzluluk seviyelerinde hayatta kalmaya adapte olmuş çeşitli bir omurgalı grubudur. Bazı balık türleri örihalindir, yani çok çeşitli tuzluluk seviyelerini tolere edebilirler, diğerleri ise stenohalindir ve yalnızca dar tuzluluk aralıklarında hayatta kalabilirler. Balıkların farklı tuzluluk seviyelerinde hayatta kalma yeteneği, tuzluluk toleransı olarak bilinir. Bir balığın tuzluluk toleransını etkileyebilecek faktörler arasında büyüklüğü, yaşı ve fizyolojik özellikleri yer alır.
Vücuttaki su ve elektrolit dengesini koruma süreci ozmoregülasyon olarak bilinir. Bu, çözünmüş maddelerin konsantrasyonunun önemli ölçüde değişebileceği su ortamında yaşadıkları için balıklar

için özellikle önemlidir. Ozmoregülasyon, su alımının düzenlenmesini ve fazla su ve elektrolitlerin atılmasını içerir. Balıklarda ozmoregülasyon, ozmoreseptör adı verilen özelleşmiş hücrelerin üretimi ve solungaçlar ve böbrekler gibi özelleşmiş organların kullanımı gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla sağlanır.

Ozmoregülasyon sistemi, homeostazi ile sıvı dengesini ve elektrolit konsantrasyonunu canlı için uygun olan seviyelerde tutar, yani organizmanın vücut sıvılarının ozmotik basıncını düzenler. Na+/K+-ATPaz gibi zara bağlı enzimler, iyonların biyolojik zarlardan taşınması nedeniyle hücre hacmini, ozmotik basıncı ve zar geçirgenliğini düzenler (Canlı ve ark. 2016). Ağır metallerin ATPazlar gibi ozmoregülatör enzimler üzerindeki inhibitör etkileri, suda yaşayan organizmalarda yararlı belirteçler olarak kullanılabilir (Blanchard ve Grosell, 2006). Ağır metaller, metal tipine, maruziyet konsantrasyonuna, balığın biyolojisine ve suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak ozmoregülasyon enzimlerinin aktivitelerinde değişiklik gösterir (Heath, 1995). Sucul organizmalarda metal birikiminin belirlenmesi, organizmada meydana gelen yapısal ve fonksiyonel bozuklukların tahmin edilmesi yanında metallere duyarlılığı yüksek olan türlerin tahmin edilmesi açısından önemlidir (Wood ve ark., 2012a; b; Pepe ve ark. 2022). ATPaz grubu enzimlerin, metal iyonları ve nanopartiküller dahil olmak üzere çevresel kirleticilere karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir (Canlı ve Stagg, 1996; Jang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2015; Mansouri ve ark., 2016; Canlı ve Canlı, 2019).

ATPaz'lar (adenozin trifosfatazlar), ADP (adenozin difosfat) üretmek için hücrelerde enerji depolayan bir molekül olan ATP'yi (adenozin trifosfat) hidrolize eden bir enzim grubudur. ATPaz'lar çok çeşitli organizmalarda bulunur ve proteinlerin sentezi, moleküllerin hücre zarlarından taşınması ve kasların kasılması dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde yer alır. Yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılan F-ATPaz'lar, V-ATPazlar ve P-ATPaz'lar dahil olmak üzere birkaç farklı ATPaz türü vardır. F-ATPazlar (F1F0-ATPazlar) ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde bulunur ve ATP sentezinden sorumludur. İki ana bölümden oluşur: ATPaz aktivitesini içeren bir zara bağlı F1 alanı ve bir proton kanalı olarak işlev gören zarla ilişkili bir F0 alanı. F-ATPaz'lar, alfa, beta ve gama alt birimleri dahil olmak üzere birkaç alt birimden oluşan karmaşık enzimlerdir. Alfa ve beta alt birimleri ATPaz aktivitesini içerirken, gama alt birimleri ATP sentezinin proton hareketine bağlanmasında rol oynar. F-ATPaz'lar, hücreler için birincil enerji kaynağı olan ATP'nin üretimi için önemlidir. V-ATPaz'lar (vakuolar ATPazlar), hücrelerin endomembran sisteminde bulunur ve hücre içi bölümlerin asitleştirilmesinde ve moleküllerin hücre zarları boyunca taşınmasında rol oynar. V-ATPaz'lar da iki ana bölümden oluşur: ATPaz aktivitesini içeren zara bağlı bir V(1) alanı ve bir proton kanalı olarak işlev gören zarla ilişkili bir V(0) alanıdır. V-ATPazlar, asit salgılayan hücreler (midedeki parietal hücreler gibi), hücre içi materyallerin parçalanması için lizozom gerektiren hücreler (beyaz kan hücreleri ve makrofajlar gibi) ve molekülleri plazma zarlarından taşıyan hücreler (renal tübül hücreleri gibi) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur (Nishi ve Forgac, 2002). P-ATPazlar (P-tipi ATPaz'lar) hücrelerin plazma zarında bulunur ve çeşitli iyonların ve küçük

moleküllerin zar boyunca taşınmasında rol oynar. P-ATPaz'lar, ATPaz aktivitesini içeren bir alfa alt birimi ve bir veya daha fazla düzenleyici beta alt birimi dahil olmak üzere birkaç alt birimden oluşan bütünleşik zar proteinleridir. P-ATPazlar, sodyum-potasyum ATPaz'lar (Na-K-ATPaz'lar), kalsiyum ATPaz'lar (Ca-ATPaz'lar) ve proton ATPaz'lar (H+-ATPaz'lar) dahil olmak üzere taşıdıkları iyonların türüne göre sınıflandırılır. P-ATPaz'lar, iyon dengesinin korunması ve çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesi için önemlidir (Lodish ve ark., 2003).



Şekil 1.1. Na,K-ATPaz enziminin çalışması ile ilgili şematik görünüm (Pivovarov ve ark. 2019).

Na-K-ATPaz'lar, sodyum iyonlarının (Na^+) hücrelerden ve potasyum iyonlarının (K^+) hücrelere aktif taşınmasından sorumlu olan P-tipi ATPaz'lardır. İyonların bu şekilde taşınması, nöronlarda ve kas hücrelerinde aksiyon potansiyellerinin oluşturulması, kan basıncının düzenlenmesi ve pH'ın kontrolü dahil olmak üzere birçok hücresel süreç için gerekli olan hücre içinde ve dışında uygun iyon dengesinin korunmasına yardımcı olur. Na-K-ATPaz'lar, kas hücreleri, sinir hücreleri ve epitel hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde bulunur. Na-K-ATPazların düzensizliği, hipertansiyon, diyabet ve kalp yetmezliği dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Na-K-ATPazlar, hücrelerin plazma zarında bulunan ve sodyum iyonlarının hücrelerden ve potasyum iyonlarının hücrelere aktif olarak taşınmasından sorumlu olan bütünleşik zar proteinleridir. İyonların bu şekilde taşınması, nöronlarda ve kas hücrelerinde aksiyon potansiyellerinin oluşturulması, kan basıncının düzenlenmesi ve pH'nın kontrolü dahil olmak üzere birçok hücresel süreç için gerekli olan hücre içinde ve dışında uygun iyon dengesinin korunmasına yardımcı olur. Na-K-ATPazlar üç alt

birimden oluşur: ATPaz aktivitesini içeren bir alfa alt birimi ve iki düzenleyici beta alt birimi. Alfa alt birimi, iyonların zar boyunca taşınmasından sorumludur ve ATP'nin hidrolizinden güç alır. Beta alt birimleri, alfa alt biriminin aktivitesini modüle etmeye yardımcı olur ve ayrıca hormonlar ve ilaçlar gibi çeşitli düzenleyici moleküllere bağlanabilir. Na-K-ATPazlar, kas hücreleri, sinir hücreleri ve epitel hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde bulunur. Kas hücrelerinde, Na-K-ATPazlar kasların kasılması ve gevşemesi için önemlidir. Sinir hücrelerinde Na-K-ATPazlar, aksiyon potansiyellerinin üretilmesi ve yayılması için önemlidir. Epitel hücrelerinde Na-K-ATPazlar, çeşitli organ ve dokularda uygun elektrolit dengesinin ve hidrasyonun korunmasına yardımcı olan epitel tabakası boyunca iyonların ve suyun taşınmasında rol oynar (Glynn ve Karlish, 1975).

Diğer ATPaz'lar arasında H+-ATPaz'lar (proton ATPazlar), Mg-ATPaz'lar (magnezyum ATPaz'lar) ve Ca-ATPaz'lar (kalsiyum ATPaz'lar) sayılabilir. H+-ATPazlar protonların (H^+) hücre zarları boyunca aktif taşınmasından sorumlu olan P-tipi ATPaz'lardır. H+-ATPaz'lar, asit salgılayan hücreler (midedeki parietal hücreler gibi), hücre içi materyallerin bozulması için lizozom gerektiren hücreler (beyaz kan hücreleri ve makrofajlar gibi) ve bunları taşıyan hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur. Plazma zarları boyunca moleküller (renal tübül hücreleri gibi). H+-ATPazlar, hücre içi bölümlerin asitleştirilmesi ve moleküllerin hücre zarları boyunca taşınması için önemlidir. H+-ATPaz'ların düzensizliği, asitle ilişkili bozukluklar (asit reflü ve peptik ülserler gibi) ve böbrek hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. (Nishi ve Forgac, 2002). Mg-ATPaz'lar magnezyum iyonlarının (Mg^{2+}) hücre zarları boyunca taşınmasından sorumlu olan enzimlerdir. Mg-ATPazlar, böbrek, bağırsak ve pankreas hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur. Mg-ATPaz'lar, magnezyum homeostazının düzenlenmesi ve enzim aktivitesi, iyon taşınması ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerin modülasyonu için önemlidir. Mg-ATPaz'ların düzensizliği, diyabet, hipertansiyon ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. (Rude, 1993). Ca-ATPaz'lar hücre zarları boyunca kalsiyum iyonlarının (Ca^{2+}) aktif taşınmasından sorumlu olan P-tipi ATPaz'lardır. Ca-ATPaz'lar, kas hücreleri, sinir hücreleri ve endokrin hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur. Ca-ATPaz'lar, kalsiyum sinyalinin düzenlenmesinde ve kasların kasılmasında önemli roller oynar. Ca-ATPaz'ların düzensizliği, hipertansiyon, diyabet ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Cooper ve Dimri, 2021).

1.4. Tatlısu Çuprası (*Oreochromis niloticus)*

Tilapia türleri dünya üzerinde en çok kültürü yapılan balıklardan biridir (FAO, 2003). Kültür balıkçılığı ile Nil tilapyası üreten ülkelerin başında Çin gelmekte olup, dünya sıralamasında açık ara öndedir. 2003 yılı verilerine göre Çin'in yıllık üretimi yaklaşık 806.000 ton olarak belirlenmiştir. Bunu Mısır (yaklaşık 200.000 ton), Filipinler (111.000 ton), Tayland (97.000 ton) ve Endonezya (72.000 ton) takip etmektedir. *Oreochromis* türleri, üremelerinin nispeten kolay olması, hastalıklara karşı dirençli olması ve ciddi beslenme sorunları yaşamaması nedeniyle (Cioni ve ark., 1991; Kamal

ve Mair, 2005) toksikoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan balıklardır. Bu tez çalışmasının yürütüldüğü Biyoloji Bölümü Moleküler Ekotoksikoloji Laboratuvarında, *O. niloticus* türü balıklar ile yapılmış çok sayıda tez ve araştırma makalesi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları "Önceki Çalışmalar" bölümünde verilmiştir. Bu çalışmalarda da vurgulandığı gibi Nil tilapyası ile toksikoloji çalışmaları yapmanın birçok olumlu yönleri bulunmaktadır.

1.5. Amaç

Bilindiği gibi, metal oksit nanopartiküllerin kullanımı son yıllarda hızla artmaktadır. Diğer yandan, insanların farklı alanlarda tuz içeren maddelerin çevreye salınması sonucu, tatlı suların tuzluluğu da artmaktadır. Bu Yüksek Lisans Tez projesinin amacı tuzluluğu artan tatlı sularda metal oksit nanopartikülleri etkisinde kalan Nil tilapyalarının (*Oreochromis niloticus)* metabolizmasında oluşturduğu fizyolojik etkileri belirlemenin yanında, nanopartiküllerin dokularda birikimi de incelemektir. Bu amaç doğrultusunda balıklar farklı tuzluluk derişimlerinde (0 ve 10 ppt) Al_2O_3 (<50 nm) ve TiO_2 (<50 nm) nanopartiküllerinin etkilerine akut (2 gün, 10 ppm), ve kronik (20 gün, 1 ppm) olarak maruz bırakılmıştır. Daha sonra, balıklar dissekte edilerek solungaç, bağırsak ve kas dokuları alınmış ve metal birikimleri ve ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Balıklarda tuzluluk artışının nanopartikül toksisitesi üzerine olan etkileri ile ilgili çalışma yetersiz olduğundan, bu tez projesi ile nanopartikül ve/veya tuzluluğun tatlı su balıklarının ozmoregülasyon sistemi üzerine olan etkileri gösterilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gjevre ve Naess (1996), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) ve Atlantik somonunun *(Salmo salar L*inaeus, 1758) dokularındaki Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Araştırıcılar *Salmo salar*'ın Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin bağırsakta ve solungaca göre daha fazla düzeyde substrat gereksinimi olduğunu belirtmişlerdir. Ancak bağırsaktaki Na^+/K^+-ATPaz ile solungaçtaki ATPaz'ın benzer biyokimyasal özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir.

Nolan ve ark (1999), *Oreochromis mossambicus'*un tatlı sudan tuz farkı olan sular arası geçişindeki adaptasyon mekanizmasını bağırsak ve solungaç dokusunda incelemişlerdir. Tatlı sudan tuzlu suya geçen balıklarda solungaçta Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir düşme olmasına karşın, bağırsak dokusunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde anlamlı bir fark olmadığını göstermişlerdir.

Güner ve ark (2005), deniz suyuna transfer edilen tilapialarda (*O. niloticus)* tuz değişiminin solungaç Na^+/K^+- ATPaz aktivitesi üzerine olan etkileri yanında, klor hücrelerinin sayısı ve boyutları üzerine de etkilerini incelemişlerdir. Veriler, tam deniz suyunun balıkların tamamını öldürdüğünü, ancak belirli yüzdelerle deniz suyuna transfer edilen balıklarda klor hücre sayısının azaldığı ve hücre boyutlarında arttığını göstermiştir.

Saoud ve ark (2007), balıklarda plazma ozmolaritesi ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi üzerine tuzluluğun etkisini teleost balık olan *Siganus rivulatus*'da çalışmışlardır. Araştırmanın sonuçları *S. rivulatus*'un solungaçlarında Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin tuzluluk azalışı ile arttığını göstermiştir. Araştırıcılar solungaç dokusunun balıklarda ozmoregülasyon sistemi için çok önemli görevleri olduğunu vurgularken, bu dokunun çevresel bir faktör tarafından zarar görmesinin ozmoregülasyonu bozabileceğini belirtmişlerdir.

Kulaç ve ark (2012), tuzluluk artışının tatlı su balıklarına (*O. niloticus)* olan fizyolojik etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar balıkları farklı tuzluluk (0, 2, 4 ve 8 ppt) derişimlerindeki sularda 1 ppm kadmiyum ve bakır etkilerini farklı sürelerle (1, 3, 7 ve 14 gün) incelemişlerdir. Sonuçlar ATPaz aktivitelerinin tuzluluk, metal tipi, süreç ve dokuya bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Bunun yanında metal+tuzluluk etkisinde kalan balıklarda etki süresine bağlı olarak solungaç ve bağırsak Na^+/K^+- ATPaz aktivitesinde anlamlı farklar bulunmuştur. Tuzluluk artışına bağlı olarak ATPaz aktivitesinde bir artış olurken, tuzluluk+metal etkisinde aktivitede genel bir azalma olmuştur.

Baysoy ve ark (2013), farklı tuzluluk (0, 2 ve 8 ppt) düzeylerinde krom ve kurşun etkisinde 14 gün kadar sürelerle kalan tatlı su balıklarında (*Oreochromis niloticus*) ATPaz aktivitelerinin değişimini incelemişlerdir. Sonuçlar sadece tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin artma yönünde bir eğilim gösterdiğini, ancak tuz+metal karşımı ortamlarında ise enzim aktivitesinde anlamlı azalmalar olduğunu göstermiştir. Sonuçlar ayrıca solungaç ATPaz aktivitelerinin bağırsak ATPaz aktivitelerine göre daha fazla değiştiğini de vurgulamıştır.

