ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alper DOĞAN

FARKLI TUZLULUK DÜZEYLERİNE SAHİP SULARDA CİVA ETKİSİNDE KALAN BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus*) OZMOREGÜLASYON SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2016

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI TUZLULUK DÜZEYİNE SAHİP SULARDA CİVA ETKİSİNDE KALAN BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus*) OZMOREGÜLASYON SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Alper DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 16/12/2016 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....	.....	……
Prof. Dr. Mustafa CANLI	Doç. Dr. Mustafa COŞKUN	Doç.Dr.Gülüzar ATLI
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2015-3875

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI TUZLULUK DÜZEYİNE SAHİP SULARDA CİVA ETKİSİNDE KALAN BALIKLARIN (*Oreochromis niloticus*) OZMOREGÜLASYON SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Alper DOĞAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Yıl : 2016, Sayfa: 57
Jüri : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Doç. Dr. Mustafa COŞKUN
: Doç. Dr. Gülüzar ATLI

Bu çalışmada, tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* farklı tuzluluk (0, 1, 10 ppt) derişimlerindeki sularda civa etkisine akut (0,3 µM Hg^{+2}, 3 gün) ve kronik (0,03 µM Hg^{+2}, 30 gün) olarak maruz bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda balıklarda solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür. Civa ve tuzluluğun ayrı ayrı ve birlikteki etkisinde balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür.

Buna göre, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri kronik düzeyde, Hg ve tuzluluğun ayrı ayrı ve birlikteki etkileri ile doku tipine bağlı olarak genellikle artış göstermiştir. Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreçte birbirine zıt tepkiler vermiştir.

Anahtar Kelimeler: Civa, Tuzluluk, Etkileşim, *Oreochromis niloticus*, ATPaz

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF OSMOREGULATION SYSTEM of FRESHWATER FISH *Oreochromis niloticus* EXPOSED to Hg in DIFFERING SALINITIES

Alper DOĞAN

DEPARTMENT of BIOLOGY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa CANLI
Year : 2016, Page: 57
Jury : Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Doç.Dr. Mustafa COŞKUN
: Doç.Dr. Gülüzar ATLI

In this study, freshwater fish *Oreochromis niloticus* were exposed to Hg^{2+} in differing salinities (0, 1, 10ppt) for acute (0,3 µM Hg^{2+}, 3 days) and chronic (0,03 µM Hg^{2+}, 30 days) exposure protocols. Following the exposures the activity of Na^{+}/K^{+}-ATPase, Mg^{2+}-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in the gill and Ca^{2+}-ATPase muscle of *O. niloticus* were measured. There were some significant alterations in ATPase activities in gill and muscle tissues of fish exposed to metals as single or combination with salinity.

According to data, Mg^{2+}-ATPase and Ca^{2+}-ATPase activities generally increased in chronic exposures, depending upon individual and combination effects of salinity and Hg^{2+}. Na^{+}/K^{+}-ATPase activity showed opposite reactions in acute and chronic durations.

Keywords: Mercury, Salinity, Interaction, *Oreochromis niloticus*, ATPase

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çeşitli antropojenik aktiviteler yoluyla çevreye salınan civa (Hg^{+2}) bölgesel olduğu kadar küresel olarak da birçok zararlı etkiler göstermektedir. Hg^{+2} özellikle ATPazlar gibi bazı ozmoregülatör enzimlere etki etmektedir (Verma ve ark, 1983). Su yoluyla Hg^{+2} etkisinde kalan balıkların solungaç dokusu ve ozmoregülasyondan sorumlu klorit hücrelerinin yapısı oldukça zarar görmekte ve bu hücrelerin sayısı azalmaktadır (Giari ve ark, 2008). Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri membrana bağlı, hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan ve toksisiteye duyarlı biyobelirteç olarak kullanılabilen bir grup enzimdir. Dokulardaki iyon hareketleri, ozmotik basınç, membran geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimlerinin, yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine duyarlı olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark, 1996; Atlı ve Canlı, 2011). İyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar, Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz'dır. Bu enzim aktivitelerinin Cr^{+6}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller tarafından etkilendiği belirtilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978, Watson ve Beamish, 1980; Atlı ve Canlı, 2008, 2011).

Bu çalışmada, tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* farklı tuzluluk (0, 1, 10 ppt) derişimine sahip sularda civa etkisine akut (0,3 µM Hg, 3 gün) ve kronik (0,03 µM Hg, 30 gün) olarak maruz bırakılmıştır. Bu çalışma ile *O. niloticus'*un solungaç ve bağırsak ATPaz aktivitelerinin ölçülerek, sucul ortamlarda Hg^{+2} toksisitesine tuzluluğun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Deney süreleri sonunda, balıklarda solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür. Balıklar deney koşullarında 30 gün yaşarken sadece 0 ppt tuzluluktaki 0,03 µM Hg^{+2} etkisinde bir adet ölüm gözlenmiştir.

Civa ve tuzluluğun ayrı ayrı ve birlikteki etkisinde, balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür.

Buna göre Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri metal ve tuzluluğun ayrı ayrı ve birlikteki etkileri ile etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle artış yönünde bir değişim gösterirken, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreçte birbirine zıt tepkiler vermiştir. Balıkların doku protein düzeylerinde ise genel olarak bir değişim görülmemiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, enzim aktivite düzeylerinin farklı tuzluluk, civa derişimi, etki süresi ve doku tipine göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. ATPaz aktivitelerinde ortam koşulları ve etki süresine bağlı olarak artış ya da azalışlar gözlenmiştir. Sadece tuzluluk etkisinde eğilim artış yönünde, tuzluluk ve metal etkisinde azalış yönünde olmuştur. Yapılan çalışmalar günümüzde artan çevresel kirlilik sonucu metallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde, iyon taşınması, hücresel sıvı hacminin düzenlenmesi, zar potansiyelinin korunması gibi kilit öneme sahip ATPaz enzimlerinin biyolojik belirteçler olarak büyük öneme sahip olduklarını vurgulamaktadırlar (Watson ve Beamish, 1981; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007).

Bu çalışmada; farklı tuzluluk düzeyine sahip sularda tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*' un organlarında, Hg^{+2}'nin ATPaz aktiviteleri üzerine olan etkileri akut ve kronik deney protokolleri ile incelenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

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

Bu süre içerisinde yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Ali EROĞLU ve Zehra DOĞAN' a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan babam Saffet DOĞAN, sevgili annem Nil DOĞAN ve maneviyatıyla yanımda olan kardeşim Sarper DOĞAN' a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜRLER ..... …V
İÇİNDEKİLER VI
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
1.1. Civa 2
1.2. Aktif Transport 3
1.3. ATPaz Enzimleri 4
1.4. Tuzluluk 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 11
3. MATERYAL VE YÖNTEM. 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 15
3.1.1.1. Metaller ve Asitler 15
3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar 15
3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar 15
3.1.2. Kullanılan Ekipmanlar 16
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı 18
3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü 18
3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini 19
3.2.4. Total Protein Analizi 21
3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması 24

3.2.6. İstatistik 24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 25
4.1. Bulgular 25
4.1.1. ATPaz Aktivitesi 25
4.1.1.1. *O.niloticus*'lar İçin Akut Süreçteki Deneyler 25
4.1.1.1.(1). Kas Ca^{+2} ATPaz Aktivitesi 26
4.1.1.1.(2). Solungaç Ca^{+2} ATPaz Aktivitesi 27
4.1.1.1.(3). Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz Aktivitesi 28
4.1.1.1.(4). Solungaç Mg^{+2}-ATPaz Aktivitesi 29
4.1.1.2. *O.niloticus*'lar İçin Akut Süreçteki Deneyler 29
4.1.1.2.(1). Kas Ca^{+2} ATPaz Aktivitesi 30
4.1.1.2.(2). Solungaç Ca^{+2} ATPaz Aktivitesi 31
4.1.1.2.(3). Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz Aktivitesi 32
4.1.1.2.(4). Solungaç Mg^{+2}-ATPaz Aktivitesi 33
4.2. Tartışma… 33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 43
5.1. Sonuçlar 43
5.2. Öneriler… 44
KAYNAKLAR… 45
ÖZGEÇMİŞ 57

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art. Ort. ± S.D. N=9)..... 17
Çizelge 3.2. Akvaryum sularının tuzluluk derişimleri..... 17
Çizelge 3.3. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri 19
Çizelge 4.1. Akut kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (µmol Pi/mg prot./sa.)..... .26
Çizelge 4.2. Kronik kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (µmol Pi/mg prot./sa.)..... 30
Çizelge 4.3. Civa ve tuzluluk etkilerinde sularda *Oreochromis niloticus* dokularındaki ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri..... 41