Joo ve ark (2013), jüvenil gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) 14 gün süresince düşük (0.4 ppt), orta (6 ± 0.3 ppt) ve yüksek (12 ± 0.2 ppt) tuzluluk değerlerindeki sularda farklı Ag-

NP(gümüş-nanopartikül) derişimlerinin etkisine bırakmışlardır.. Sonuçlar incelenen dokularda Ag biyobirikiminin karaciğer> böbrekler ≈ solungaçlar> beyaz kaslar şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir. Dokuların gümüş düzeyleri yüksek tuzluluk değerine sahip sularda daha fazla olduğunu bulmuşlar, ayrıca, düşük, orta ve yüksek tuzlulukta Ag-NP'lere maruz kalan tüm balıklarda hepatosomatik indeks konsantrasyona bağlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir.

Villarreal ve ark (2014) Mozambik tilapyası (*O. mossambicus*) ile yaptıkları bir çalışmada CuO nanopartiküllerinin (0.5 ve 5 mg/L) tatlısu ve tuzluluğu artmış sulardaki etkileriniincelemişlerdir. Sonuçlar tuzluluğu artan sularda 5 ppm CuO etkisine bırakılan balıklarda solungaç kapağı hareketlerinde artış olduğunu, ancak tatlısu ortamında kalan balıklarda bu etkinin çok daha az olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, CuO nanopartiküllerinin hem tuzlu ortamda hem de tatlısu ortamında balıkların antioksidan sistemi üzerine de etkileri olduğunu göstermiştir. Araştırıcılar tuzluluğun tatlısu çalışmalarında ve ekolojik değerlendirmelerde dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Wang ve Wang (2014) Ag nanopartiküllerinin çökelme kinetiklerini ve surfaktanların (Tween 20) biyoalınımına etkisini deniz balığı (*Oryzias melastigma*) ile çalışmışlardır. Deneyin sonuçları Tween 20'nin hızlı bir şekilde Ag nanopartiküllerinin çökelmesini azalttığını gösterirken, 30 ppt deniz suyunda bile bu etkisini sürdürdüğünü belirtmişlerdir. Ag nanopartiküllerinin alınım hız sabitleri düşük tuzluluklarda iyonik Ag'ün yarısı kadar olmasına karşın, yüksek tuzluluklarda (15 ppt ve 30 ppt) daha az biyoalınım olduğu da belirtilmiştir. Araştırıcılar metal oksit nanopartiküllerinin sudan alınımı üzerine yeterli araştırma olmadığını ve bu konunun daha fazla çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini de vurgulamışlardır.

Joo ve ark (2018), jüvenil gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) 14 gün süresince düşük (0.4 ppt), orta (6 ± 0.3 ppt) ve yüksek (12 ± 0.2 ppt) tuzluluk değerlerindeki sularda farklı Ag-NP derişimlerinin etkisine bırakmışlardır. Sonuçlar tuzlululuk değişiminin NP derişimine bağlı olarak kan hücrelerinin sayısında anlamlı değişimlere neden olduğunu göstermiştir. Özellikle kan plazma iyonlarının düzeylerinin yüksek Ag-NP derişimlerinde arttığını belirtmişlerdir. Tuz ve NP etkilerinde solungaç dokusunun histolojik yapısında da çeşitli anomaliler olduğunu tespit etmişlerdir. Genel olarak, daha düşük Ag-NP derişiminde düşük tuzlulukta balıkların daha fazla etkilenme gösterdiğini vurgulamışlardır.

Dogan ve Canli (2019) tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'u akut (0,3 µM 3 gün) ve kronik (0,03 µM 30 gün) süreçlerde ve farklı tuzluluklarda (0, 1, 10 ppt) Hg^{2+}'ya maruz bırakıldıktan sonra balıkların solungaçlarında Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{2+}-ATPaz ve Ca^{2+}-ATPaz ve Ca^{2+}-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sonuçlar hem akut hem de kronik etkilenmede tek başına tuzluluk artışının solungaç ve kastaki ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte hem akut hem de kronik süreçlerde farklı tuzluluklarda Hg^{2+}'ya maruz kalan balıkların solungaç ve kas dokularında ATPaz aktivitelerinde artışlar olmuştur. Genel olarak, kronik süreçlerin balık fizyolojisini akut süreçlerden daha fazla etkilediğini belirtmişlerdir.

Banan ve ark (2020) İran mersin balığında (*Acipenser persicus*) tuzluluğun gümüş nanopartiküllerinin akut ve subkronik toksisitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Üç tuzluluk düzeylerinde (0.4-12 ppt) gümüş-NP etkisinde kalan balıklarda plazma kortizol, glikoz, potasyum ve sodyum seviyelerinin tuzluluk değişimi ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Ancak çalışmanın verileri artan tuzlulukta Ag-NP'lere maruz kalan balıklarda ozmolalite, klorür, sodyum ve potasyum plazma düzeylerini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Bununla beraber doku lezyonlarının bulunma sıklığının Ag-NP konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını da tespit etmişlerdir.

Pérez-López ve ark (2020) tuzluluk artışının (0 ve 15 ppt) $ZnCl_2$ ve ZnO nanopartikülünün akut etkisini balıklarda (*Gambusia sexradiata*) incelemişlerdir. Çalışmalar deney koşullarının balık ölümlerine neden olmamakla birlikte, tuzluluk artışının çinkonun toksik etkisini azalttığını ancak çinko derişimindeki artışın etkiyi arttırdığını göstermiştir. İyonik çinko için ortalama öldürücü (0 ve 15 ppt tuzluluk için) konsantrasyonlar (LC50–96 saat) sırasıyla 25.3 ve 178 mg Zn/L olarak hesaplanmıştır.

Canli (2021), *O. niloticus* ile yaptığı bir çalışmada tuzluluğu artan (10 ppt) tatlı sularda Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartikülleri (1 mg/L) etkisinde kalan balıkların antioksidan sisteminin verdiği tepkileri incelemiştir. Veriler CAT ve SOD aktivitelerinin akut süreçte önemli ölçüde değişmediğini, ancak kronik süreçte yüksek ve düşük tuzlulukta önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Benzer şekilde, GPX ve GR aktiviteleri de kronik süreçte anlamlı olarak ölçüde azalmıştır. Çalışmanın verileri akut ve kronik etkilenmenin farkını ortaya koyarken aynı zamanda tuzluluğun da nanopartikül etkisinde önemli olabileceğini vurgulamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Nanopartiküller

Nanopartikül: Al_2O_3 (~40 nm), TiO_2 (~21 nm) (Sigma)

ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Sukroz (α-D-Glukopiranozil β-D-fruktofuranosid; $C_{12}H_{22}O_{11}$ 99,5%, Sigma)

Trizma –Base (Tris [hidroksimetil]aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma)

EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)

EGTA [Etilen glikol-bis (2-aminoetil eter)-N,N,N¢,N¢-tetra asetikasit, Sigma]

Sodyum klorür (NaCl, Merck)

Potasyum klorür (KCl, Merck)

Kalsiyum klorür ($CaCl_2$, Merck)

Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$, Merck)

Disodyum Adenozin trifosfat (Na_2ATP 99%, Sigma)

Decaethylene glycol monododecyl eter (Sigma)

Amonyum Molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck)

Sülfirik asit (H_2SO_4 %98, Merck)

Ouabain ($C_{29}H_{44}O_{12}$, Sigma)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4, Merck)

Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Merck)

Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)

Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$, Merck)

Bakır (II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)

Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)

Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

Spektrofotometre (Schimadzu UV-1800)

Jeol JEM-1100 TEM cihazı

Derin dondurucu (- 85 ºC) (Esco UUS-480A)

Hassas Terazi (Sartorius Analytic ATL-224-I)

Santrifüj (Hettich Mikro 220 R)

Homojenizatör (Janke & Kunkel Ultra Turrax T25)

Su Banyosu (Wise Bath WSB-30=

pH metre (Hana HI 8314 membran pH metre)

Manyetik Karıştırıcı (Janke & Kunkel IKAMAG RH)

Karıştırıcı (Vortex S0 200)

Ultrasonikatör (Bandelin HD2200)

Otomatik mikro pipet(Çeşitli hacimlerde Gilson ve Eppendorf pipetler)

Çeşitli ebatlarda cam tüpler

Distile su cihazı (Şimşek Laborteknik SS-200)

3.2. Metot

Deney hayvanı olarak tatlısu çuprası (*Oreochromis niloticus*) kullanılmıştır. Bu balıklar yaklaşık 30 yıldır Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlısu Araştırma İstasyonu balık yetiştirme havuzlarında kültür koşullarında üretilmektedir. Üretim havuzlarından alınan balıklar 20±1 ^{o}C sıcaklığı bulunan ve 12 saat aydınlatılan deney laboratuvarına uygun şartlarda taşınarak çeşme suyu (dinlendirilmiş) ile dolu olan cam akvaryumlara (40 x 40 x 100 cm, 100 L) konulmuştur. Balıkların yaklaşık 1 ay süre ile bu laboratuvar şartlarına alışmaları (adaptasyon süreci) için beklenmiştir. Hem adaptasyon sürecinde hem de deneyler esnasında akvaryumlardaki suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri ölçülmüş ve bu ölçümlere ait ortalama değerler ve standart hata değerleri çizelge 3.1'de verilmiştir. Balıkların besin almalarını sağlamak üzere günde bir defa (ağırlıklarının % 2-3'ü kadar) ticari balık yemi (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) ile beslenmeleri sağlanmıştır. Bu yemdeki mikro elementlerin miktarları 25 mg Mn/kg, 25 mg Mg/kg, 70 mg Zn/kg, 0.7 mg I/kg, 2 mg Fe/kg, 1 mg Cu/kg, 0.03 mg Se/kg, 0.2 mg Co/kg, makro elementlerin miktarları ise yaklaşık % 2 kalsiyum, % 0.2 sodyum, % 1 fosfat olup % 40 protein içermektedir. Hem adaptasyon sürecinde hem de deneyler esnasında akvaryum suları 2 günde bir olmak üzere çeşme suyu ile yenilenmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyler sırasında sularda yapılan ölçümlerde elde edilen fiziksel ve kimyasal veriler. (Akut ve kronik deneylerde ölçülen parametrelerde istatistiki olarak önemli farklar olmadığından ($p>0.05$) ortalama değerler ± standart hatalar tabloda verilmiştir).

	DENEY KOŞULLARI			
	0 ppt NaCl	10 ppt NaCl	0 ppt NaCl +NPs	10 ppt NaCl +NPs
Tuzluluk	0.20±0.09	10,6±0.14	0.33±0.22	10.9±0.84
Su sıcaklığı ºC	22.8±0.5	23.0±1.3	22.3±0.9	22.6±1.1
pH	7.60±0.91	7.72±0.20	7.68±0.31	7.80±0.43
Oksijen (mg O_2/L)	6.12±0.14	6,95±0.81	6,17±0.77	6.36±0.21
Toplam sertlik (mg Ca_2CO_3/L)	306±20.5	316±18.7	310±11.6	325±30.3
Alkalinite (mg Ca_2CO_3/L)	204 ± 11.7	220±12.2	198±10.1	217±8.87

Akut deneylerde balıklar 6 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda farklı tuzluluk (NaCl) derişimlerinde (0 ve 10 ppt) alüminyum (Al_2O_3) ve titanyum (TiO_2) nanopartiküllerinin 10 mg/L derişimlerinin etkisine 48 saat (2 gün) süreyle, kronik deneylerde ise balıklar (6 adet) aynı tuzluluk derişimlerinde (0 ve 10 ppt) Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerinin 1 mg/L derişimlerinin etkisine 20 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki nanopartikül derişimleri değişeceğinden akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirilmiştir. Su değişimleri ve ortam yenilenmesi balıkların beslenmesinden 1 saat kadar önce yapılmıştır.

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Akut ve kronik süreçler sonunda akvaryumdan alınan balıklar spinal yapılarak öldürülmüştür. Su ile yıkanan balıklar kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra bir analitik terazi ve dijital kumpas ile balıkların ağırlıkları (gram) ve boyları (cm) ölçülmüştür. Balıklar deney ortamına rastgele konduğundan deney grupları arasında ortalama boy (10.44±0.20 cm) ve ağırlık bakımından (17.18±1.39 g) istatistiksel bir fark ($p>0.05$) olmadığı tespit edilmiştir. Balıkların solungaç, bağırsak ve kas dokuları steril diseksiyon aletleri kullanılarak alınmış ve homojenize edilinceye kadar -80 ^{0}C'de saklanmıştır. ATPaz aktivite ölçümleri için tampon çözeltisi (250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base, 1 mM EDTA (pH 7.8) hazırlanmış ve dokular bu tamponda (1/10, w/v) 9500 rpm'de buz üstünde homojenize edilmiştir. Homojenatlar eppendorf tüplerine aktarılarak 13.000 g'de 20 dk süre

ile santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar dikkatli bir şekilde alınarak ATPaz aktivite ölçümlerinde kullanılmak üzere temiz Eppendorf tüplerine alınmıştır.

3.2.2. ATPaz Aktivitelerinin Ölçümü

Tilapia'da ATPaz karakterizasyonu daha önce laboratuvarımızda yapıldığından(Atlı, 2009) tekrar yapılmamış olup, çizelge 3.2'de verilen optimum değerlere göre ATPaz ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri (Atlı, 2009).

	Total-ATPaz (- Ouabain)	Mg^{+2}-ATPaz (+ Ouabain)	Ca^{+2}-ATPaz
Ouabain (mM)	-	1	-
NaCl (mM)	100	100	-
KCl (mM)	20	20	-
$MgCl_2$ (mM)	4	4	4
$CaCl_2$ (mM)	-	-	1
EGTA (mM)	-	-	1
Trizma-Base (mM)	40	40	40
ATP (mM)	3	3	3
pH	7.7	7.7	7.7
^oC	37	37-40	37

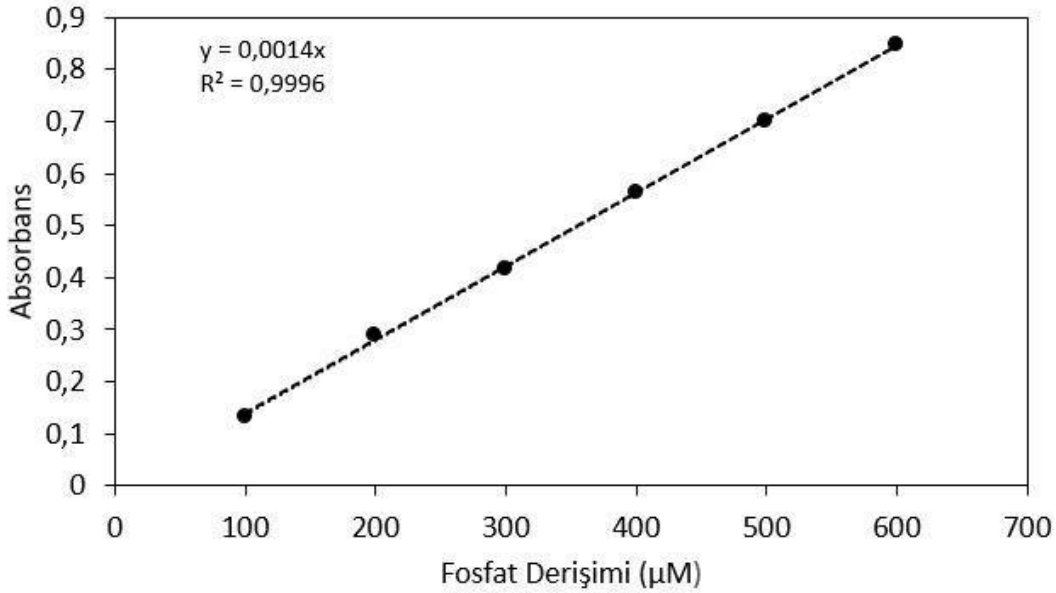
ATPaz ölçümleri iki tekrarlı olarak yapılmış olup, ortalamaları veri olarak kullanılmıştır. Deney tüplerine son iyon derişimleri yukarıdaki çizelgede gösterildiği üzere 870 µL inkübasyon ortamının üzerine 30 µL örnek konularak sıcak su banyosunda 37 ^{0}C'de 5 dk bekletilerek inkübasyonları sağlanmıştır. Daha sonra tüplerin üzerine 100 µL 3 mM Na_2ATP eklenerek reaksiyon başlatılmış ve tüpler iyice vortekslenerek çalkalamalı sıcak su banyosunda 30 dk süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için tüplere buz üzerinde bekletilmiş 500 µL soğuk saf su eklenmiştir. Deneylerde farklı körler kullanılarak gerçek ATPaz aktivitelerinin hesaplamaları yapılmıştır. ATP köründe örnek eklenmezken, örnek köründe ATP eklenmemiştir. Ouabain içermeyen ATPaz aktivitesi toplam ATPaz aktivitesi olarak hesaplanırken, ouabain içeren tüplerdeki aktivite ise Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ise toplam ATPaz aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin çıkarılması sonucu elde edilmiştir. Diğer yandan Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin belirlenmesinde iki farklı inkübasyon ortamının ($CaCl_2$içeren ve içermeyen) farkı alınarak elde edilen değer Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Bütün ATPaz aktiviteleri µmol Pi/mg prot./sa. olarak verilmiştir.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

ATPaz aktivitesinin ölçümünde Atkinson ve ark., (1973) tarafından belirtilen yöntemler kullanılmıştır. Yöntemin esası ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi) spektrofotometrede 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İnorganik fosfat polioksietilen 10 lauril eter ile fosfomolibdat sarı renk oluşturmaktadır. Sarı rengin yoğunluğu ortamdaki Pi'nin derişimini göstermektedir. İnorganik fosfat tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları şu şekildedir.

1. % 5 Polioksietilen 10 Lauril eter: 5 g polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözülmüştür ve 100 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ^{0}C'de 30-40 dk bekletilmiştir.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 1.8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözülmüştür.
3. Ana ayraç: 10 mL % 5 polioksietilen eter, 25 mL % 2 molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Soğuk saf su ile sonlandırılan örneklerin üzerine 3 mL ana ayraç eklenerek oda sıcaklığında 10 dk süre ile bekletildikten sonra oluşan sarı rengin absorbansı spektrofotometrede 390 nm'de ölçülmüştür. İnorganik fosfat miktarını kantitatif olarak belirlemek için bir seri fosfat standardı hazırlanmış (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 µM KH_2PO_4) ve regresyon (y=0.1416x+0.0043) formülleri elde edilerek (Şekil 3.1.) örneklerdeki Pi miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Total Protein Analizi

Lowry metodu (Lowry ve ark., 1951) ile doku homojenatlarında protein analizi yapılmıştır. Bu metodun esası, proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesi ve fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan mavimsi-lacivert bileşiğin absorbansı spektrofotometrede 750 nm dalga okunmaktadır. Proteinlerde genellikle tirozin ve triptofan tek tek

veya birlikte bulunur. Bu aminoasitler fosfotungstik-fosfo molibdik asidi (Folin-Ciocalteu) redükleyerek mavi rengin oluşumu sağlar. Protein analizi için gerekli olan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

Ayraçlar:

1. Ayraç A: % 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde). 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0.1 N NaOH içinde çözünmesi sağlanmıştır.
2. Ayraç B1: % 1 $CuSO_4$. $5H_2O$. 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
3. Ayraç B2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
4. Ayraç C: 50 hacim ayraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayraç B_1 ve B_2.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Kullanılırken 1'e 1.5 oranında saf su ile seyreltilmiştir.
6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mL'de 1 mg (1000 µg/mL) bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlanmış ve bundan yapılan uygun seyreltmelerle 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmıştır.

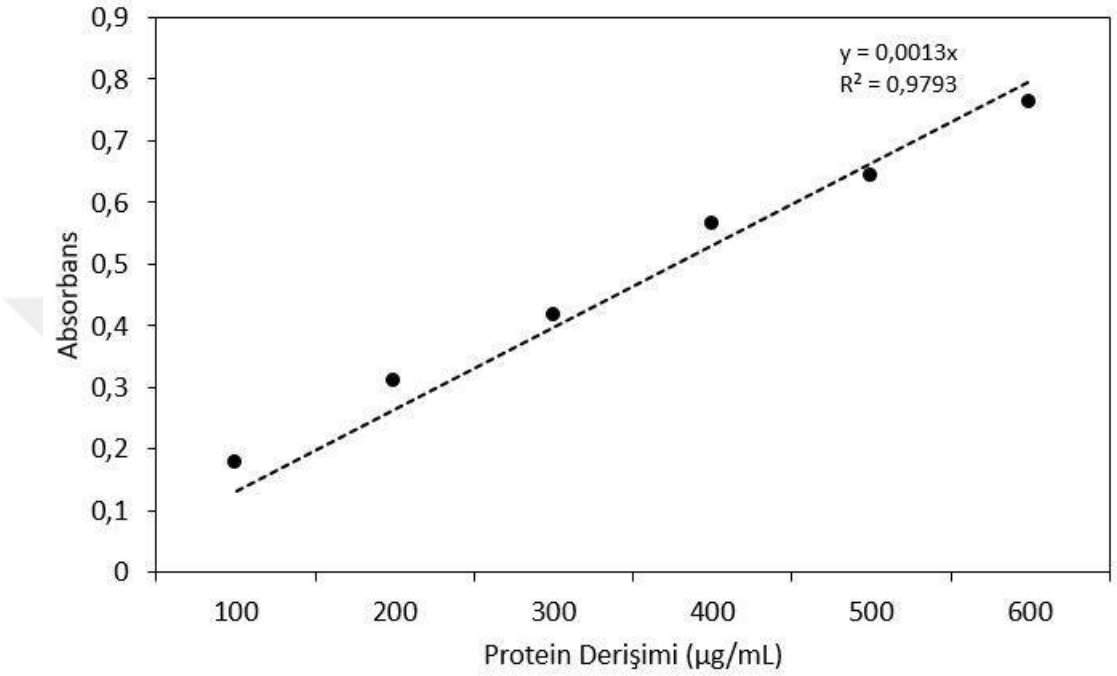
Protein analizleri için deney tüplerine standart çözeltilerden veya doku örneklerinden 0.3 mL eklenerek üzerlerine 3 mL ayraç C eklenir ve karıştırılarak 15 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 0.3 mL Folin-Ciocalteu her tüpe eklenerek tüpler iyice vostekslenmiş ve 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda oluşan mavi renkli kompleks 750 nm dalga boyunda su körüne karşı okunmuştur. Balık dokularındaki toplam protein miktarını belirlemek için stok serum bovin albumin çözeltisinden seri sulandırmalarla elde edilen standartlar 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL olacak şekilde standart hazırlanmış ve absorbans değerleri okunarak çizilen standart eğride regresyon eşitliği y = 0.1163x+0.0715 olarak bulunmuştur (Şekil 3.2.). Burada y absorbans değerini, x ise derişimi göstermektedir.

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart 1 = 100 µg : 0.1 mL stok bovin albumin + 0.9 mL distile su
Standart 2 = 200 µg : 0.2 mL stok bovin albumin + 0.8 mL distile su
Standart 3 = 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 albümin

Kör Doku homojenatı Standart (BSA)

Örnek (mL)	-	0.03	0.3
Saf su (mL)	0.3	0.27	-
Ayraç C (mL)	3.0	3.0	3.0
Karıştırılarak 15 dk oda sıcaklığında beklenir.			
Folin-Ciocalteu (mL)	0.3	0.3	0.3



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

Yukarıdaki protein grafiğinden elde edilen regresyon formülü y = 0,0013x olarak bulunmuştur. Buna göre absorbans(y) = 0.658 ise bu örnekteki protein miktarı şu şekilde hesaplanır;

Protein derişimi (x) = 0.658/0,0013*10/1000

X= 5.06 mg protein/mL olarak bulunur.

Çıkan sonucu 10 ile çarpılmasının nedeni, son hacmin 10 mL olması nedeniyledir. 1000'e bölünmesinin nedeni ise protein değerini mg cinsinden vermek içindir.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği (y=0.0014x)

Örnek absorbans: y = 0.32 ise

Örnek protein: 5.06 mg protein/mL ise

0.32/0.0014 x 4.5 (mL)

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{}{1000 \text{ x } 0.03 \text{ (mL)} \text{ x } 0.5 \text{ (sa.)} \text{ x } 5.06 \text{ mg prot./mL}}$$

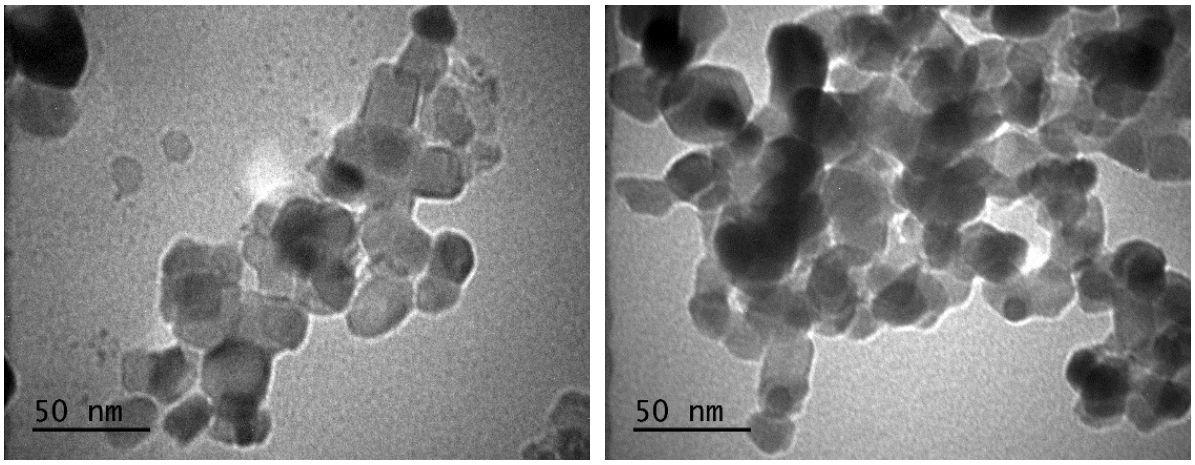
ATPaz aktivitesi = 13.55 μmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6. Dokularda Nanopartikül Birikiminin Ölçülmesi

Dokularda nanopartikül birikiminin belirlenmesi için solungaç ve kas dokularındaki alüminyum ve titanyum miktarları belirlenmiştir. Total metal analizi için solungaç ve kas dokuları petri kaplarına alınarak 105 ºC'de 5 gün süreyle sabit ağırlığa ulaşana kadar bir etüvde (Nuve EN400) kurumaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda dokuların kuru ağırlıkları (245-600 mg arası) saptandıktan sonra üzerlerine 10 ml HNO_3 (%65) eklenmiştir. Daha sonra, termostatlı bir ısıtıcı üzerine (çeker ocaklı) yerleştirilmiş ve sıcaklık kademeli olarak 120 ºC'ye çıkarılmıştır. Doku örnekleri tamamen çözülünceye kadar (homojen görünümlü) ısıtıcıda tutulmuş ve soğumaya bırakılmıştır. Metallerin sağlıklı bir şekilde okunabilmesi için atomize olması gerektiğinden, nanopartiküllerin tamamen parçalandığından emin olunması gerekmektedir. Bunun için, daha ileri bir yakma aşamasına geçilerek asit ile çözünmüş örnekler mikrodalga yakma sisteminde (Berghof Speedwave XPRT) bir kez daha yakılmıştır. Bu esnada örneklere ilave olarak 5 ml HC1 ilave edilmiş ve böylece daha berrak örnekler elde edilmiştir. Örneklerdeki Al ve Ti konsantrasyonları ICP-MS (Perkin Elmer, Nexion 2000p) ile ölçülmüştür. Cihazın üreticisi tarafından sağlanan stok standartları kullanılarak her metal için bir dizi standart çözelti hazırlanmıştır. Cihazdan örneklerdeki Al ve Ti derişimleri elde edildi. Elde edilen değerler sulandırma katsayıları ile çarpıldıktan sonra doku ağırlığına bölündü. Böylece, dokulardaki metal derişimleri μg metal/g kuru ağırlık olarak verildi.

3.2.7. Nanopartikül Karakterizasyonu

Metal oksit nanopartikülleri (Al_2O_3, TiO_2) Sigma-Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. NP'lerin özellikleri Al_2O_3 için ~40 nm, >99 % saflık, >30 m^2/g yüzey alanı, 2.70 g/cm^3 yoğunluk ve TiO_2 için ~21 nm, >%99 saflık, >30 m^2/g yüzey alanı, 4.26 g/cm^3 yoğunluktur. Nanopartiküllerin (Şekil 3.3) TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu) görüntüleri, GATAN 782 ES500W Erlangshen kamerasına bağlı Jeol JEM-1010 TEM (80kW) kullanılarak elde edilmiştir. Stok çözeltilerdeki Al_2O_3 ve TiO_2 NP'lerin TEM görüntüleri Şekil 3.3.'de sunulmuştur. NP'lerin X-Işını Kırınım (XRD) analizi, Rigaku RadB SmartLab difraktometre sistemi (CuKα1, λ=1.5405 Â, 30 kV, 15 mA, 2θ=10°-90°, tarama hızı 2°/dakika) kullanılarak elde edilmiştir. XRD verileri, gama Al_2O_3 NP'nin polikristal yapıya ve kübik faza, TiO_2 NP ise polikristal yapıya ve tetragonal faza sahip olduğunu göstermiştir. Enerji Dağıtıcı X-ışını (EDX) analizi, Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (Zeiss/Supra 55 VP) kullanılarak yapılmıştır. Veriler, Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerinde alüminyum ve titanyumun % atomik oranlarının sırasıyla 38.26 ve 33.83 olduğunu, ayrıca Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerinde alüminyum ve titanyumun % ağırlık oranlarının sırasıyla 51.10 ve 60.49 olduğunu göstermiştir.



A **B**

Şekil 3.3. $Al_2O_{3\,(A)}$ ve TiO_2 (B) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri.

3.2.8. İstatistik

Bu çalışmanın verileri üzerinde yapılan istatistiksel karşılaştırmalar SPSS 20 programı ile yapılmıştır. Verilere önce tek yönlü-ANOVA testi uygulanmıştır. Akut ve kronik deneyler ayrı ayrı teste tabii tutulduğundan her süreç kendi kontrol verileri ile değerlendirilmiştir. ANOVA sonucuna göre istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunan sonuçlar üzerinde daha detaylı testler yapmak üzere Duncan testi uygulanmıştır. Böylece, kontrolden istatistiki olarak farklı olan veriler bulunmuştur. Daha sonra, 0 ve 10 ppt tuzluluklarda akut ve kronik süreçlerin karşılaştırılması için T-testi uygulanmıştır. Deney verilerinin ortalama değerleri ve standart hataları Excel'de çizilen grafiklerde gösterilmiştir. Veriler 6 balığın ortalaması ve standart hataları olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

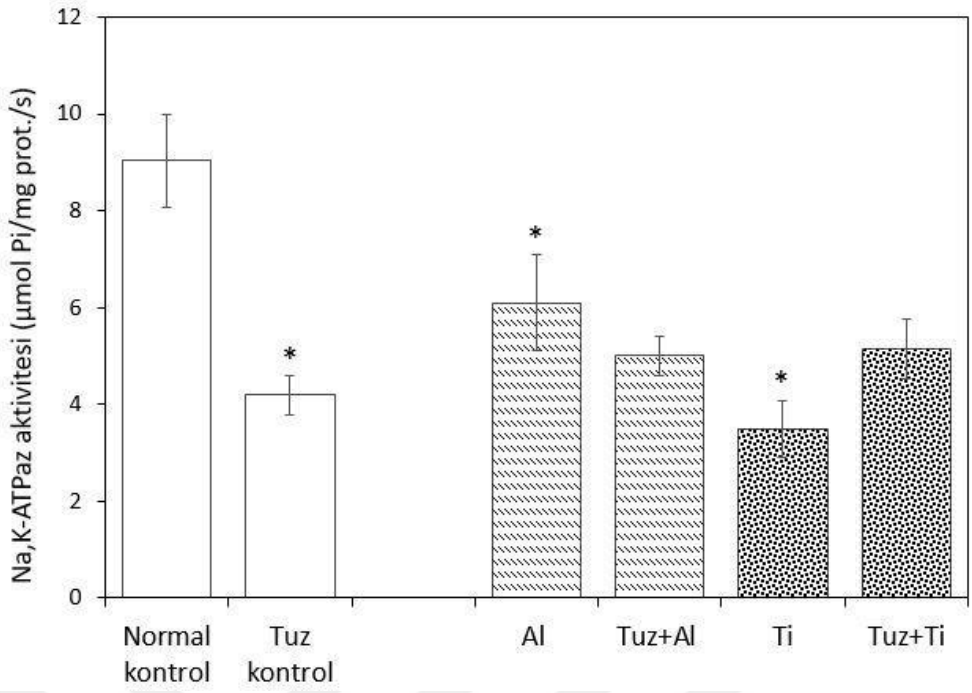
Bu çalışmada farklı tuzluluk (0, 10 ppt) derişimlerinde nanopartikül (Al_2O_3, TiO_2) etkisinde kalan *O. niloticus'* un akut (10 mg NP/L, 2 gün) ve kronik (1 mg NP/L, 20 gün) süreçler sonunda ozmoregülasyon enzimleri olan Na^+/K^+- ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. ATPaz aktiviteleri balıkların ozmoregülatör organları olan solungaç ve bağırsakta yapılmıştır. Her iki deney sürecinde, tuzluluk ve/veya NP etkisinde balık ölümü gözlenmediği gibi balık davranışlarında da gözle görülür bir fark da olmamıştır.