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Na^{+}/K^{+}-ATPaz' ın yapı ve karakteristikleri 5

Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.....21

Şekil 3.2. Sığır albümininden hazırlanan standart derişimler ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki 23

Şekil 4.1. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi. 26

Şekil 4.2. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 27

Şekil 4.3. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi.....28

Şekil 4.4. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 29

Şekil 4.5. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 30

Şekil 4.6. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 31

Şekil 4.7. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi.....32

Şekil 4.8. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Hg^{+2} **:** Civa

Na^{+} **:** Sodyum

K^{+} **:** Potasyum

Mg^{+2} **:** Magnezyum

Ca^{+2} **:** Kalsiyum

ATPaz **:** Adenozin trifosfataz

µg **:** Mikro gram

$HgCI_2$ **:** Civa klorür

NaCl **:** Sodyum klorür

ml **:** Mililitre

°C **:** Santigrat derece

ppt **:** g çözünen / kg veya litre çözelti

µM **:** Mikro molar

g **:** Gram

µmol **:** Mikro/mol

Pi **:** İnorganik fosfat

mg **:** Miligram

sa **:** Saat

1. GİRİŞ

Son zamanlardaki hızlı nüfus artışı, enerji ve besin yetersizliği, düzensiz kentleşme, insanların aşırı tüketim isteği ve baş döndürücü bir hızla gelişen teknolojik ilerlemeler, çevre kirliliği sorununun önemini iyice hissettirir hale gelmesine neden olmuştur. Bu kirliliği artıran ve ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan faktörlerin başında, atık sularında ağır metal içeren endüstri kuruluşları gelmektedir. Bu kuruluşlar, işlem süreçleri gereği çeşitli ağır metalleri kullanmakta ve civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını atıklarında bulundurmaktadır (Cihangir ve Sağlam, 1997). Yeryüzü sularındaki aşırı kirlilik, içme sularıyla ya da kontamine olmuş balıkların tüketilmesiyle insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır (Silbergeld ve ark, 2005; Dorea, 2006; Verger ve ark, 2007).

Ağır metaller balık biyokimyasında ve fizyolojisinde önemli değişimlere neden olmakta ve onların işleyiş mekanizmalarını bozabilmektedir (Atlı ve Canlı, 2007, 2011). Normal koşullarda ağır metallerin doğal sucul ortamlardaki oranı düşüktür. Doğal ortamdaki konsantrasyon oranı arttığında, gümüş, civa bakır, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller özellikle organizmalar üzerinde toksik etki yapmakta ve enzimler dahil birçok metabolik sistemi etkilemektedir. Vücuda alınan metallerin toksik etkileri, depolama ve detoksifikasyon mekanizmalarının alınan metallerin zararlı etkilerini telafi edemedikleri durumlarda ortaya çıkmaktadır. Metallerin toksik etkileri iki genel kategoriye ayrılabilmektedir. Akut toksisite (kısa sürede yüksek doz) genellikle letal, kronik toksisite ise (uzun sürede düşük doz) letal ya da subletal olabilmektedir (Heath, 1987). Metallerin toksik etkilerinin derecesi metalin tipine, kimyasalın etki zamanına (Ezemonye ve ark, 2008), suyun sertliğine, alkalinitesine ve pH'sına (Carvalho ve Fernandes, 2006), organik karbon miktarına, yükseltgenme-indirgenme durumuna (Gillis ve ark, 2008) ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir.

Metallerin sudaki derişimleri, etki süreleri, tuzluluk, sıcaklık, pH ve sertlik gibi çevresel faktörler aynı zamanda dokulardaki metal birikiminde de etkin bir rol oynamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark, 2007; Atlı ve Canlı, 2008).

Doğal ortamlarında ve laboratuar koşullarında metallerin etkilerine maruz bırakılmış olan balıklarda çeşitli enzimatik yanıtlar araştırılmıştır. Bu enzimatik yanıtlar; doza, türe ve maruz kalma süresine göre aktiviteler de artış ve azalış şeklinde olabilmektedir (Canlı ve Atlı, 2003; Atlı ve Canlı, 2008).

1.1. Civa

Balıklarda su kaynaklı akut $HgCl_2$ toksisitesi yaklaşık 1950'lerden beri çalışılmaktadır (Doudoroff ve Katz, 1953). Katı atık yakımı ve fosil yakıtların kullanılmasıyla atmosferik konsantrasyonu artış gösteren civa (Hg^{+2}) bölgesel olduğu kadar küresel de birçok zararlı etki göstermektedir. Potansiyel bir nörotoksik olan inorganik Hg^{+2} balıklarda denge kaybı, hareketsizlik, solunum bozukluğu ve hatta yüksek konsantrasyonlarda (24-96 saatlik) ölüme bile yol açabilmektedir (Wobeser, 1975). Hg^{+2}'nin nörotoksisitesi muhtemelen asetilkolinasteraz aktivitesini baskılamasından kaynaklanmaktadır; örneğin 2 gün boyunca 180 µg L^{-1} Hg^{+2} etkisine maruz kalan balıkların beyin, solungaç ve karaciğer dokularında enzim düzeylerinde azalma gözlenmiştir (Gill ve ark, 1990). Ancak uyuşukluk gibi bazı akut etkiler balıkların temiz suya geçmesiyle düzelmiştir (Wobeser, 1975).

Hg^{+2} özellikle klorit hücrelerinin yapısında bulunan ATPaz grubu enzimlere de etki etmektedir (Verma ve ark, 1983). Su yoluyla Hg^{+2} etkisinde kalan balıkların solungaç dokusunun ve ozmoregülasyondan sorumlu klorit hücrelerinin yapısı oldukça zarar görmekte ve bu hücrelerin sayısında azalmalar görülmektedir (Giari ve ark, 2008). Balıkların iyon dengesi ve ozmoregülasyonu için anahtar organ olarak bilinen solungaçta metal birikimine bağlı olarak Na^+/K^+-ATPaz

aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkili ozmoregülatör sistemde hasarlar meydana gelmektedir. Tatlı su ve deniz balıklarında Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonu ile bağlantılı ozmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller olarak Cu^{+2}, Ag^{+}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2} sayılabilir (Bianchini ve ark, 2004,2005; Atlı, 2009).

Hem aerobik, hem de anaerobik metabolizmada yer alan enzim ve substratlar Hg^{+2} tarafından etkilenmektedir. Akut civa etkisinde karaciğer, solungaç ve böbrek asit fosfataz aktivitesi inhibe olurken, yumurtalıklarda aktivite artışı görülmüştür (Gill ve ark, 1990). Letal ve subletal konsantrasyonlarda Hg^{+2}'ye maruz kalan balıklarda plazma iyon düzeyleri artmaktadır. Bunun en muhtemel nedeni olarak Hg^{+2} etkisiyle zarar gören karaciğerin iyon dengeleme yeteneğinin azalması gösterilmiştir. Hilmy ve ark (1988), çalışmalarında 4-7 gün boyunca kedibalıklarını (*Clarias lazera*) 100, 200 ve 400 µg L^{-1} Hg^{+2}'ye maruz bıraktıklarında Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} plazma iyonlarının konsantrasyonlarının arttığını gözlemlemişlerdir.