Balıklarda istatistiksel karşılaştırmalar şu şekilde yapılmıştır;
Normal kontrol ile tuz kontrolü balıklar,
Normal kontrol ile sadece NP etkisinde kalan balıklar,
Tuz kontrolü ile tuz+NP etkisinde kalan balıklar karşılaştırılmıştır.
Şekillerde sadece anlamlı ($p<0.05$) olan sonuçlar farklı sembollerle gösterilmiştir.

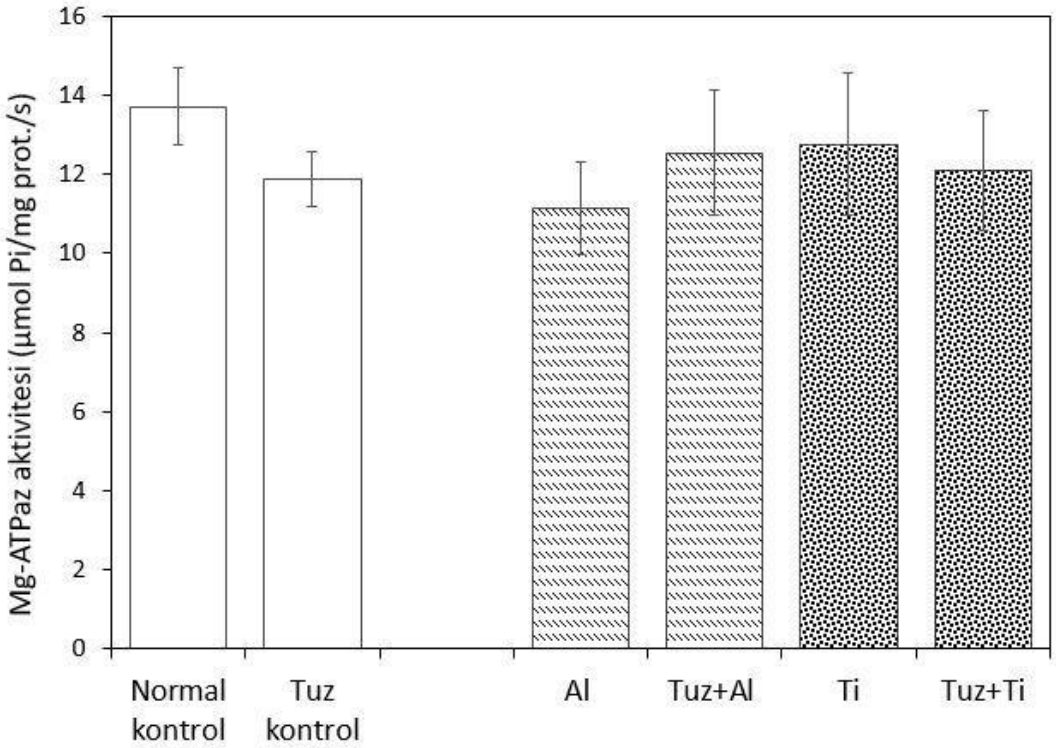
4.1.1. Akut Deneyler

Solungaç ATPaz Aktiviteleri

Akut deneylerde (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitelerinde kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) farklar bulunmuştur. Kontrol balıklarda Na,K-ATPaz aktivitesine (µmol Pi/mg protein/s) ait ortalama değeri ve standart hatası 9.04±0.06 olarak bulunmuştur. Sadece tuz etkisinde kalan tuz kontrolünde bu değer 4.19±0.40 olarak ölçülmüş olup, normal kontrollere göre anlamlı fark göstermiştir. Sadece Al ve Ti NP etkisinde kalan balıklarda Na,K-ATPaz aktivitesi anlamlı bir şekilde azalırken, tuz+NP etkisinde kalan balıklarda enzim aktivitesinde anlamlı bir değişim ($p>0.05$) görülmemiştir (Şekil 4.1).

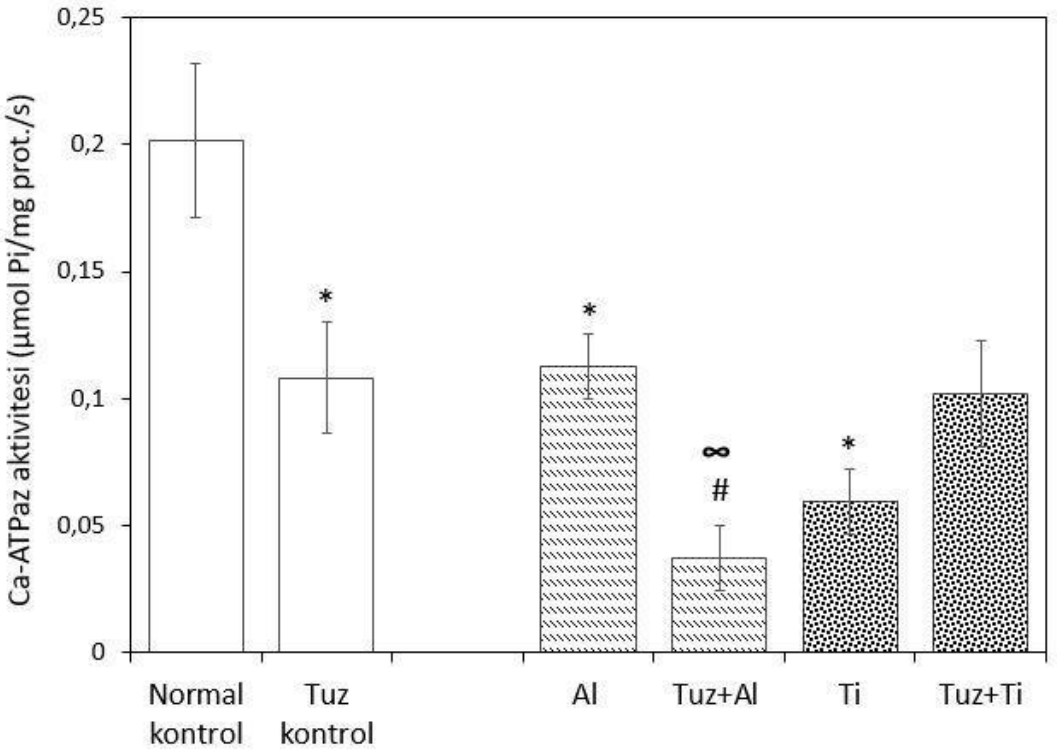


Şekil 4.1. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. * normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.



Şekil 4.2. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

Akut deneylerde NP ve tuz stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitelerinde hem kontroller arasında hem de kontroller ve NP ve/veya tuz etkisinde kalan balıklarda anlamlı ($p>0.05$) bir değişim görülmemiştir. Kontrol balıklarda Mg-ATPaz aktivitesine (µmol Pi/mg protein/s) ait ortalama değeri ve standart hatası 13.72±0.95 olarak bulunmuştur. Sadece tuz etkisinde kalan tuz kontrolünde bu değer 11.89±0.68 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.2).

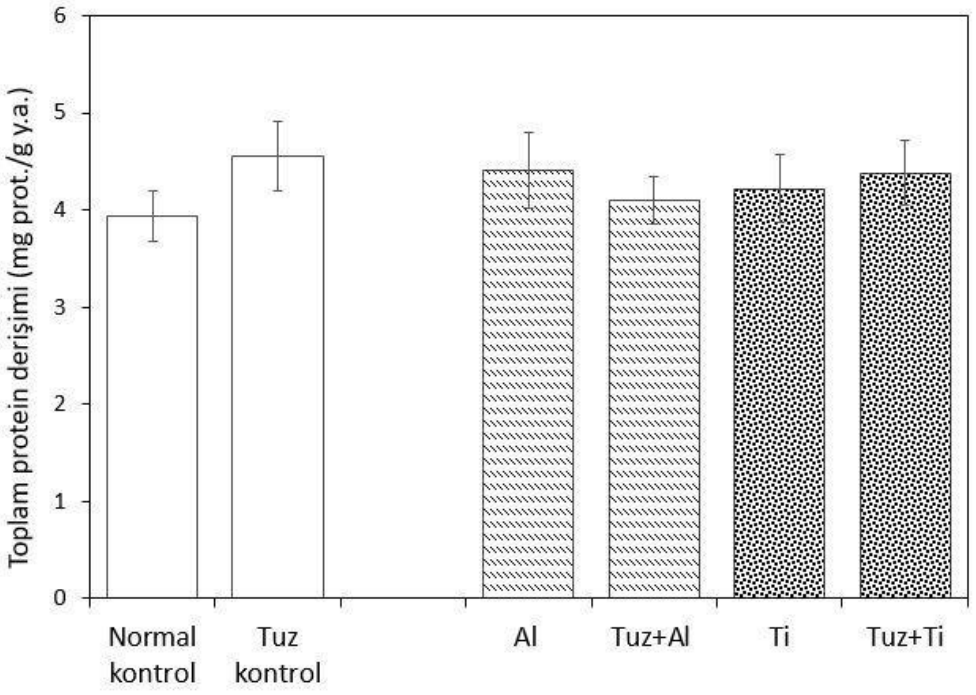


Şekil 4.3. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. * normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları, # tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,

∞ aynı nanopartikülün normal ve tuzlu ortamdaki anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.

Ancak akut deneylerde NP ve tuz stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitelerinde kontroller (0.201±0.03) arasında anlamlı ($p<0.05$) fark görülmüş olup, tuz kontrollerinde (0.108±0.022) aktivitenin düştüğü görülmüştür. Benzer şekilde sadece NP etkisinde kalan balıkların Ca-ATPaz aktivitesinde de anlamlı azalmalar görülmüştür. Diğer yandan, tuz+Al NP etkisinde kalan balıklarda da aktivede anlamlı azalmalar görülmesine karşın, tuz+Ti NP etksinde kalan balıklarda anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.3). Buna ilaveten, tuz+Al NP etkisinde kalan balıkların Ca-ATPaz aktivitesi sadece Al NP etkisine göre de anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir. Ancak Ti NP tuzlu ortamda veya normal ortamda benzer etkiyi göstermiş olup, aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.3).

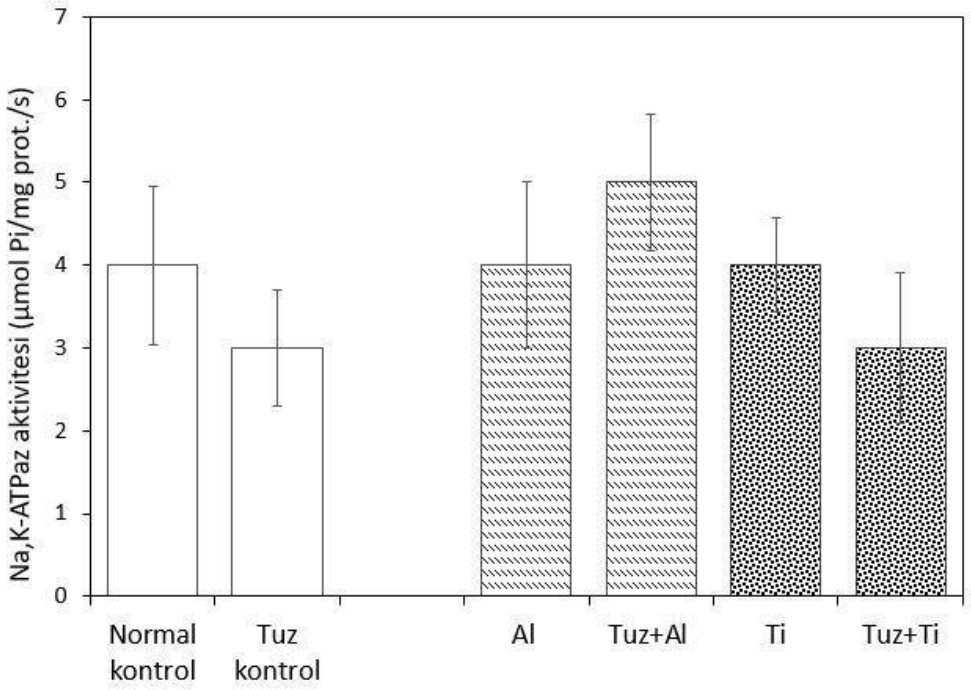
Solungaç dokusunun protein düzeyleri de (mg protein/g. y.a) akut süreçlerden etkilenmemiş olup, hiçbir deneysel koşul solungaçların protein miktarını değiştirememiştir. Kontrol balıklarda toplam protein derişimine ait ortalama değeri ve standart hatası 3.94±0.26 olarak bulunmuştur. Tuz kontrolünde ise bu değer 4.55±0.36 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.4.)



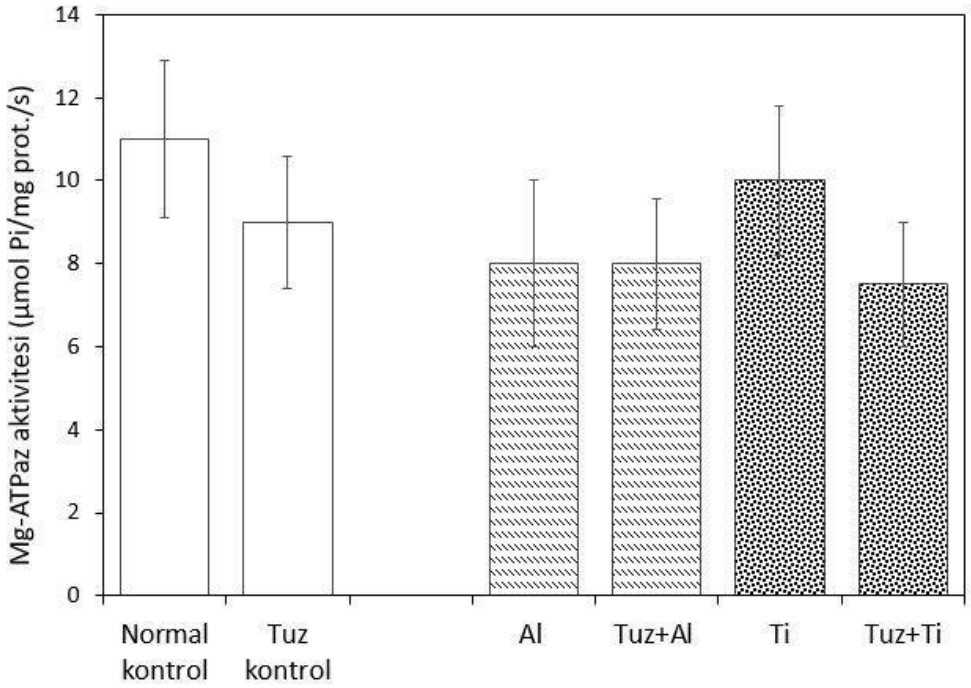
Şekil 4.4. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında toplam protein derişimi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

Bağırsak ATPaz Aktiviteleri

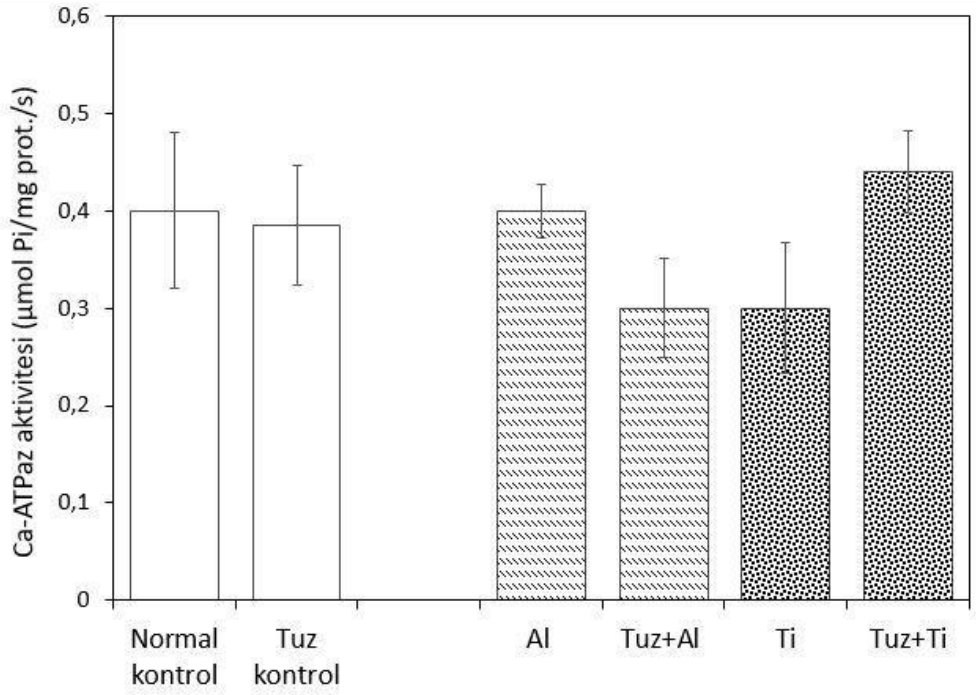
Akut deneylerde NP ve tuz stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında ATPaz aktiviteleri ölçülmüş olup, çok fazla dalgalanma gösterdiğinden hiçbir istatistiki karşılaştırmada enzim aktivitelerinde anlamlı bir fark ($p>0.05$) görülmemiştir. Kontrol balıklarda Na,K-ATPAz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin ortalama değerleri ve standart hataları sırasıyla 4.01±0.99, 11.00±1.91 ve 0.41±0.08 olarak ölçülmüştür. Tuz kontrolüne ait balıklarda Na,K-ATPAz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin ortalama değerleri ve standart hataları sırasıyla 2.98±0.70, 8.99±1.61 ve 0.38±0.06 olarak ölçülmüştür. Tuz ve/veya NP stresinde kalan balıkların ATPaz aktivitelerinde ve protein düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığından ($p>0.05$) daha fazla detay verilmemiştir (Şekil 4.5-4.8).



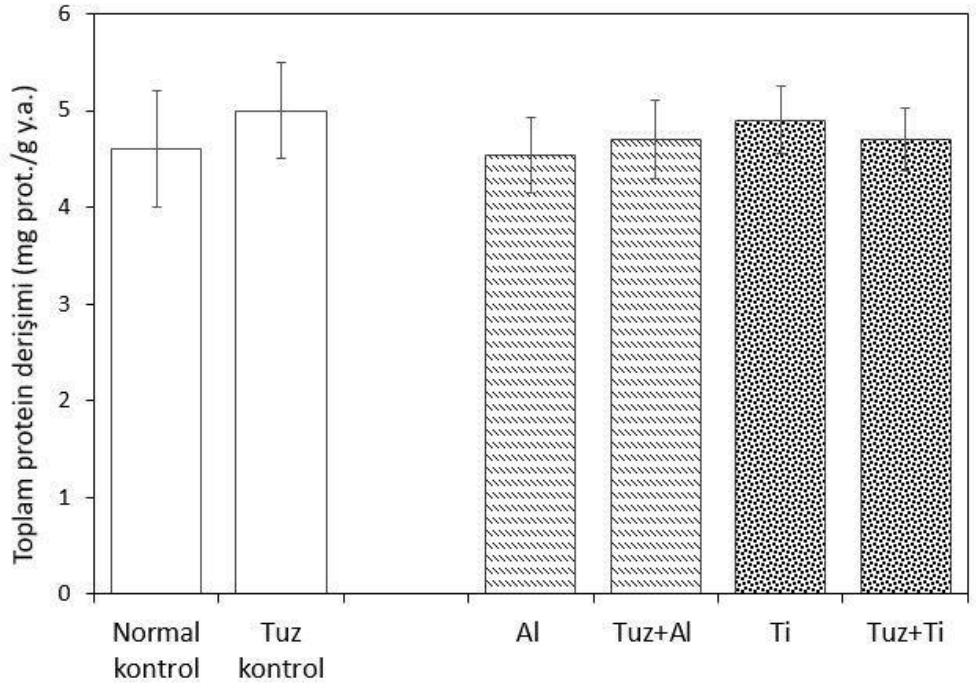
Şekil 4.5. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.



Şekil 4.6. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.



Şekil 4.7. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

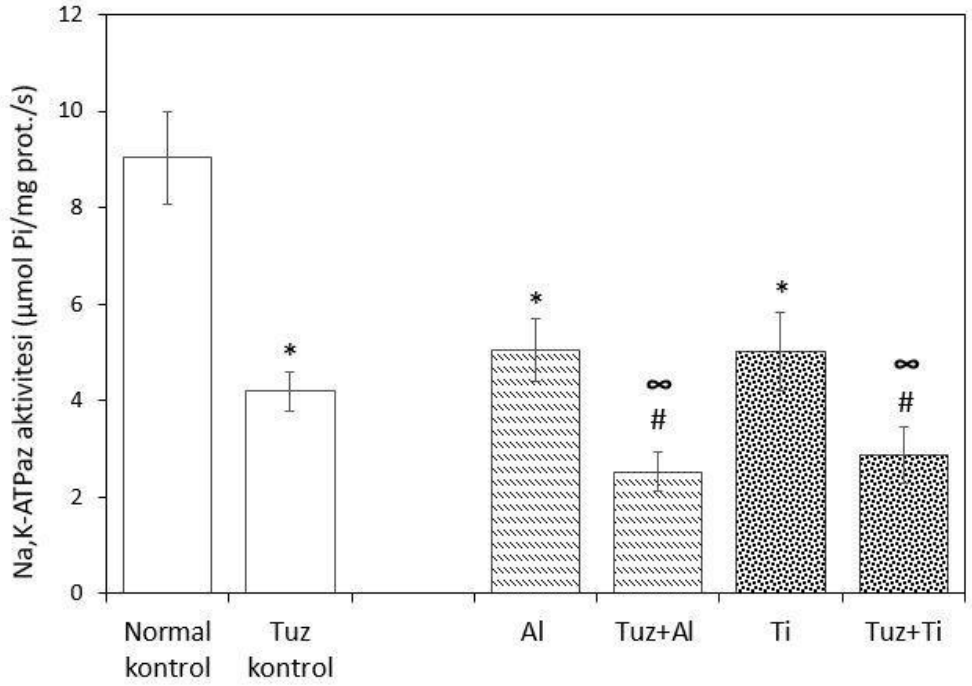


Şekil 4.8. Akut süreçte (48 saat) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

4.1.2. Kronik Deneyler

Solungaç ATPaz Aktiviteleri

Kronik deneylerde (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitelerinde kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) farklar bulunmuştur. Kontrol balıklarda Na,K-ATPaz aktivitesine (µmol Pi/mg protein/s) ait ortalama değeri ve standart hatası 9.04±0.96 olarak bulunmuştur. Sadece tuz etkisinde kalan tuz kontrolünde bu değer 4.19±0.40 olarak ölçülmüş olup, normal kontrollere göre anlamlı fark göstermiştir. Sadece Al ve Ti NP etkisinde kalan balıklarda ve tuz+NP etkisinde kalan balıklarda Na,K-ATPaz aktivitesi anlamlı bir şekilde azalma ($p<0.05$) görülmemiştir (Şekil 4.9).

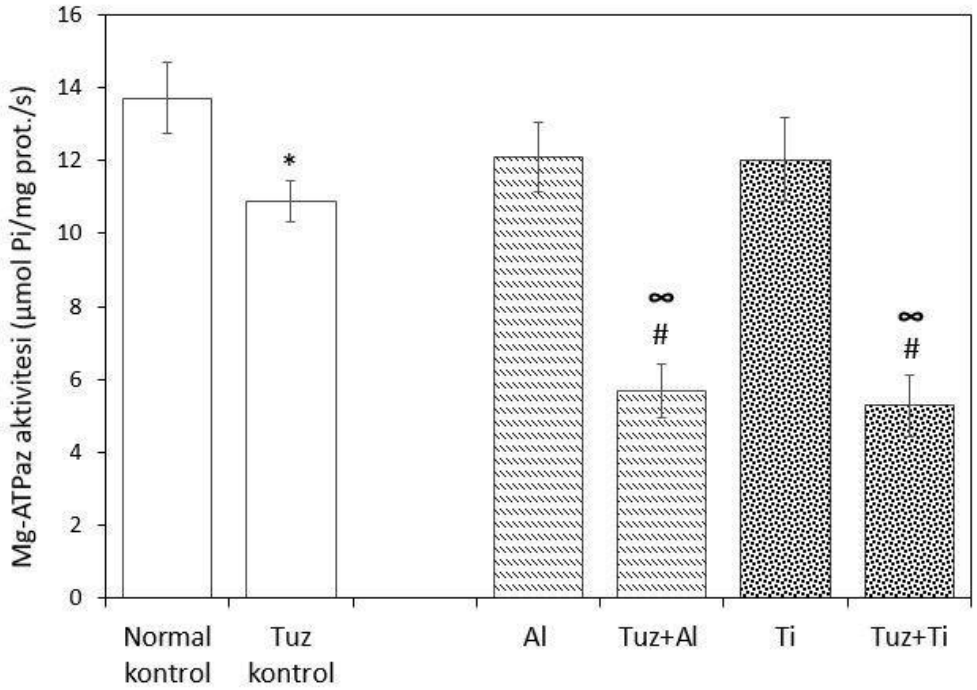


Şekil 4.9. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir.

* normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,

tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,

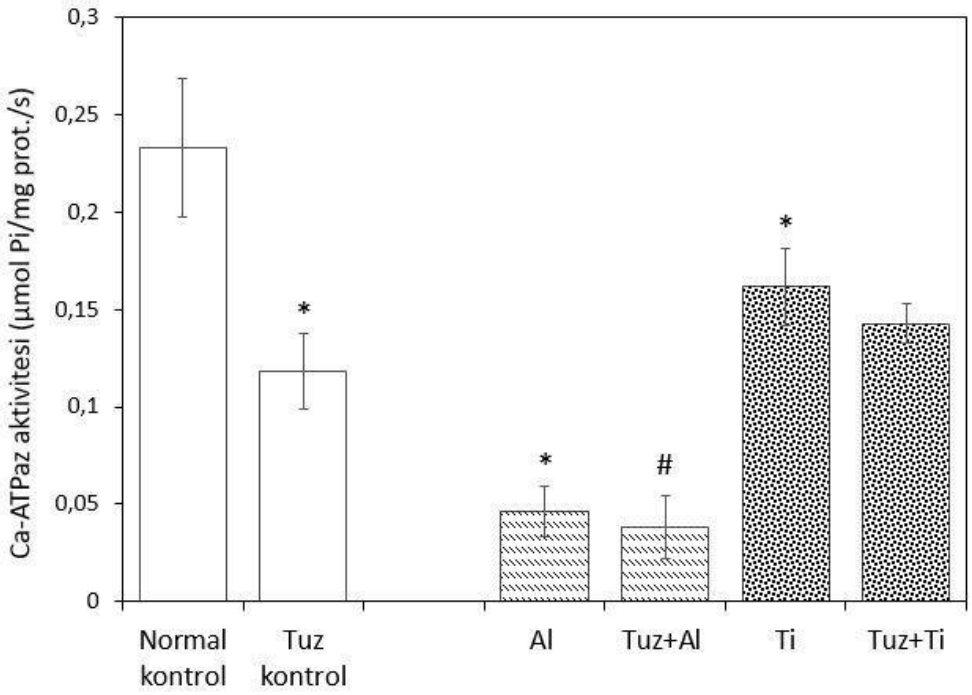
∞ aynı nanopartikülün normal ve tuzlu ortamdaki istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.



Şekil 4.10. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir.

* normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
# tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
∞ aynı nanopartikülün normal ve tuzlu ortamdaki istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.

Kronik deneylerde tuz stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Mg-ATPaz aktivitelerinde anlamlı azalmalar ($p<0.05$) görülmüştür. Ayrıca tuz+nanopartikül stresine maruz kalan balıklarda da Mg-ATPaz aktivitesinde anlamlı azalmalar olmuştur. Diğer yandan, düşük ve yüksek tuzluluk değerlerinde NP etkisinde kalan balıklarda da anlamlı farklar görülmüştür. Kontrol balıklarda Mg-ATPaz aktivitesine (µmol Pi/mg protein/s) ait ortalama değeri ve standart hatası 13.72±0.95 olarak bulunmuştur. Sadece tuz etkisinde kalan tuz kontrolünde bu değer 11.89±0.68 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.10.).

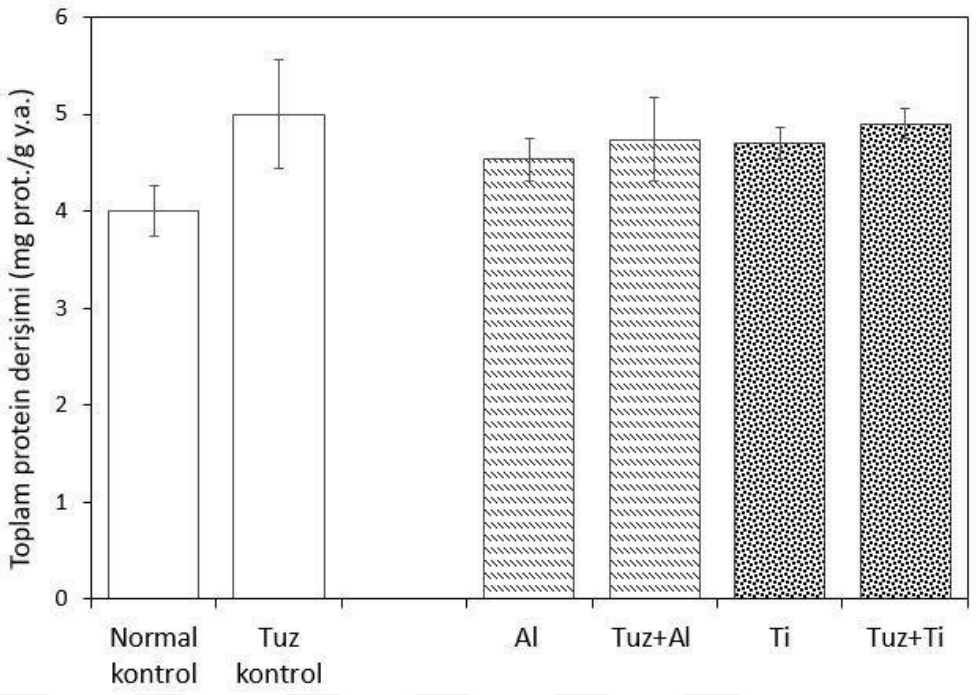


Şekil 4.11. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir.

* normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
# tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,

Kronik Deneylerde NP ve tuz stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında Ca-ATPaz aktivitelerinde kontroller (0.201±0.03) arasında anlamlı ($p<0.05$) fark görülmüş olup, tuz kontrollerinde aktivitenin (0.108±0.022) düştüğü görülmüştür (Şekil 4.11). Benzer şekilde sadece NP etkisinde kalan balıkların Ca-ATPaz aktivitesinde de anlamlı azalmalar görülmüştür. Diğer yandan, tuz+Al NP etkisinde kalan balıklarda da aktivede anlamlı azalmalar görülmesine karşın, tuz+Ti NP etksinde kalan balıklarda anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.11). Buna ilaveten, tuz+Al NP etkisinde kalan balıkların Ca-ATPaz aktivitesi sadece Al NP etkisine göre de anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir. Ancak Ti NP tuzlu ortamda veya normal ortamda benzer etkiyi göstermiş olup, aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

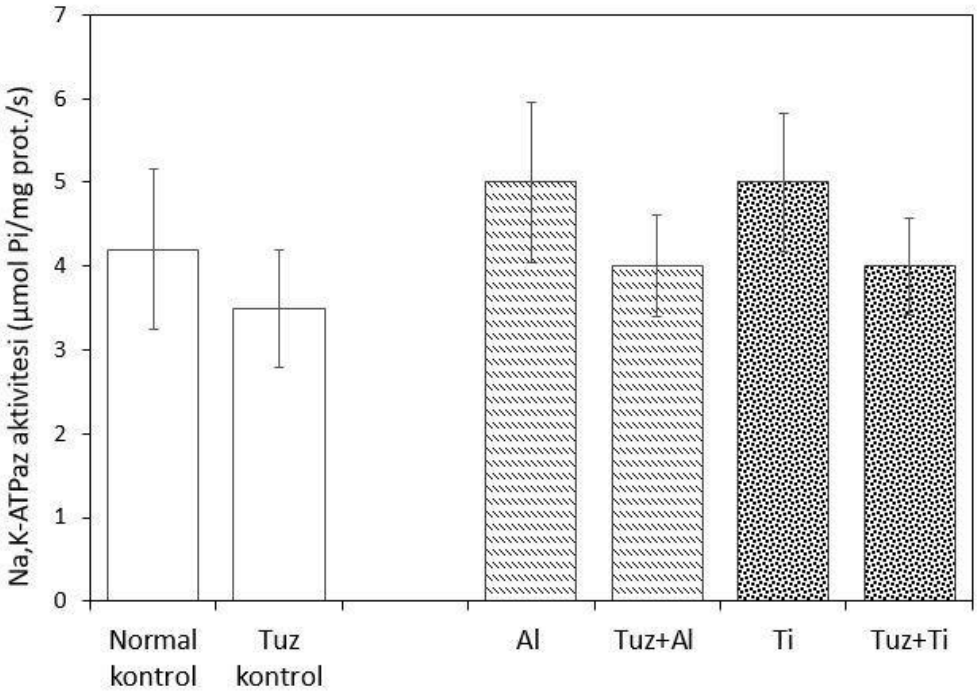
Solungaç dokusunun protein düzeyleri de (mg protein/g. y.a) kronik süreçlerden etkilenmemiş olup, hiçbir deneysel koşul solungaçların protein miktarını değiştirememiştir. Kontrol balıklarda toplam protein derişimine ait ortalama değeri ve standart hatası 3.94±0.26 olarak bulunmuştur. Tuz kontrolünde ise bu değer 4.55±0,36 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.12.)