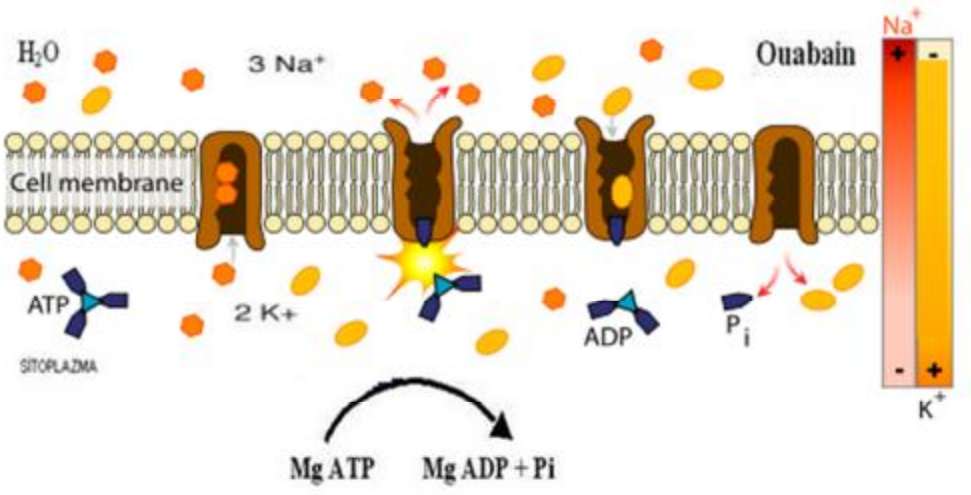
1.2. Aktif Transport

Aktif transport, küçük moleküllerin termodinamik dengeden uzağa yani derişim veya elektrokimyasal gradientin zıt yönünde taşınmaları açısından difüzyondan farklıdır; bundan dolayı enerji gerektirir. Elektrokimyasal gradient bir zarın iki yanında kimyasal derişim ve elektriksel potansiyel farklılığıdır. Aktif transport ile biyolojik sistemlerde elektrokimyasal gradientlerin devamlılığı sağlanır. Aktif taşımada da taşıyıcı proteinler kullanılır. Proteinlerde, taşınan maddeye özgün kabul bölgeleri vardır. Bu bölgelere bağlanan molekül veya iyon hem enerji kullanımı ile hem de taşıyıcı proteindeki şekilsel değişimi ile zardan geçer. Sitoplazma zarının her iki tarafında ATP enerjisi ile iyon gradiyenti oluşturan iyon pompalarıdır. Aktif transport için gereken enerji, ATP'nin hidrolizinden, elektron hareketinden veya ışıktan sağlanabilir. ATP'nin hidrolizi ile gerçekleşen iyon taşınmasından sorumlu 3 enzim sistemi (iyon pompası) vardır.

Hayvansal hücrelerde ATP enerjisinin %30-35'i burada harcanmaktadır. Hücrenin içi ve dışı arasında iyon gradientlerini düzenleyen membrana bağımlı $Na^{+/}K^{+}$-ATPaz pompası, her ATP molekülünün ADP'ye hidrolizi sırasında 3 Na^{+} iyonunun hücre içinden dışarıya ve 2 K^{+} iyonunun dışarıdan hücre içine hareketini sağlar.

1.3. ATPaz Enzimleri

Adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda iyon pompası olarak önemli rol oynayan membrana bağlı bir enzim grubudur. Membrana bağlı enzimler olan ve dokulardaki iyon hareketleri, ozmotik basınç, membran geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimlerinin yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine hassas olduğu belirtilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark, 1996; Atlı ve Canlı, 2011). ATPaz'ların tuzluluk, sıcaklık gibi çeşitli faktörler tarafından da etkilendiği gösterilmiştir (Diaz ve ark, 1998). ATPaz'ların çevresel kirleticiler tarafından etkilenmeleri onların iyonik ve ozmoregülatör sistemlerdeki bozukluklar için "erken uyarı sistemi" olarak kullanılabilmelerine olanak vermektedir (Stagg ve ark, 1992; Sancho ve ark, 2003). Ozmoregülasyon, dış ortamın ozmolaritesine (tuzluluk) rağmen hücre dışı sıvılardaki ozmotik derişimlerin aktif olarak düzenlenmesidir ve su ortamındaki canlılar için gerekli bir fizyolojik adaptasyondur. Ozmoregülasyonda önemli görevi olan ATPazlar, solungaç ve bağırsak gibi tuz taşınmasının gerçekleştiği dokularda yüksek düzeylerde bulunmaktadır ve transepitelyal tuz hareketleri için gerekli iyonik ve elektriksel gradienti düzenlemektedir (McGeer ve Wood 1998).



Şekil 1.1. Na^+/K^+-ATPaz'ın yapı ve karakteristikleri (http://proteopedia.org/wiki/index.php/Ouabain)'den

Na^+/K^+-ATPaz enzimi, hücre içi 3 Na^+'yı hücre dışı 2 K^+ ile değiştirir. Bu ATP bağımlı elektriksel değişim, hücre içini polarize ederek apikal membrandan Na^+ girişi için elektrokimyasal gradient oluşturur. Na^+/K^+-ATPaz enziminin kemikli balıkların solungaç epitellerinde çoğunlukla mitokondrice zengin hücrelerde yer aldığı gösterilmiştir. Na^+/K^+-ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup heterodimerik integral membran proteinidir. Enzim 100 kDa moleküler ağırlığındaki α alt ünitesi ile 60 kDa moleküler ağırlığındaki glikozitlenmiş β alt ünitesinden oluşmaktadır. Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+-ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. İyon akışının düzenlenmesi, iyonik ve ozmotik homeoztazisin dengelenmesi ile ilişkilidir. İyon dengesinin korunması için gerekli olan ve ATP tarafından sağlanan enerjiye gereksinim duyan Na^+/K^+-ATPaz, balıkların ozmoregülatör dokuları olan solungaç, böbrek ve bağırsak epitelinde anahtar rolü üstlenen önemli bir enzimdir. Hücrede veya hücre ile hücre dışı ortam arasında iyon taşınımı ve elektrokimyasal gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere sahiptir. Cu^{+2},

Ag^{+}, Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Hg^{+2}; tatlı su ve deniz balıklarında Na^{+}/K^{+}-ATPaz inhibisyonu ile bağlantılı ozmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller arasındadır (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark, 2004, 2006).

Mg^{+2}-ATPaz enzimi, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2}'nin taşınmasında, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü ve oksidatif fosforilasyonda görev görmektedir (Parvez ve ark, 2006).

Balıkların Ca^{+2}'yi sudan absorbsiyon ile aldıkları ve tatlı su balıklarında genel olarak emilimin bağırsaktan çok epidermal yolla olduğu ve balıkta Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde Ca^{+2}-ATPaz'ın önemli göreve sahip olduğu bilinmektedir.

Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Shephard ve Simkiss, 1978; Wong ve Wong, 2000). Metal varlığında solungaç ATPaz aktiviteleri inhibe olabilmekte veya uyarılabilmektedir (Watson ve Beamish, 1980, Watson ve Benson, 1987; Alves ve Wood, 2006; Atlı ve Canlı, 2008).

Örneğin, Kuhnert ve ark (1976), in vivo Cr^{+6} etkisindeki alabalık ***Salmo gairdneri***'nin solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz'ın aksine Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde inhibisyon gözlemiştir. Buna karşın, alabalığın solungaç dokusunda in vitro Zn^{+2}'nin Mg^{+2}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Watson ve Beamish, 1980). Çoğunlukla klorit hücrelerde bulunan Ca^{+2}-ATPaz'ın inhibisyon bölgesinin Ca^{+2} bağlayan bölge olduğu ve klorit hücrelerin Cd^{+2} toksisitesi için birincil hedef olduğu belirtilmiştir (Flik ve ark, 1985, Verbost ve ark, 1988). Bununla birlikte, ***O. niloticus***'da kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin Cd^{+2}, Zn^{+2} ve Pb^{+2}'nin 14 günlük etkisi sonunda azalış gösterdiği kaydedilmiştir (Atlı ve Canlı, 2007).

Ağır metallerin ATPaz enzimleri üzerine olan etkileri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve

ark, 1996; Atlı and Canlı, 2007). Özellikle bakır, gümüş, kadmiyum, çinko ve civa gibi ağır metallerin teleost balıklarda ATPaz inhibisyonuna neden olarak ozmoregülasyonda bozulmalara neden oldukları görülmüştür (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark, 2006). Na^{+}/K^{+}-ATPaz dışında diğer ATPaz'lardan Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz, farklı türlerdeki balıkların solungaçlarında çalışılmış ve iyon düzenleyici rolleri vurgulanmıştır (Watson ve Beamish, 1980). Bu enzim aktivitelerinin Cr^{+6}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Hg^{+2} ve Zn^{+2} gibi metaller tarafından etkilendiği belirtilmiştir (Shephard ve Simkiss, 1978; Watson ve Beamish, 1980).

Balıklar, sucul ekosistemlerin durumunu ve toksikolojik olarak gelişen patolojiyi değerlendirmede yaygın olarak kullanılan önemli bir biyoindikatördür. *O. niloticus*, Afrika kökenli bir balık türü olup, kültür koşullarında bakım ve üremesinin kolay olması, besin maddelerini iyi değerlendirmesi, kirlenmeye ve çeşitli hastalıklara dirençli olması bu türün kültür balıkçılığındaki önemini her geçen gün artırmaktadır (Erdem, 1990; Canlı ve Erdem, 1994; Kalay, 1999). Tatlı su orjinli olan *O. niloticus* değişik tuzluluklara gösterdikleri toleransla dikkat çekmektedir (Genç, 1996). Buna karşın, ağır metal toksisitesine dirençlilik bu balığın besin kaynağı olarak kullanılmasında istenilen bir özellik değildir, çünkü toksik metallerle kontamine olmuş balıkları tüketen insanlar metal birikiminde hedef olabilmektedir.