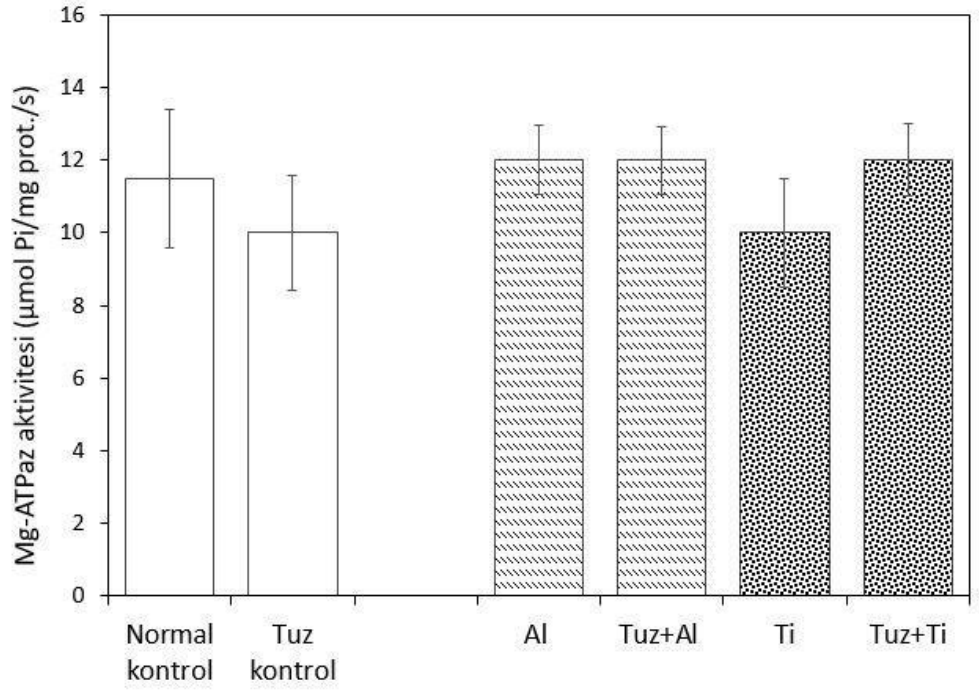
Şekil 4.12. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların solungaç dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

Bağırsak ATPaz Aktiviteleri

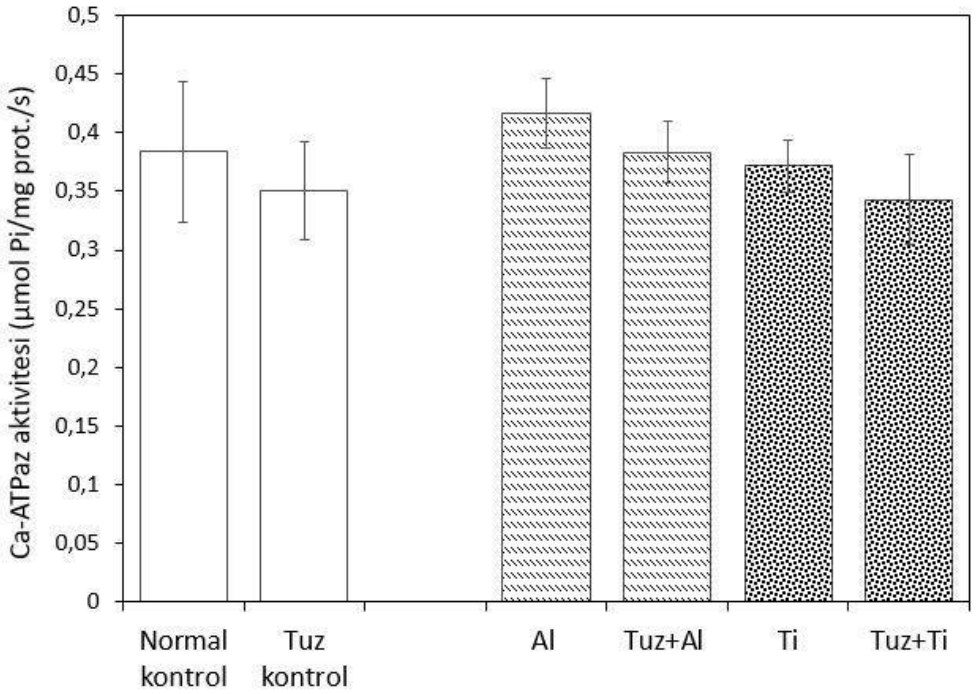
Kronik deneylerde NP ve tuz stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında ATPaz aktiviteleri ölçülmüş olup, çok fazla dalgalanma gösterdiğinden hiçbir istatistiki karşılaştırmada enzim aktivitelerinde anlamlı bir fark ($p>0.05$) görülmemiştir. Kontrol balıklarda Na,K-ATPaz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin ortalama değerleri ve standart hataları sırasıyla 4.01±0.99, 11.00±1.91 ve 0.41±0.08 olarak ölçülmüştür. Tuz kontrolüne ait balıklarda Na,K-ATPAz, Mg-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin ortalama değerleri ve standart hataları sırasıyla 2.98±0.70, 8.99±1.61 ve 0.38±0.06 olarak ölçülmüştür. Tuz ve/veya NP stresinde kalan balıkların ATPaz aktivitelerinde ve protein düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığından ($p>0.05$) daha fazla detay verilmemiştir (Şekil 4.13.-4.16.).



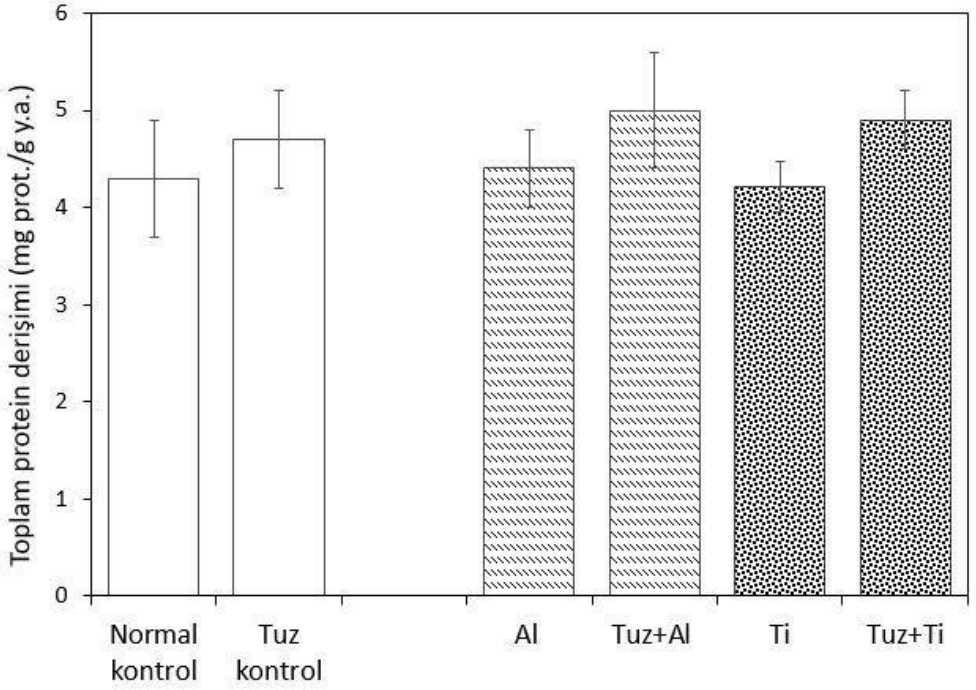
Şekil 4.13. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Na,K-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.



Şekil 4.14. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Mg-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.



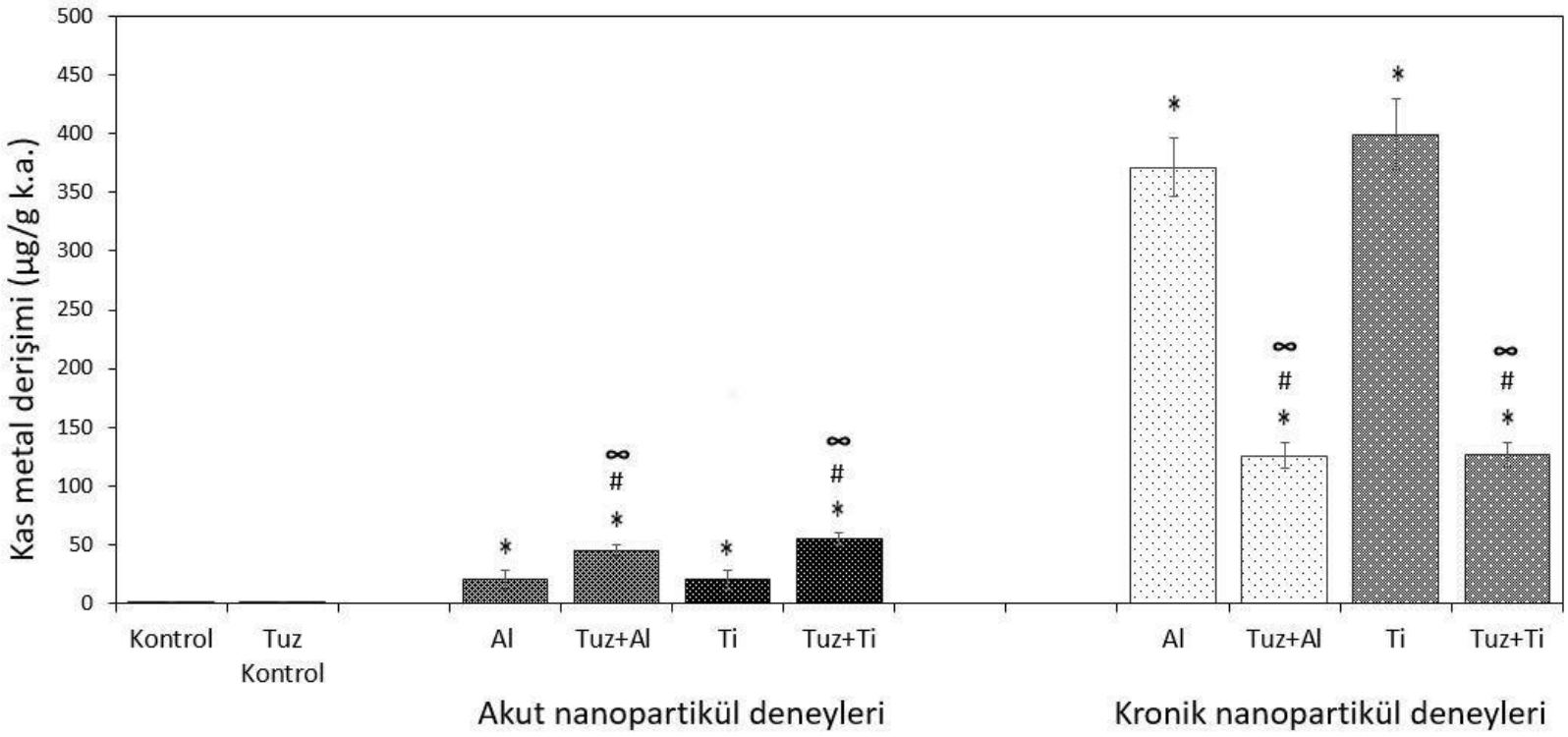
Şekil 4.15. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında Ca-ATPaz aktivitesi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.



Şekil 4.16. Kronik süreçte (20 gün) nanopartikül (10 mg/L) ve tuz (0 ve 10 ppt) stresine maruz bırakılan balıkların bağırsak dokularında toplam protein derişimi. Veriler 6 balıktan elde edilen ortalamalar olup, barlar da standart hataları göstermektedir. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) fark yoktur.

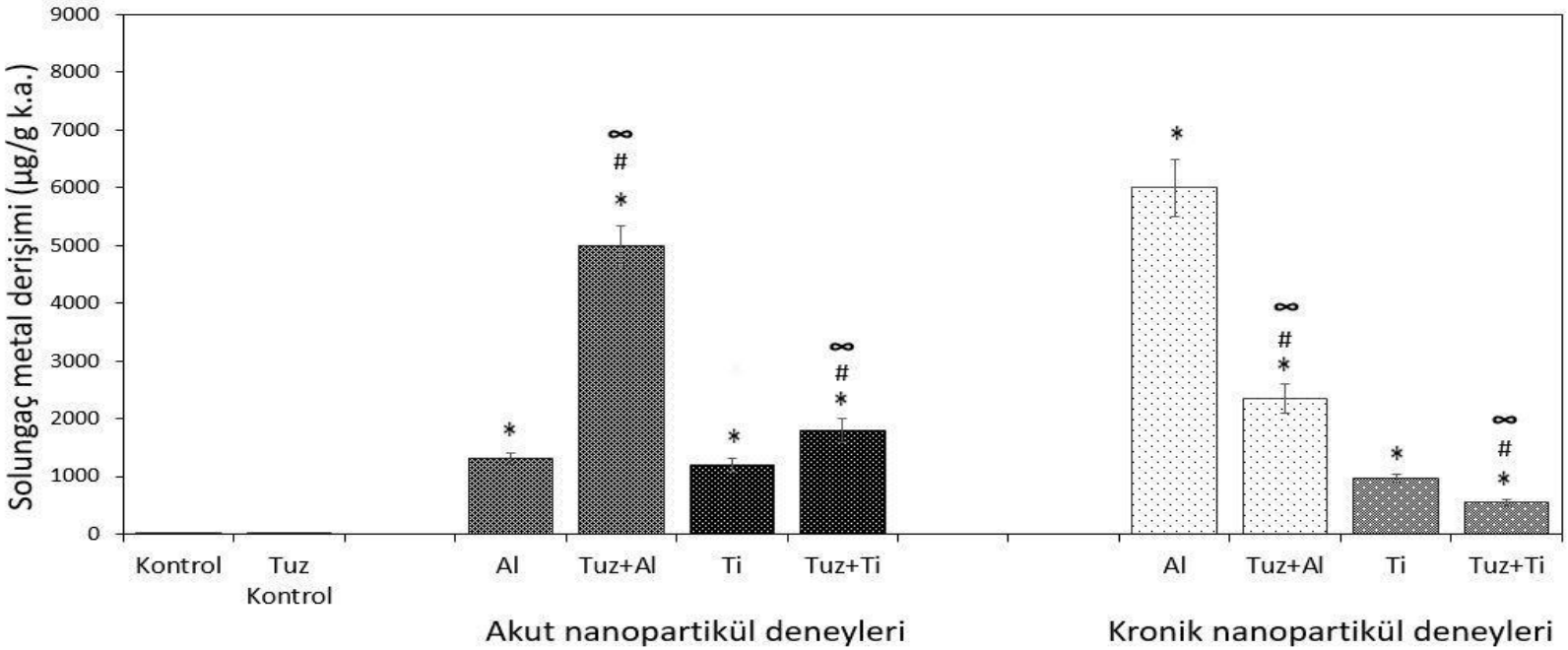
4.1.3. Metal Birikimi

Akut ve kronik süreçlerde tuz, nanopartikül ve her ikisinin karışımlarına maruz kalan balıkların solungaç ve kas dokularında nanopartiküllerin birikimini tespit etmek için dokularda Al ve Ti derişimleri ölçülmüştür. Veriler solungaç ve kas dokusunda Al ve Ti derişimlerinde keskin artışların olduğunu, ancak bu artışların ortamdaki tuz durumuna göre değiştiğini göstermiştir. Kontrol balıklarda Al ve Ti derişimleri çok düşük (< 0.5 µg/mg k.a.) olarak bulunmuştur. Akut süreçte farklı tuzlu ortamlarda NP etkisinde kalan balıkların solungaç ve kas dokusunda Al ve Ti derişimleri anlamlı oranlarda artmıştır ($p<0.05$). Ancak bu artış tuzlu ortamda daha fazla olmuş olup, tuzlu ortam akut süreçte NP alınımını anlamlı bir şekilde ($p<0.05$) artırmıştır (Şekil 4.17-4.18). Kronik süreçte ise balıkların solungaç ve kas dokusunda Al ve Ti derişimleri anlamlı oranlarda artmasına rağmen, akut süreçten farklı olarak tuzlu ortamlar balıkların NP alınımı üzerine azaltıcı etkiler yapmıştır (Şekil 4.17-4.18). Bu nedenle akut ve kronik süreçlerde NP alınımında tuzluluk farklı şekilde (akut süreçte artırıcı, kronik süreçte azaltıcı) etki yapmıştır.



Şekil 4.17. Akut ve kronik süreçlerde tuz ve nanopartikül etkisinde kalan balıkların kas dokularında Al ve Ti birikimi.

* normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
# tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
∞ aynı nanopartikülün normal ve tuzlu ortamdaki istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.



Şekil 4.18. Akut ve kronik süreçlerde tuz ve nanopartikül etkisinde kalan balıkların solungaç dokularında Al ve Ti birikimi.

* normal kontrolden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
# tuz kontrolünden istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları,
∞ aynı nanopartikülün normal ve tuzlu ortamdaki istatiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) farkları göstermektedir.

4.2. Tartışma

Bu çalışmanın sonuçları akut ve kronik süreçlerde 20 güne kadar NP ve/veya tuz etkisinde kalan balıklarda herhangi bir ölümün olmadığını göstermekle beraber, gözle görülür herhangi bir sağlık sorunu veya balıkların yüzme ve yeme performansında bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Bu durum, *O. niloticus*'un tuzluluktan ve/veya Al_2O_3 ve TiO_2 NP'lerinden ciddi şekilde etkilenmediğini göstermektedir. Aslında tilapia (*Oreochromis*) cinsi balıkların tuzluluğa veya kirleticilere karşı dirençli oldukları bilinmektedir (Cioni et al. 1991; Kamal ve Mair 2005). Bu da bu balıkları çevre kirliliğinin incelenmesinde iyi bir indikatör hayvan yapmaktadır. Buna rağmen, Karul ve ark. (2013) tilapia türlerinin yetiştirilmesi için optimum tuzluluk koşulunun, büyüme hızı, beslenme davranışı ve metabolik parametreler ile ilgili olarak 12 ppt'nin altında olduğunu belirtmiştir. Ancak, tilapiaların bu değerden daha yüksek tuzluluklarda bile sorunsuz bir şekilde hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Tilapiaların birçok tatlı su balığı türüne kıyasla tuzluluk bakımından yüksek eşik seviyeleri olmasına rağmen, bu onların çevresel maruziyetlerden metabolik olarak etkilenmedikleri anlamına gelmez. Bu çalışma, artan tuzluluk ve NP maruziyetlerinin ayrı ayrı veya kombinasyon halinde *O. niloticus*'un ozmoregülasyon sistemini ciddi şekilde etkilediğini göstermiştir. Benzer şekilde, balıkların solungaçlarında ve kaslarında NP birikimi hem akut, hem de kronik maruziyetlerde keskin bir şekilde artarken, tuzluluğun dokularda NP birikimi üzerine önemli rol oynadığını da göstermiştir. Tuzluluk artışı akut süreçlerde kas ve solungaç dokularında NP birikimini artırıcı etki yaparken, kronik süreçlerde tam ters yönde etki yaparak, NP birikimini azaltmıştır. Bu çalışma ayrıca, hem tuzluluk artışının, hem de NP etkisinde kalmanın *O. niloticus*'un solungacındaki ATPaz aktiviteleri üzerinde inhibitör etkileri olduğu gösterirken, kronik etkilenmenin ATPaz aktivitesindeki etkilerinin daha fazla olduğu göstermiştir. Akut süreçlerde, Mg-ATPaz aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Fakat, Na,K-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitesi önemli ölçüde azalmasına rağmen, bu düşüşler genellikle NP etkisiyle değil, tuzluluk artışından dolayı meydana gelmiştir. Bununla birlikte, hem tuzluluk, hem de NP'ler balıklarda fizyolojik stres oluşturmuş olup, ATPaz'ın aktivitelerini azaltmışlardır ve bu etkilenmede akut ve kronik süreçler farklı şekilde etkilemişlerdir.

Literatürde tatlı su balıklarında NP toksisitesi üzerine yapılmış birkaç makale olmasına rağmen, bu çalışmaya benzer makale yok denecek düzeydedir. Yapılan çalışmalar farklı metal oksit NP'lerine maruz kalan balıklarda NP'lerin dokularında biriktiğini ve farklı metabolik sistemlere özgün olan biyobelirteçler üzerine değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Griffitt ve ark. 2009; Wang ve ark. 2013; Ateş ve ark. 2013; Priya ve ark. 2015; Katsumiti ve diğerleri 2018; Abdel-Khalek ve ark., 2020). Bizim laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda da, Al_2O_3, CuO ve TiO_2 NP'lerinin, *O. niloticus*'un antioksidan, ozmoregülasyon ve sinir sistemleri dahil olmak üzere farklı sistemlere ait biyobelirteçlerin seviyelerini anlamlı şekilde değiştirdiğini göstermiştir (Canli ve ark. 2018; Canli ve Canli 2019; 2020a ve b; Canlı 2021). Bilindiği gibi tuzluluk, tatlı su balıklarının fizyolojisi üzerinde baskın etkiye sahiptir ve tuzluluk artışı, tatlı su balıklarında ozmoregülasyon

hasarlarına hatta ölüme bile neden olabilmektedir (Heath 1995). Aynı şekilde tuzluluk metallerin biyolojik olarak alınımı üzerine de belirleyici etkileri olan çevresel bir etmendir. Bu bağlamda, ağır metal iyonlarının toksik etkileri ve tuzluluk artışının tatlı su balıklarının ozmoregülasyon sistemi üzerindeki etkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Kulac ve ark. 2012; Baysoy ve ark. 2013; Doğan ve Canli 2019; Handayani ve ark. 2020). Bu çalışmalar, balıkların ozmoregülasyon sistemlerinin tuzluluk ve/veya metal etkisinde kalma sonucu önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Bu etkilenmede de en fazla tatlı su balıklarının ATPaz'ların tuzluluğa ve/veya metal stresine karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Veriler ayrıca, çevresel izleme çalışmaları sırasında tatlı suların tuzluluğunun dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır. Ancak, NP'lerin ATPazlar üzerindeki etkileri son yıllarda araştırılmış olup, NP toksisitesinde tuzluluğun etkilerini inceleyen çalışma son derece azdır, özellikle ATPaz grubu enzimlerde böyle çalışmalar yok denebilir. Bu bakımdan bu çalışma *O. niloticus* üzerinde yapılan ilk çalışmadır. Bununla birlikte, NP etkisinde kalan balıklarda tuzluluğun tatlı su balıkları üzerine olan farklı etkileri üzerine bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Villareal ve ark. (2014) tatlı su balıklarını (*Oreochromis mossambicus*) tuz olmayan ortamlarda ve farklı tuzluluklarda (45 ppt'ye kadar) 5 mg CuO/L etkisine bırakmış ve balıkların tuzlu ortamda yaşayan balıklarda CuO NP etkisinin daha hafif etkiler olmakla beraber, balıkların solungaç kapaklarının çalışma hızının arttığını belirtmişlerdir. Yazarlar CuO NP'lerinin balıkların antioksidan sistemini etkilediğini, ancak tuzluluk artışının CuO NP toksisitesini azalttığını vurgulamışlardır. Ancak Canlı (2021), Al_2O_3 ve TiO_2 NP'lerinin *O. niloticus*'un antioksidan sistemi üzerindeki toksik etkilerini göstermiş ve tuzluluğun (10 ppt) genel olarak antioksidan enzimlerin tepkisi ve NP'ler üzerindeki etkisi üzerinde önemli bir rol oynamadığını göstermiştir.

Tatlı su balıklarının farklı dokularında NP birikimleri literatürde gösterilmiştir (Griffitt ve ark. 2009; Ateş ve ark. 2013; Joo ve ark. 2013; Villareal ve ark. 2014; Osborne ve ark. 2015; Joo ve ark. 2018). Daha önceki çalışmalarımızda, farklı NP'lere maruz kalan *O. niloticus*'un dokularında NP'lerin birikimini Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) aracılığıyla gösterilmiştir. (Canlı ve Canlı 2019; 2020a ve b). Bu çalışma ayrıca, Al_2O_3 ve TiO2 NP'lerin dokularda birikimini kantitatif olarak göstermiş olup, önceki çalışmalarımızı destekler niteliktedir. Literatür incelendiğinde tatlı su balıklarında NP toksisitesi ile ilgili ilginç çalışmalara rastlanmıştır. Örneğin Joo ve ark. (2013), Jüvenil gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) 14 gün süresince düşük (0.4 ppt), orta (6 ± 0.3 ppt) ve yüksek (12 ± 0.2 ppt) tuzluluk değerlerindeki sularda farklı Ag-NP derişimlerinin etkisine bırakmışlardır. Sonuçlar incelenen dokularda Ag biyobirikiminin karaciğer> böbrekler ≈ solungaçlar> beyaz kaslar şeklinde olduğunu göstermiştir. Dokuların gümüş düzeyleri yüksek tuzluluk değerine sahip sularda daha fazla olduğunu bulunmuştur. Ayrıca, düşük, orta ve yüksek tuzlulukta Ag-NP'lere maruz kalan tüm balıklarda hepatosomatik indeks konsantrasyona bağlı bir artış göstermiştir. Aynı araştırmacı grubu, Jüvenil gökkuşağı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) 14 gün süresince düşük (0.4 ppt), orta (6 ± 0.3 ppt) ve yüksek (12 ± 0.2 ppt) tuzluluk değerlerindeki sularda farklı Ag-NP derişimlerinin etkisine bırakmışlardır. Sonuçlar tuzlululuk değişiminin NP

derişimine bağlı olarak kan hücrelerinin sayısında anlamlı değişimlere neden olduğunu göstermiştir. Özellikle kan plazma iyonlarının düzeylerinin yüksek Ag-NP etkilerinde arttığı görülmüştür. Tuz ve NP etkilerinde solungaç dokusunun histolojik yapısında da çeşitli anomaliler olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, daha düşük Ag-NP derişimde kalmalarına karşın düşük tuzlulukta balıkların daha fazla etkilenme gösterdiği vurgulanmıştır (Joo ve ark., 2018). Diğer yandan, Villarreal ve ark. (2014) Mozambik tilapyası (*O. mossambicus*) ile yaptıkları bir çalışmada CuO nanopartiküllerinin (0.5 ve 5 mg/L) tatlısu ve tuzluluğu artmış tatlı sulardaki etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar tuzluluğu artan sularda 5 ppm CuO etkisine bırakılan balıklarda solungaç kapağı hareketlerinde artış olduğunu, ancak tatlısu ortamında kalan balıklarda bu etkinin çok daha az olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, CuO nanopartiküllerinin hem tuzlu ortamda hem de tatlısu ortamında balıkların antioksidan sistemi üzerine de etkileri olduğunu göstermiştir. Araştırıcılar tuzluluğun tatlısu çalışmalarında ve ekolojik değerlendirmelerde dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada, Wang ve Wang (2014) Ag nanopartiküllerinin çökelme kineteklerini ve surfaktanların (Tween 20) biyoalınımına etkisini deniz balığında (*Oryzias melastigma*) çalışmışlardır. Deneyin sonuçları Tween 20'nin hızlı bir şekilde Ag nanopartiküllerinin çökelmesinin azalttığını gösterirken, 30 ppt deniz suyunda bile bu etkisini sürdürdüğünü belirtmiştir. Ag nanopartiküllerin alınım hız sabitleri düşük tuzluluklarda iyonik Ag'ün yarısı kadar olmasına karşın, yüksek tuzluluklarda (15 ppt ve 30 ppt) daha az biyoalınım olduğunu da belirtmişlerdir. Araştırıcılar metal oksit nanopartiküllerinin sudan alınımı üzerine yeterli araştırma olmadığını ve bu konunun daha fazla çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini de vurgulamışlardır.

Tuzluluğu artan ortamlarda mNP etkisinde kalan balıkların ATPaz grubu enzimler üzerine olan etkileri ile ilgili sınırlı olsa da, metaller ile yapılan birçok makale bulunmaktadır. Laboratuvarımızda da daha önce yapılan çalışmalarda cıva etkisine artan tuzluluklarda (1 ve 10 ppt) akut (0.3 µM cıva, 3 gün) ve kronik (0.03 µM cıva, 30 gün) olarak maruz kalan balıkların (*O. niloticus*) solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitelerinde anlamlı değişimler olduğu gösterilmiştir (Dogan ve Canli, 2019). Benzer şekilde, Kulaç ve ark. (2012), tuzluluk artışının tatlı su balıklarına (*O. niloticus)* olan fizyolojik etkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar balıkları farklı tuzluluk (0, 2, 4 ve 8 ppt) derişimlerindeki sularda 1 ppm kadmiyum ve bakır etkilerini farklı sürelerde (1, 3, 7 ve 14 gün) incelemişlerdir. Sonuçlar ATPaz aktivitelerinin tuzluluk, metal tipi, süreç ve dokuya bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Bunun yanında metal+tuzluluk etkisinde kalan balıklarda etki süresine bağlı olarak solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde anlamlı farklar bulmuşlardır. Tuzluluk artışına bağlı olarak ATPaz aktivitesinde bir artış olurken, tuzluluk+metal etkisinde aktivitede genel bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer yandan, Baysoy ve ark. (2013), farklı tuzluluk (0, 2 ve 8 ppt) düzeylerinde krom ve kurşun etkisinde 14 gün kadar sürelerle kalan tatlı su balıklarında (*Oreochromis niloticus*) ATPaz aktivitelerinin değişimini incelemişlerdir. Sonuçlar sadece tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin artma yönünde bir eğilim gösterdiğini, ancak tuz+metal karşımı

ortamlarında ise enzim aktivitesinde anlamlı azalmalar olduğunu göstermiştir. Ayrıca solungaç ATPaz aktivitelerinin bağırsak ATPaz aktivitelerine göre daha fazla değiştiğini de vurgulamışlardır.

Bu çalışmada akut ve kronik süreçleri incelediğimizde ATPaz aktivitelerinde anlamlı değişimlerin olduğu görülmekle birlikte, akut ve kronik süreçlerde hem NP birikimi bakımından hem de ATPaz aktivitelerindeki değişimler bakımından bariz farklar görülmüştür. Enzim aktivitelerinde gözlenen azalmalar doğrudan NP etkisi ile olabildiği gibi tuzluluk ile de ilişkili olabilir. Diğer yandan, ATPaz aktivitelerindeki artışlar da telafi mekanizmalarının devreye girmesi veya enzimlerin "turn over" kapasitelerinin artışı ile meydana gelmiş olabilir. Diğer yandan tuzluluk artışının da enzim aktivitelerini artırabileceği düşünülmektedir. Balıklarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin farklı deney süreçlerinde artışlarının da görülebileceği ve ayrıca su kirleticilerinin ATPaz aktivitelerindeki değişimleri tetikleyebileceği De La Torre ve ark (2007) tarafından da belirtilmiştir. Araştırıcılar (De La Torre ve ark.,2007), ATPaz tepkilerinin birçok faktörün etkisinde olabileceğini belirtirken, bunda esas unsurun kirletici yoğunluğuna, epitel hücreleri tarafından yapılan taşınmanın çeşitli nedenlerle bozulmasına ve endokrin sistemin dolaylı bir şekilde etkilenmesine bağlı olabileceğini vurgulamışlardır. Bu nedenle, ATPaz grubu enzimlerin çeşitli kirleticilerin etkilerine karşı verdikleri tepkinin balıkların yaşadığı stresin vurgulanmasında ve ozmotik dengenin durumunun belirlenmesinde çok önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın, Ca^{+2}-ATPaz'ın ve Mg^{+2}-ATPaz'ın hem tuzluluk hem de NP etkilerinin belirlenmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini gösterirken, ayrıca enzim aktivitelerinin değerlendirilmesinde NP derişimi, etkilenme süresi ve ortamın tuzluluk derişiminin de çok önemli olduğunu göstermiştir. Böylece, bu çalışma ile NP ve/veya tuzluluk artışının tatlısu balıklarının ATPaz grubu enzimlerin aktivitelerinde ortaya çıkan değişimlerin anlaşılması ve olası mekanizmaların değerlendirilmesi yapılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. *O. niloticus* farklı tuzluluk (0, 10 ppt) derişimlerindeki sularda Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerinin etkilerine akut (10 mg/L, 2 gün) ve kronik (1 mg/L, 20 gün) olarak maruz bırakılmıştır. Deneyler sonunda balıkların kas ve solungaç dokularında alüminyum ve titanyum birikimleri ile solungaç ve bağırsak dokularında Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür.
2. Hem akut hem de kronik deneyler süresince hiçbir koşulda balıklarda hiçbir mortalite gözlenmemiştir.
3. Veriler nanopartiküllerin yüksek ve düşük tuz derişimlerinde dokularda birikmekle beraber, en yüksek birikimin solungaç dokusunda olduğunu göstermiştir.
4. Tuzluluk artışı akut süreçlerde nanopartikül birikimini arttırırken, kronik süreçlerde azaltmıştır. Bağırsakta ATPaz aktivitelerinde hiçbir koşul altında anlamlı bir değişim görülmezken, solungaçta ATP aktivitelerinde anlamlı değişimler görülmüştür.
5. Solungaç dokusunda, yüksek tuzluluk derişiminde kontrol balıklarının ATPaz aktivitelerinde anlamlı azalmalar olmuştur. Benzer şekilde, tuz+nanopartikül etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktiviteleri tuz kontrolü aktivitesine göre daha düşük bulunmuştur.
6. Diğer yandan, tuz+nanopartikül etkisinde kalan balıklarda ATPaz aktiviteleri tek başına nanopartikül etkisinde kalan balıklardaki aktivitelere göre daha düşük olmuştur.
7. Kas ATPaz aktivitelerinde tuzluluk ve/veya NP etkisi ile anlamlı bir değişim görülmemiştir.
8. Balık dokularında toplam protein düzeylerinde ne tuzluluk artışı ile ne de NP etkisi ile anlamlı bir değişim görülmemiştir.