1.4. Tuzluluk

Metaller genellikle sert sularda daha az toksik etki gösterir. Su sertliği, sucul organizmalarda ağır metallerin toksik etkilerini değiştirebilmektedir (Kim ve ark, 2001). Tuzluluk ile metal toksisitesi arasında ters yönde bir ilişki bulunmasının sudaki metal katyon rekabetine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun nedeni yüzey sularında metallerin tipi, çözünürlüğü, suyun pH'sı, metalleri absorbe edebilen ligantların derişimleri, mineral bileşenlerinin oksidasyon durumu ve bağlanma yerleri için metal ve katyonlar arasındaki yarışın yüksek tuz

konsantrasyonlarında daha da artması, yani yüksek tuz derişimlerinde metallerin bu rekabet ortamından dolayı sık sık suya salıverilebilmesi olduğu bilinmektedir (Türkmen ve ark, 2004). Ağır metallerin inhibitör etkileri nedeniyle sucul organizmalarda ATPazlar gibi ozmoregülatör enzimler yararlı belirteçler olarak kullanılabilmektedir (Blanchard ve Grosell, 2006). Tuzluluk genel olarak ozmotik ve iyonik düzenlemeler için gerekli enerji ihtiyacını, besin alımını, metabolik düzenleme ve büyümeyle ilişkili ozmoregülatör hormonların uyarılmasını etkilemektedir (Laiz-Carrion ve ark, 2005).

Örihalin organizmalar üzerinde yapılan çalışma düşük tuzluluk ortamında ağır metal birikimini artırdığını göstermiştir. Kirliliğin geldiği kaynağa bağlı olarak tuzlulukla ilişkili olan diğer faktörler birçok kimyasalın biyolojik kullanımını önemli derecede etkileyen organik karbondur. Metal birikiminde tuzluluğun etkisi ile ilgili balıklarda yapılan çalışmalar, birikimde hem biyolojik hem kimyasal faktörlerin etkileri olduğunu göstermiştir (Health, 1987). Örihalin türler tuzluluğa geniş ölçüde toleranslı olmasına rağmen, en uygun tuzluluk oranı türden türe değişiklik göstermektedir. Bazı sucul türlerde, metal alınımı ile iyonik düzen arasındaki ilişki izlendiğinde, bazen etkileşimin olduğu gözlenmektedir. Teleostlar, ozmolarite ve iyon dengesini korumak için gerekli olan tuzları tatlı sudan solungaçlar aracılığıyla ve böbrekten geri emilim ile alırlar. Buna karşı deniz teleostları tuzu solungaçlar aracılığıyla dışarı atarlar ve böbrekten suyu geri emerler. Teleostlar tatlı suya ya da tuzlu suya adaptasyonda farklı yöntemler kullanılır. Örihalin balıklar tatlı su, ya da tuzlu suya ozmoregülasyon sistemlerin değişimiyle adapte olurlar (Kato ve ark, 2005). Ortamın civa derişimi ve toksisite / civa alınımı arasında görünüşte ilişki bulunmaktadır. Hg^{+2} gibi metallere tuzluluğun etkisi onların kimyasal özelliği ile ilgili olmaktadır.

Örneğin Hg^{+2}'nin biyolojik formu özellikle tatlı sularda yoğun olarak bulunan serbest Hg^{+2} iyonlarıdır. Tuzluluğun arttığı ortamlarda Hg^{+2} daha az kullanılabilmektedir (Wright ve Welbourn, 2001; Monserrat, 2007).

Bu çalışmada, tatlısu balığı *O. niloticus* farklı tuzluluk (0, 1, 10 ppt) derişimlerindeki sularda civa etkisine akut (0,3 µM Hg, 3 gün) ve kronik (0,03 µM Hg, 30 gün) olarak maruz bırakılarak, solungaç ve kas dokularındaki ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Böylece tuzluluğu artırılmış sularda yaşayan balıkların Hg^{+2} toksisitesine verdikleri tepkiler belirlenerek, doğal koşullarda sucul organizmaların metal toksisitesi dışında, suyun diğer kimyasal özellikleri tarafından da stres altında olup olmadıkları incelenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Snarski ve Olson (1982), yaptıkları çalışmalarda, kronik Hg^{+2}'nin balıklarda büyümeye engel olmasının yanında aşırı zayıflığa da yol açtıklarını göstermişlerdir. 41 hafta sonunda sırasıyla ≥0,26 µg L^{-1} ve 3,69 µg L^{-1} konsantrasyonlarında Hg^{+2}'ye maruz kalan dişi ve erkek *Fathead minnow'*larda büyümede gerilik gözlemlemişlerdir.

Hilmy ve ark (1987), çalışmalarında 4-7 gün boyunca kedibalıklarını (*Clarias lazera*) 100, 200 ve 400 µg L^{-1} Hg^{+2}'ye maruz bıraktıklarında Na^{+}, K^{+}, Mg^{+2} ve Ca^{+2} plazma iyon konsantrasyonlarının arttığını kaydetmiştir.

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

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

Nolan ve ark (1999), bir örihalin bir balık türü olan tilapia'nın (*O. mossambicus)* tatlı sudan tuzlu suya adaptasyonunun bağırsak ve solungaç dokusunun üzerine olan etkisine dair bir çalışma yapmışlardır. Solungaçta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalma olduğunu, bağırsak dokusunda ise Na^{+}/K^{+}-ATPaz

aktivitesinin önemsenmeyecek kadar az olduğunu belirtmişlerdir.

Berntssen ve ark (2003), yaptığı çalışmada 4 ay boyunca besin kaynaklı 100 mg kg^{-1} Hg^{+2} etkisindeki Atlantik somonlarında (*S. salar*) spesifik büyüme oranları ve son ağırlıklarında kontrol gruplarına göre herhangi anlamlı bir değişiklik gözlememiştir.

Sancho ve ark (2003), yılan balığı *Anguilla anguilla*'nın 0,22 mg/L derişimindeki tiyobenkarb'ın (herbisit) 96 saatlik etkisi sonrasında solungaç ve kas Na^+/K^+-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Solungaç Na^+/K^+-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Total-ATPaz aktivitelerinin 2-12 saatlik herbisit etkisinde inhibe olduğu ve kas dokusunda da benzer şekilde ATPaz aktivitelerinin düştüğü gösterilmiştir.

Güner ve ark (2005), deniz suyuna doğrudan transfer edilen ve 14 gün süresince çevresel tuzluluğa maruz bırakılan tilapialarda (*O. niloticus)*, solungaç Na^+/K^+- ATPaz aktivitesi, klorit hücre sayısı ve boyutlarında meydana gelen değişimler üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada doğrudan deniz suyuna transfer edilen balıklarda %100 ölüm gözlenmiştir. Deniz suyuna kademeli transfer edilen tilapiaların ise solungaç klorit hücre sayısının azaldığı, klorit hücrelerinin boyutlarında artış olduğu, doğrudan ve kademeli adaptasyon sonucu yüksek tuzluluğun solungaç Na^+/K^+-ATPaz enzim aktivitesi ve klorit hücre yoğunluğu üzerine etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Saoud ve ark (2007), pasifik teleost ailesinden olan *Siganus rivulatus*'un tuzluluğa toleransı, plazma ozmolaritesi ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinde tuzluluğun etkisi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları bu çalışmada *S. rivulatus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz'ındaki aktivitesinin azalan tuzlulukta arttığını ve solungaç dokusunun çok güçlü bir ozmoregülatör olduğunu belirtmişlerdir.

Mathan ve ark (2010), yüksek konsantrasyonlardaki akut $HgCI_2$ etkisiyle balıklarda solungaç yapısının zarar görmesine hatta balıkların ölümüne neden olabileceğini vurgulamışlardır.