5.2. Öneriler

1. Bu çalışma tuzluluk ve/veya NP etkisinin balıkların ATPaz grubu enzimleri üzerinde olan etkileri solungaç ve kas dokusunda incelenerek NP birikimine bağlı olarak farklı tuzluluk değerleri olan sularda balıkların ozmoregülasyon sistemin verdiği tepkiler araştırılmıştır. Metal alınımını ve toksisitesini etkileyen birçok faktör (sıcaklık, sertlik, tuzluluk, pH, organik madde miktarı v.b.) bulunmaktadır. Sudan NP alınımı ve

toksistesi de farklı ortam koşullarında test edilerek NP tokistesini etkileyen diğer fiziksel ve kimyasal koşulların etkileri belirlenebilir.

2. Ekolojik gereksinimleri farklı olan farklı tür balıklarla benzer deneyler yapılarak balık biyolojisinin NP toksisitesindeki önemi belirlenebilir. Böylece balık türleri arasında toksik mekanizmalarının duyarlığı ve dirençliği karşılaştırmalı olarak yapılarak biyobelirteç olma potansiyelleri değerlendirilebilir.
3. ATPaz grubu enzimler dışında enzimatik veya enzimatik olmayan başka moleküllerin davranışları incelenerek bunların biyobelirteç olma potansiyelleri değerlendirilebilir.
4. Her ne kadar, doğal ortamlara NP salınması son yıllarda başlamış olsa da NP'lerin doğal sucul ortamlardaki varlıkları araştırılabilir.

KAYNAKLAR

Abdel-Khalek, A.A., Badran, S.R., Marie, M.A.S., 2020. The effective adsorbent capacity of rice husk to iron and aluminum oxides nanoparticles using *Oreochromis niloticus* as a bioindicator: biochemical and oxidative stress biomarkers. Environmental Science and Pollution Research 27: 23159-23171.

Ateş, M., Demir, V., Adiguzel, R., Arslan, Z., 2013. Bioaccumulation, subacute toxicity, and tissue distribution of engineered titanium dioxide nanoparticles in goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Nanomaterials. Article ID 460518, 6 p

Atkınson, A., Gatemby, A.O., and Lowe, A.G., 1973. The Determination of Inorganic Ortophosphate in Biological Systems. Biochimica Et Biophysical Acta, 320: 195–204.

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

Atlı, G., and Canli, M., 2011. Alterations in ion levels of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures to five heavy metals. *Turkish Journal of Zoology, 35*(5), 725-736.

Atli, G., and Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, *145*(2), 282-287.

Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., and Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag+, Cd2+, Cr6+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 143(*2), 218-224.

Banan, A., Kalbassi, M.R., Bahmani, M., Sotoudeh, E., Johari S.A., Ali, J.M., Kolok, A.S., 2020. Salinity modulates biochemical and histopathological changes caused by silver nanoparticles in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Environmental Science and Pollution Research 27: 10658–10671.

Baykan, U., Atli, G., and Canli, M., 2007. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23(1),* 33-38.

Baysoy, E., Atli, G., Gürler, C. Ö., Dogan, Z., Eroglu, A., Kocalar, K., and Canli, M., 2012. The effects of increased freshwater salinity in the biodisponibility of metals (Cr, Pb) and effects on antioxidant systems of *Oreochromis niloticus. Ecotoxicology and Environmental Safety, 84,* 249-253.

Baysoy, E., Atli, G., Canli, M., 2013. The effects of salinity and salinity+ metal (chromium and lead) exposure on ATPase activity in the gill and intestine of tilapia *Oreochromis niloticus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 64: 291-300.

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(2), 131-139.

Canli, E. G., and Canli, M., 2015. Low water conductivity increases the effects of copper on the serum parameters in fish (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, *39*(2), 606-613.

Canli, E. G., and Canli, M., 2019. Nanoparticles (Al2O3, CuO, TiO2) decrease ATPase activity in the osmoregulatory organs of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*); histopathological investigations of tissues by transmission electron microscope. Histopathological Investigations of Tissues by Transmission Electron Microscope (July 20, 2019).

Canli, E. G., and Canli, M., 2020a. Effects of aluminum, copper and titanium nanoparticles on the liver antioxidant enzymes of the Nile fish (*Oreochromis niloticus*). Energy Reports, 6, 62-67.

Canli, E. G., and Canli, M., 2020b. Investigations of the nervous system biomarkers in the brain and muscle of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following accumulation of nanoparticles in the tissues. Turkish Journal of Zoology, 44(2), 90-103.

Canli, E. G., and Canli, M., 2021. Characterization of ATPases in the gill of freshwater mussel (*Unio tigridis*) and effects of ionic and nanoparticle forms of aluminium and copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 247, 109059.

Canli, E. G., Atli, G., and Canli, M., 2016. Responses of the antioxidant and osmoregulation systems of fish erythrocyte following copper exposures in differing calcium levels. Bulletin of E*nvironmental* C*ontamination* and T*oxicology*, 97(5), 601-608.

Canli, E. G., Dogan, A., and Canli, M., 2018. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al2O3, CuO, TiO2) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 62, 181-187.

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*(1), 129-136.

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*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 31(4), 494-501.

Canli, M., Ay, Ö., and Kalay, M., 1998. Levels of Heavy Metals (Cd, Pb, Cu, Cr and Ni) in Tissue of *Cyprinus carpio*, *Barbus capito* and *Chondrostoma regium* from the Seyhan River, Turkey. *Turkish Journal of Zoology, 22*(2), 149-158.

Canli, M., Kalay, M., and Ay, Ö., 2001. Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Cr, Ni) concentrations in tissues of a fish *Sardina pilchardus* and a prawn *Peaenus japonicus* from three stations on the Mediterranean Sea. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, *67*(1), 75-82.

Canli, E.G., Dogan, A., Canli, M., 2018. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al_2O_3, CuO, TiO_2) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology and Pharmacology 62:181-187.

Canli, E.G., Canli, M., 2019. Nanoparticles (Al_2O_3, CuO, TiO_2) decrease ATPase activity in the osmoregulatory organs of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*); histopathological investigations of tissues by transmission electron microscope. EC Pharmacology and Toxicology 7: 909-924.

Canli, E.G., Canli, M., 2020a. Investigations of the nervous system biomarkers in the brain and muscle of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following accumulation of nanoparticles in the tissues**.** Turkish Journal of Zoology 44: 90-103.

Canli, E.G., Canli, M., 2020b. Effects of aluminum, copper and titanium nanoparticles on the liver antioxidant enzymes of the Nile fish (*Oreochromis niloticus*). Energy Reports *6:* 62-67.

Canli, E.G., 2021. Individual and Combined effects of salinity and nanoparticles (Al_2O_3, TiO_2) on the activity of antioxidant enzymes in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 21(8): 415-424.

Cioni, C., De Merich, D., Cataldi, E., and Cataudella, S., 1991. Fine structure of chloride cells in freshwater-and seawater-adapted *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Oreochromis mossambicus* (Peters). Journal of Fish Biology 39(2), 197-209.

Cooper, D., and Dimri, M., 2021. Biochemistry, Calcium Channels. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

De La Torre, F.R., Salıbıan, A., and Ferrarı, L.,, 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. Chemosphere, 68: 1582-1590.

Dogan, A., Canli, M., 2019. Investigations on the osmoregulation system of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to mercury in differing salinities. Turkish Journal Of Fisheries and Aquatic Sciences 19(12): 1061-1068.

Dogan, Z., Eroglu, A., Kanak, E. G., Atli, G., and Canli, M., 2014. Response of antioxidant system of tilapia (*Oreochromis niloticus*) following exposure to chromium and copper in differing hardness. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 92(6), 680-686.

Elbeshti, R. T. A., Elderwish, N. M., Abdelali, K. M. K., and Tastan, Y., 2018. Effects of heavy metals on fish. Menba J Fish Fac [Internet], 4(1), 36-47.

Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G., and Canli, M., 2015. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. Environmental Science and Pollution Research, 22(5), 3229-3237.

Ersoy, Z., Abril, M., Cañedo-Argüelles, M., Espinosa, C., Vendrell-Puigmitja, L., and Proia, L., 2022. Experimental assessment of salinization effects on freshwater zooplankton communities and their trophic interactions under eutrophic conditions. Environmental Pollution, 313, 120127.

FAO, 2003. Inland Water Resources, & Aquaculture Service. Review of the State of World Aquaculture (No. 886).

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

Glynn, I. M., and Karlish, S., 1975. The sodium pump. Annual Review of Physiology,37(1), 13-55.

Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S., 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. Toxicological Sciences 107(2): 404-415.

Güner, Y., Özden, O., Çağırgan, H., Altunok, M., and Kızak, 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.

Handayani, K.S., Irawan, B., Soegianto, A., 2020. Short-term mercury exposure in tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different salinities: impact on serum osmoregulation, hematological parameters, and Na^+/K^+-ATPase level. Heliyon, 6(7), e04404.

Heath, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology (2nd ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780203718896

Jang, M. H., Kim, W. K., Lee, S. K., Henry, T. B., and Park, J. W., 2014. Uptake, tissue distribution, and depuration of total silver in common carp (*Cyprinus carpio*) after aqueous exposure to silver nanoparticles. Environmental Science & Technology, 48(19), 11568-11574.

Joo, H.S., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J. H., Johari, S.A., 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. Aquatic Toxicology 140: 398-406.

Joo, H.S., Kalbassi, M.R., Johari, S.A., 2018. Hematological and histopathological effects of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)—how about increase of salinity? Environmental Science and Pollution Research 25(16): 15449-15461.

Kalay, M., Ay, Ö., and Canli, M., 1999. Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63(5), 673-681.

Kamal, A.H.M.M., Mair., G.C., 2005. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. Aquaculture 247: 189-201.

Karayakar, F., Işık, U., Cicik, B., and Canli, M., 2022a. Heavy metal levels in economically important fish species sold by fishermen in Karatas (Adana/TURKEY). Journal of Food Composition and Analysis, *106*, 104348.

Karayakar, F., Yurt, Ö., Cicik, B., and Canli, M., 2022b. Accumulation and Elimination of Cadmium by the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in differing Temperatures and Responses of Oxidative Stress Biomarkers. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 109(6), 1126-1134.

Karul, S.K., Yildirim, A.S., Gamsiz, K., 2013. Effects of salinity on growth and metabolism in blue tilapia (*Oreochromis aureus*). African Journal of Biotechnology 12(19): 2715-2721.

Katsumiti, A., Thorley, A.J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T.D., Cajaraville, M.P., 2018. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. Toxicology in Vitro, 48: 146-158.

Kaushal, S. S., Likens, G. E., Pace, M. L., Reimer, J. E., Maas, C. M., Galella, J. G., ... and Woglo, S. A., 2021. Freshwater salinization syndrome: From emerging global problem to managing risks. Biogeochemistry, 154(2), 255-292.

Khan, I., Saeed, K., and Khan, I., 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908-931.

Kulac, B., Atli, G., Canli, M., 2012. Investigations on the ATPase activities and cadmium uptake in freshwater fish *Oreochromis niloticus* following exposures to cadmium in increased salinity. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 12(4): 861-869.

Kulac, B., Atli, G., and Canli, M. 2013. Response of ATPases in the osmoregulatory tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus* exposed to copper in increased salinity. Fish physiology and biochemistry, 39(2), 391-401.

Lodish, H. F., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J., 2003. Molecular Cell Biology (Vol. 5). New York: WH Freeman and company.

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.

Mansouri, B., Maleki, A., Johari, S. A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E., Shahsavari, S., and Davari, B., 2016. Copper bioaccumulation and depuration in common carp (*Cyprinus carpio*) following co-exposure to TiO2 and CuO nanoparticles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 71(4), 541-552.

Nishi, T., and Forgac, M., 2002. The vacuolar (H+)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. Nature reviews Molecular cell biology, 3(2), 94-103.

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

Osborne, O.J., Lin, S., Chang, C.H., Ji, Z., Yu, X., Wang, X., Lin, S., Xia, T., Nel, A.E., 2015. Organ-specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebra fish. Acs Nano 9: 9573-9584.

Öner, M., Atli, G., and Canli, M., 2008. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 27(2), 360-366.

Pepe, N., Canli, E. G., and Canli, M., 2022. Salinity and/or nanoparticles (Al2O3, TiO2) affect metal accumulation and ATPase activity in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 94, 103931.

Pérez-López, A., Núñez-Nogueira, G., Álvarez-González, C.A., De la Rosa-García, S., Uribe-López, M., Quintana, P., Peña-Marín, E.S., 2020. Effect of salinity on zinc toxicity ($ZnCl_2$ and ZnO nanomaterials) in the mosquitofish (*Gambusia sexradiata*). Environmental Science and Pollution Research 27: 22441–22450.

Pivovarov, A. S., Calahorro, F., and Walker, R. J., 2019. Na+/K+-pump and neurotransmitter membrane receptors. Invertebrate Neuroscience, 19(1), 1-16.

Priya, K.K., Ramesh, M., Saravanan, M., Ponpandian, N., 2015. Ecological risk assessment of silicon dioxide nanoparticles in a freshwater fish *Labeo rohita*: Hematology, ionoregulation and gill Na^+/K^+ ATPase activity. Ecotoxicology and Environmental Safety 120: 295-302.

Ray, P. C., Yu, H., and Fu, P. P., 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. Journal of Environmental Science and Health Part C, 27(1), 1-35.

Riba, I., Delvalls, T. Á., Forja, J. M., and Gómez-Parra, A., 2004. The influence of pH and salinity on the toxicity of heavy metals in sediment to the estuarine clam *Ruditapes philippinarum*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 23(5), 1100-1107.

Rude, R. K., 1993. Magnesium metabolism and deficiency. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 22(2), 377-395.

Saglam, D., Atli, G., and Canli, M., 2013. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. Ecotoxicology and Environmental Safety, 92, 79-86.

Saoud, P. , Sawsan K., Antoine C., Mazen F., 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na^+–K^+–ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus.* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 348(1-2), 183-190.

Smyth, K., and Elliott, M., 2016. Effects of changing salinity on the ecology of the marine environment. Stressors in the marine environment: physiological and ecological responses; societal implications, 161-174. Oxford University Press Oxford, UK.

Vaz, P. G., Kebreab, E., Hung, S. S., Fadel, J. G., Lee, S., and Fangue, N. A., 2015. Impact of nutrition and salinity changes on biological performances of green and white sturgeon. PLoS One, 10(4), e0122029.

Villarreal, F.D., Das, G.K., Abid, A., Kennedy, I.M., Kültz, D., 2014. Sublethal effects of CuO nanoparticles on Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity. PLoS One 9(2): e88723.

Wang, D.G., Guo, D.D., Bi, H.S., Wu, Q.X., Tian, Q.M., Du, Y.X., 2013. Zinc oxide nanoparticles inhibit Ca2+-ATPase expression in human lens epithelial cells under UVB irradiation. Toxicol in Vitro 27: 2117-2126.

Wang, J., Wang, W.X., 2014. Salinity influences on the uptake of silver nanoparticles and silver nitrate by marine medaka (*Oryzias melastigma*). Environmental Toxicology and Chemistry 33(3): 632-640.

Wood C. M., Farrel A. P., Brauner C. J., 2012a. Fish physiology: homeostasis and toxicology of essential metals, vol, 31 A. Academic Press, London, p 497

Wood C. M., Farrel A. P., Brauner C. J., 2012b. Fish physiology: homeostasis and toxicology of essential metals, vol 31 B. Academic Press, London, p 507

Zhang, Y., Zhu, L., Zhou, Y., and Chen, J., 2015. Accumulation and elimination of iron oxide nanomaterials in zebrafish (*Danio rerio*) upon chronic aqueous exposure. Journal of Environmental Sciences, 30, 223-230.

Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., and Dobrovolskaia, M. A., 2010. Mini review: nanoparticles and the immune system. Endocrinology, 151(2), 458-465.

ÖZGEÇMİŞ

Nagihan PEPE. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Osmaniye'de tamamladı. 2003 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve bu bölümden 2009 yılında mezun oldu. 2020 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.