Kulaç (2010), tatlı su balığı olan *O. niloticus'*un farklı tuzluluk (0, 2, 4 ve 8 ppt) derişimlerine sahip ortamlarda 1 μg mL^{-1} Cd^{+2} ve Cu^{+2}'nin farklı sürelerdeki (1, 3, 7 ve 14 gün) etkilerine bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ATPaz enzim aktivitesinin farklı tuzluluk, metal, etki süresi ve doku tipine göre değiştiği gözlenmiştir. Metal ve tuzluluk etkisinde bulunan balıklarda ortam koşulları ve etki süresine bağlı olarak solungaç ve bağırsak Na^{+}/K^{+}- ATPaz aktivitesinde değişimler bulunmuştur. Eğilim sadece tuzluluk etkisinde artış yönünde, tuzluluk+metal etkisinde azalma yönünde olmuştur.

Mansouri ve Baramaki (2011), farklı sertlik düzeyine sahip sulara adapte edilen (0,118, 0,154 ve 0,180 mg Ca^{+2}/L) *C. fusca*'da akut Hg^{+2} toksisitesi üzerine pH ve artan su sertliğinin etkisi ile ilgili çalışmalarında, su sertliği ve pH arttıkça Hg^{+2} toksisitesinin azaldığını göstermişlerdir.

Baysoy (2012), yaptığı çalışmada *Oreochromis niloticus* farklı tuzluluk (0, 2 ve 8 ppt) ve tuz ve metal (1μg/mL Cr ve Pb) etkilerine farklı süreler için (1, 7 ve 14 gün) bırakıldıktan sonra Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Yaptığı bu çalışmada sadece tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesindeki eğilim artış yönünde olurken, tuzluluk ve metal etkisinde azalma yönünde olmuştur.

Doğan (2013), tatlısu balığını (*O. niloticus*) farklı süreler ve derişimlerde Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisine bıraktığı çalışmasında, yüksek Ca^{+2} derişimi etkisindeki kontrol balıkların ATPaz aktivitelerini düşük Ca^{+2} derişimi etkisinde kalanlara göre önemli oranlarda yüksek bulunduğunu belirtmiştir. Sadece Ca^{+2} etkisindeki balıklarda genellikle ATPaz aktivitelerinde artış gözlenirken, Ca^{+2}+Pb^{+2} etkisinde ise artış yanında azalış da göstermiştir. Solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreçte birbirine zıt tepkiler verirken, diğer ATPaz'lar genellikle benzer yönde aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Poopal ve ark (2013), *Cirrhinus mrigala*'da Hg^{+2} için 96 saat LC50 değerini 0,34 mg/L olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada ayrıca *C. mrigala*'yı 96

saat boyunca 0,068 ve 0,034 mg/L^{-1} $HgCI_2$'ye maruz bırakmış ve solungaç ve beyin dokuda Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ile iyon düzeyleri (Na^+, K^+ ve CI^-) incelenmiştir. Deney süresince Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ile iyon düzeylerinin (Na^+, K^+ ve CI^-) farklı konsantrasyonlardaki $HgCI_2$'den etkilenerek azalış gösterdiği belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.1.1.1. Metaller, Asitler ve Tuzlar

Civa klorür ($HgCl_2$, Merck)

Sodyum klorür (NaCl, Merck)

3.1.1.2. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

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

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

EDTA (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)

3.1.1.3. Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Fluka)

Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)

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

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

Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)

Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Ekipmanlar

Spektrofotometre: Schimadzu UV-1800

Derin dondurucu (- 80 ^oC): Revco Ultima II

Hassas Terazi: Sartorius Analytic ATL-224-I

Santrifüj: Hettich Zentrifugen Mikro220R

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

Çoklu ölçüm cihazı: ThermoOrionstar 5

3.2. Yöntem

Deneylerde kullanılmak üzere Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan *O. niloticus*, sıcaklığın 20 ± 1 ^0C olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuvar ortamında 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 100 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yaklaşık 1 ay süreyle yeni koşullara adapte olmaya bırakılmıştır.

Adaptasyon sürecinin sonunda balıklar, 0, 1 ve 10 ppt tuz (NaCl) içeren ortamlarda civa ($HgCl_2$) etkisine bırakılmıştır. Akut deneylerde balıklar 0,3 µM Hg etkisinde 3 gün, kronik deneylerde ise 0,03 µM Hg etkisine 30 gün süreyle bırakılmıştır. Normal kontrol (sadece çeşme suyu), tuz kontrolü (0, 1 ve 10 ppt

NaCl) ve her iki ortamda da deneyler 6 tekrarlı olarak yapılmış olup, 3. gün sonunda akut deneyler ve 30. gün sonunda da kronik deneyler sonlandırılmıştır.

Deney sırasında cam yüzeylere tutunma, suyun buharlaşması gibi nedenlerden dolayı akvaryumlardaki civa ve tuz derişimlerinin değişmesini önlemek amacıyla akvaryum suları 3 günde bir taze olarak hazırlanan çözeltilerden yapılan uygun seyreltmelerle değiştirilmiştir. Metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verilmiştir.

Adaptasyon ve deneyler esnasında akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.Akvaryum sularının fizikokimyasal özellikleri (Art ort. ± S.D., N=9).

	pH	Oksijen mg O_2/L	Sertlik mg Ca_2CO_3/mL	Alkalinite mg Ca_2CO_3/mL
Akut	7,36±0,18	6,05±0,11	334,7±3	403,3±18,47
Kronik	7,49±0,90	6,16±0,21	335,6±2	402,2±12,45

Çizelge 3.2 Akvaryum sularının tuzluluk derişimleri

	0 PPT	1 PPT	10 PPT
Akut	0,25±0,05	1,35±0,22	10,4±0,04
Kronik	0,25±0,03	1,35±0,15	10,4±0,03

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

3.2.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanışı

Deney süreleri sonunda balıklar akvaryumlardan alındıktan sonra spinal yapılarak öldürülmüştür. Kurutma kağıdıyla kurulanan balıkların boyları en yakın cm ve ağırlıkları en yakın gram cinsinden ölçülmüştür. Balıkların ortalama boy (19,8±0,40 cm) ve ağırlıklarının (125,7±5,14 g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlenmiştir *(P*>0.05*).* Steril aletler kullanılarak solungaç ve bağırsak dokuları alınmış ve homojenize edilinceye kadar Revco Ultima II marka derin dondurucuda -80 ^{0}C'de saklanmıştır.

Dokular 250 mM Sukroz, 20 mM Trizma-Base ve 1 mM EDTA (pH 7.8) içeren homojenizasyon tamponu ile (1/10, w/v) 9500 rpm'de 1,5 dk süreyle buz üstünde Janke & Kunkel Ultra Turrax T25 marka homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Ependorf tüplerine aktarılan homojenatlar 13.000 g'de 20 dk +4 ^{0}C'de Hettich Zentrifugen Mikro220R marka ile santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatantlar enzim analizlerinde ve protein tayininde kullanılmıştır.

3.2.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Bu çalışmadaki ATPaz aktivite ölçümünde, laboratuvarımızda daha önce yapılan ATPaz karakterizasyon çalışması sonucu (Atlı, 2009) elde edilen enzim aktivitesinin en yüksek olduğu inkübasyon ortamı derişimleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Dokularda en yüksek ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların son iyon derişimleri

	Toplam-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
Tris (mM)	40	40	40
ATP (mM)	3	3	3
pH	7,7	7,7	7,7
^oC	37	37-40	37

Enzim aktivitelerinin saptanması için iki tekrarlı olmak üzere her tüpe son iyon derişimleri Çizelge 3.3' de verilen 870 µL inkübasyon ortamı ve 30 µL örnek konulmuştur. Tüpler sıcak su banyosunda 37 ^{0}C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon, tüplerin üzerlerine 100 µL ATP konmasıyla başlatılmış ve 30 dk inkübasyon süresinin ardından 500 µL soğuk saf su (+4 ^{o}C) ile sonlandırılmıştır. Tüm bileşenler dışında sadece ATP içermeyen tüpler ATP körü, örnek içermeyen tüpler ise Örnek körü olarak kullanılmıştır. Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi, Toplam-ATPaz (ouabain içermeyen inkübasyon ortamı) aktivitesinden Mg^{+2}-ATPaz ouabain içeren inkübasyon ortamı) aktivitesinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri, µmol Pi/mg prot./sa. olarak verilmiştir.

3.2.3. İnorganik Fosfat Tayini

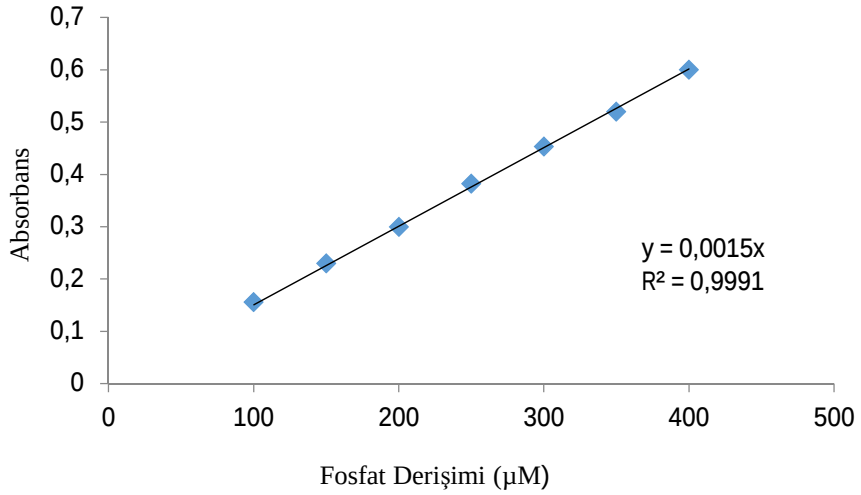
İnorganik fosfat tayini, ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın (Pi) Decaethylene glycol mono-dodecyl eter ile fosfomolibdatın oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Atkinson ve ark, 1973).

Ayıraçlar;

1. % 5 Decaethylene glycol mono-dodecyl eter: 5 g Decaethylene glycol mono-dodecyl eter tartılarak saf su ile çözülmüş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 ^{0}C'de 30-40 dk bekletilmiştir.
2. % 2 Molibdik asit: 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak 100 mL 1,8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözülmüştür.
3. Ana ayıraç: 100 mL için 10 mL % 5 Decaethylene glycol mono-dodecyl eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı;

1. 1,5 mL örnek üzerine 3 mL ana ayıraçtan konulmuştur.
2. Oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletilmiştir.
3. Absorbans değerleri 390 nm'de ölçülmüştür.
4. Sonuçlar 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µM KH_2PO_4 çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

3.2.4. Toplam Protein Analizi

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

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

Ayıraçlar;

1. Ayıraç A: 2 g Na_2CO_3 tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözülmüştür.
2. Ayıraç B_1: 1 g $CuSO_4.5H_2O$ tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.
3. Ayıraç B_2: 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile

tamamlanmıştır.

4. Ayıraç C: 100 hacim ayıraç A üzerine 1 hacim ayıraç B_1, onun da üzerine 1 hacim ayıraç B_2 onularak karıştırılır.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: 1 hacim Folin- Ciocalteu 1,5 hacim hacim saf su ile seyreltilmiştir.
6. Standart Sığır Albumin Çözeltisi: Stok sığır albumin çözeltisi 1 mL'de 1 mg (1000 µg/mL) sığır albumin olacak şekilde hazırlandı. Standart çözeltiler 100-200-300-400-500-600 µg/mL olacak şekilde stok sığır albumin çözeltisinden yapılan uygun seyreltmelerle hazırlanmıştır.

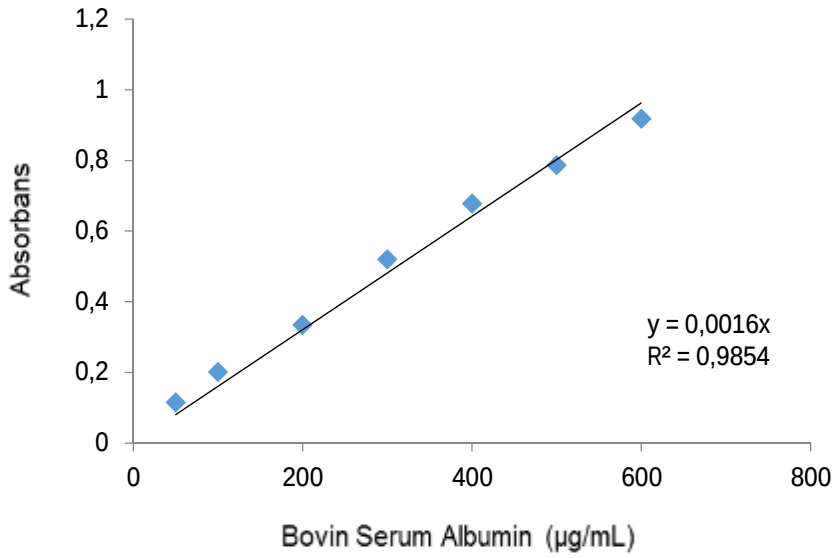
Standart Çözeltilerin Hazırlanması;

Standart 1 = 100 g: 0,1 mL stok bovin albumin + 0,9 mL distile su
Standart 2 = 200 g: 0,2 mL stok bovin albumin + 0,8 mL distile su
Standart 3 = 300 g: 0,3 mL stok bovin albumin + 0,7 mL distile su
Standart 4 = 400 g: 0,4 mL stok bovin albumin + 0,6 mL distile su
Standart 5 = 500 g: 0,5 mL stok bovin albumin + 0,5 mL distile su
Standart 6 = 600 g: 0,6 mL stok bovin albümin + 0,4 mL distile su

Deneyin Yapılışı;

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

değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.).



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

Buna göre 0.3 µM Hg^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungaç dokusunda 3. gün sonunda toplam protein düzeyi:

y = 0,0016x

Absorbans: y = 0,808

$$\text{Derişim (x)} = \frac{0,808}{0,0016}$$

Derişim = 5,05 mg prot./mL

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

hesaplanmıştır.

3.2.5. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

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

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

0.3 µM Hg^{+2} etkisinde 1 nolu *O. niloticus*'un solungacında 3. gün sonunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi;

Absorbans: y = 0,103

$$Na^{+}/K^{+}\text{-ATPaz aktivitesi} = \frac{0{,}103 / 0{,}0015^{*} \text{ x } 4{,}5 \text{ (mL)}}{1000 \text{ x } 0{,}03 \text{ (mL) x } 0{,}5 \text{ (sa.) x } 5{,}053 \text{ mg prot./mL}}$$

Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi = 4,06 µmol Pi/mg prot./sa.

3.2.6. İstatistik

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS 15 yardımıyla "Regresyon Analizi" ve "One-way ANOVA" kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel bir ayırım gözlendiğinde (P<0,05), hangi grup veya grupların farklı olduğu post-hoc testlerinden Duncan-test kullanılarak belirlendi. Grafik çizimleri ise Microsoft Excel programı kullanılarak çizildi. Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

O. niloticus' un farklı tuzluluk (0, 1, 10 ppt) derişimlerindeki sularda civa etkisine akut (0,3 µM Hg, 3 gün) ve kronik (0,03 µM Hg, 30 gün) olarak maruz bırakılarak, deney süreleri sonunda balıklarda solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi ölçülmüştür.

Deney süresince *O. niloticus*' larda sadece 0 ppt tuzluluktaki 0,03 µM Hg^{+2} etkisinde bir adet ölüm gözlenmiştir.

4.1.1. ATPaz Aktiviteleri

Farklı tuzluluk derişimlerinde (0,1 ve 10 ppt) akut süreçte 0,3 µg/mL ve kronik süreçte 0,03 µg/mL Hg^{+2} etkisine maruz bırakılan *O.niloticus*'ların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde önemli değişimler olmuştur.

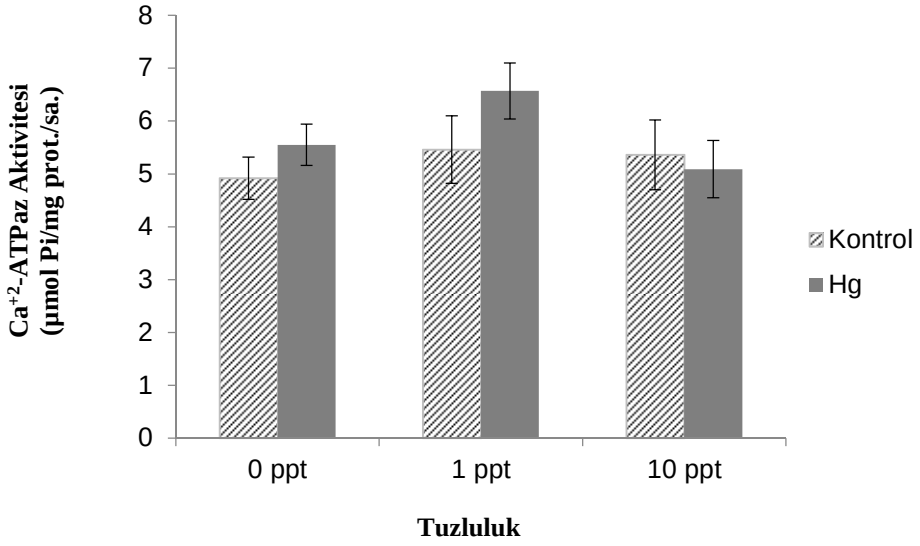
4.1.1.1. *O.niloticus*'lar İçin Akut Süreçteki Deneyler

0,1 ve 10 ppt tuzluluk içeren sularda Hg^{+2}'nin 0,3 µg/mL derişimine 3 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda kontrol grubunda ölçülen ATPaz aktiviteleri Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1**.** Akut kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (µmol Pi/mg prot./sa.)

Tuzluluk	**SOLUNGAÇ**			**KAS**
	Na^{+}/K^{+}-ATPaz	**Mg^{+2}-ATPaz**	**Ca^{+2}-ATPaz**	**Ca^{+2}-ATPaz**
0 ppt	5,19±0,76	8,26±0,23	7,00±0,41	4,92±0,40
1 ppt	5,72±0,68	7,66±0,88	6,51±0,37	5,47±0,64
10 ppt	6,81±0,81	8,42±0,81	7,99±0,45	5,36±0,66

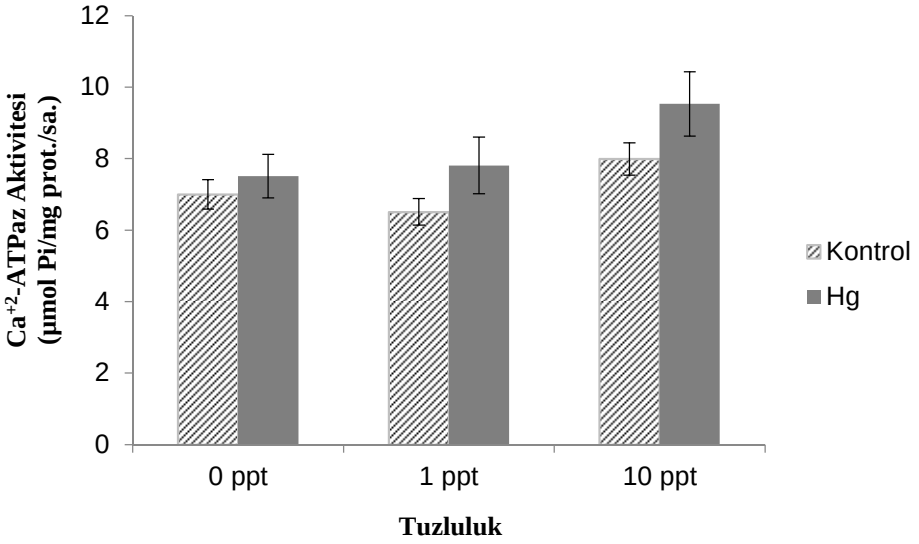
4.1.1.1.(1). Kas Ca^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.1. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

Elde edilen verilerde, kas dokusunda 0 ve 1 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi Hg^{+2} grubu kontrol grubuna göre artış gösterirken, 10 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda ise kontrol grubuna göre bir azalış gözlenmiştir fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0,05) (Şekil 4.1.).

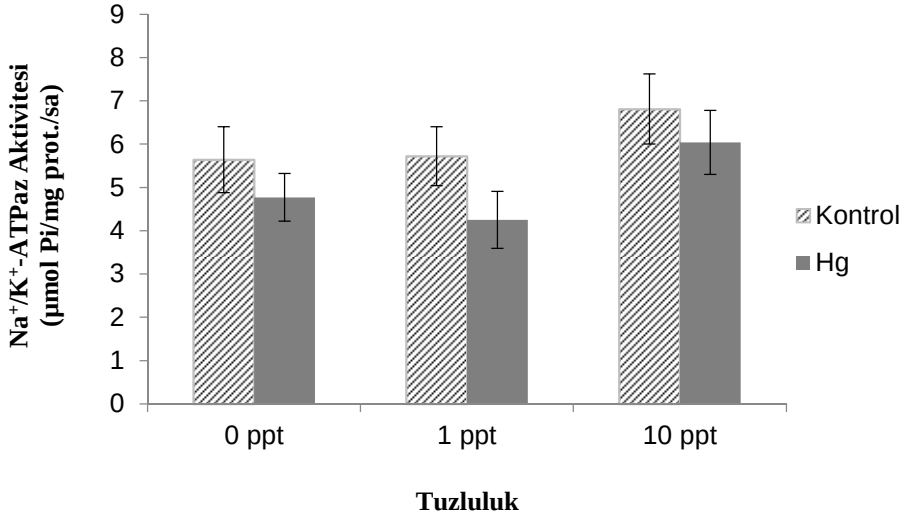
4.1.1.1.(2). Solungaç Ca^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.2. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi

Solungaç dokusunda 0, 1 ve 10 ppt tuzluluk ve Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu Ca^{+2}-ATPaz aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (P>0,05) (Şekil 4.2.).

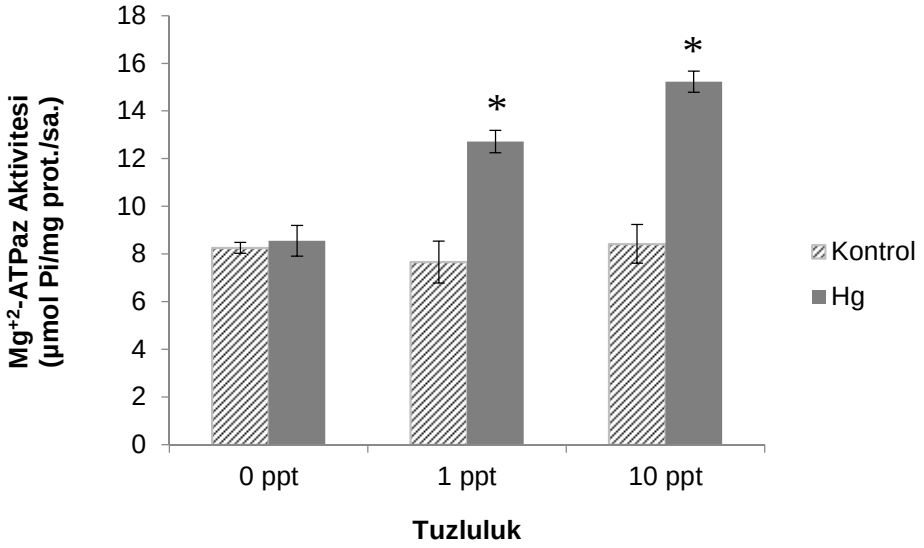
4.1.1.1.(3). Solungaç Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.3. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.

Solungaç dokusunda 0, 1 ve 10 ppt tuzluluk ve Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre azalış göstermiştir. Bu azalışlar istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0,05) (Şekil 4.3.).

4.1.1.1.(4). Solungaç Mg^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.4. Farklı tuzluluk düzeylerindeki akut Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.

Solungaç dokusunda 0,1 ve 10 ppt tuzluluk ve Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Solungaç dokusunda 1 ve 10 ppt tuzluluk ve Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi anlamlı bir fark göstermiştir (P<0,05) (Şekil 4.4.).

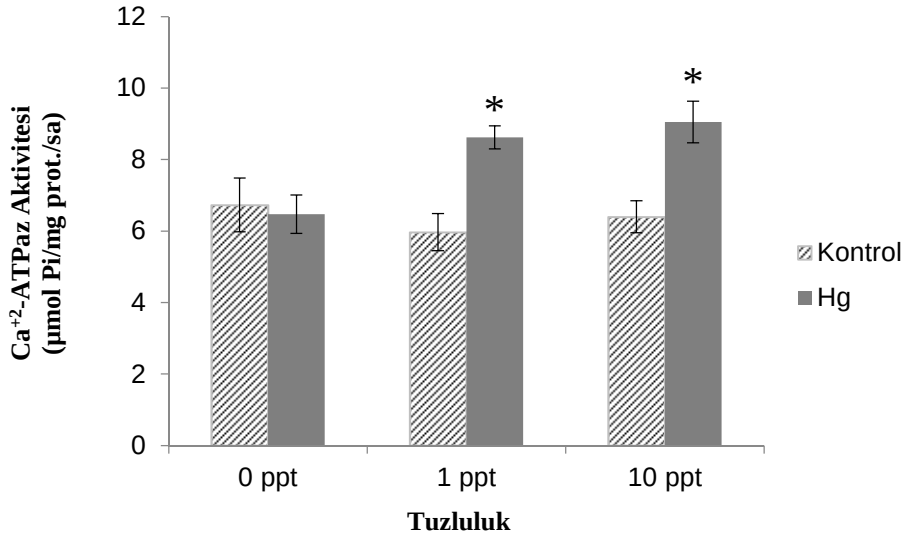
4.1.1.2. *O.niloticus*'lar İçin Kronik Süreçteki Deneyler

0,1 ve 10 ppt tuzluluk içeren sularda Hg^{+2}'nin 0,03 µg/mL derişimine 30 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda kontrol grubunda ölçülen ATPaz aktiviteleri Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2**.** Kronik kontrol grubu balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktiviteleri (µmol Pi/mg prot./sa.)

Tuzluluk	**SOLUNGAÇ**			**KAS**
	Na^{+}/K^{+}-ATPaz	**Mg^{+2}-ATPaz**	**Ca^{+2}-ATPaz**	**Ca^{+2}-ATPaz**
0 ppt	5,68±0,78	8,60±0,31	5,15±1,41	6,73±0,75
1 ppt	8,31±0,68	7,65±0,85	4,90±0,70	5,97±0,52
10 ppt	8,08±1,57	7,36±0,65	7,36±0,65	6,40±0,45

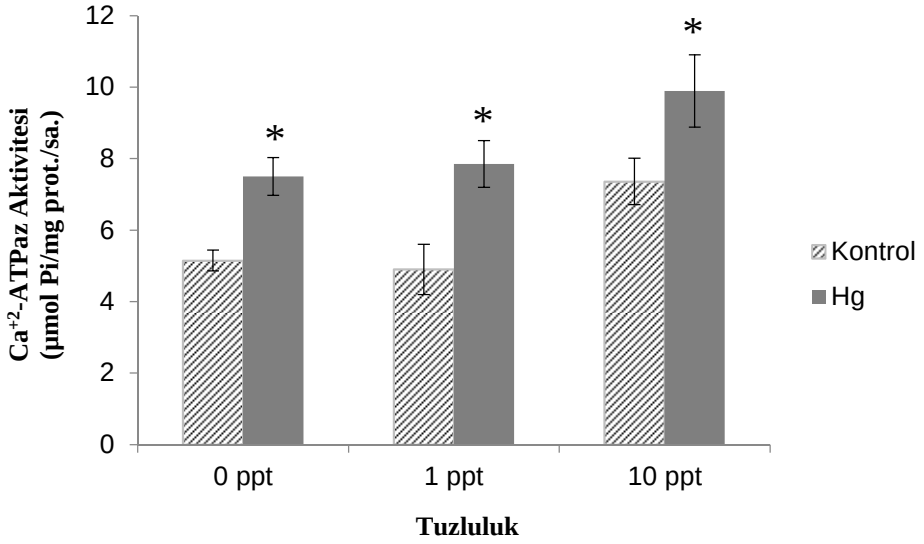
4.1.1.2.(1). Kas Ca^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.5. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O.niloticus*'un kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

Kas dokusunda 0 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre azalış göstermiştir (P>0,05). 1 ve 10 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu artışlar istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05) (Şekil 4.5.).

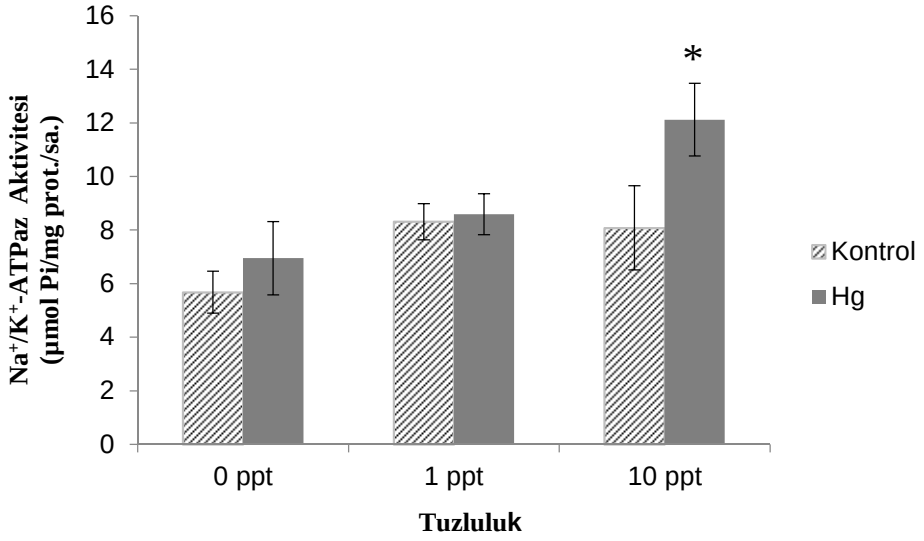
4.1.1.2.(2). Solungaç Ca^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.6. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi.

Solungaç dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi tüm tuzluluklarda Hg^{+2} etkisinde kontrol grubuna göre artış göstermiş ve bu artışlar istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) (Şekil 4.6.).

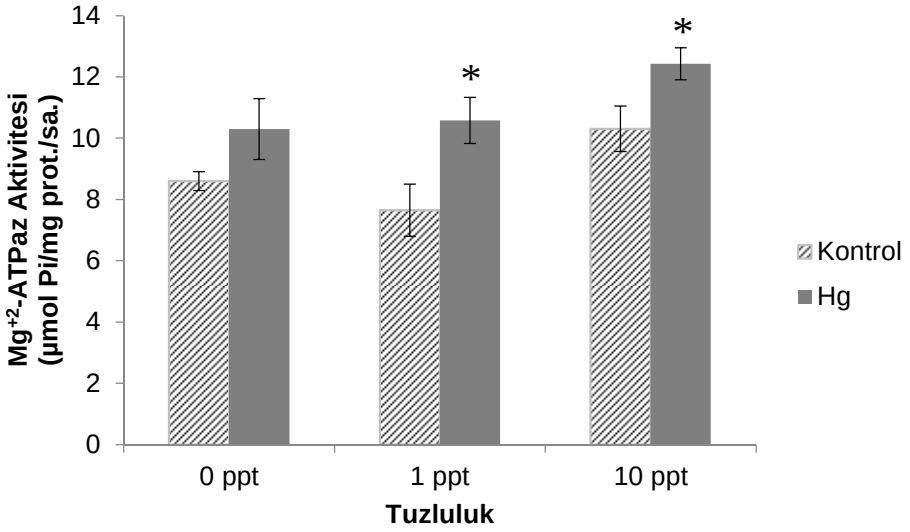
4.1.1.2.(3). Solungaç Na^+/K^+-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.7. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi.

Solungaç dokusunda 0, 1 ve 10 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre artış gösterirken bu artışlardan sadece 10 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) (Şekil 4.7.).

4.1.1.2.(4). Solungaç Mg^{+2}-ATPaz Aktivitesi



Şekil 4.8. Farklı tuzluluk düzeylerindeki kronik Hg^{+2} etkisinde *O. niloticus*'un solungaç Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi.

Solungaç dokusunda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrole göre artış gösterirken bu artışlardan 1 ve 10 ppt tuzluluk etkisinde kalan balıklarda Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış göstermiştir (P<0,05) (Şekil 4.8.).

4.2. Tartışma

Gelişen teknolojiye bağlı olarak gözlenen çevre kirliliği, bilinçsizlik ve ekonomik güçsüzlük gibi nedenlerden beslenme sorunları artmakta ve güvenli gıda temini zorlaşmaktadır. Akarsu ve yağmur sularının yıkayıcı etkisiyle su ortamına ulaşan ağır metaller sucul canlılar tarafından su, sediment ve besin yolu ile alınmaktadır (Douben, 1989). Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak insanların beslenmesi için gerekli gıda kaynaklarının bulunması ve bu gıdaların insanlar için tehlikeli bileşenleri içermesinin önlenmesi günümüzün en önemli

sorunlarından biridir. Balıklar da besin zincirinin bir parçası olması nedeniyle sucul ortamda bulunabilen metallerin etkilerinin belirlenebilmesi için öncelikli çalışılması gereken canlılardandır (Anderson ve ark, 1997; Bervoets ve ark, 2009). Metallerin balıklar üzerine etkisinin, çoğunlukla oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türlerinde artışa neden olması, ozmoregülator sistemin bozulması, ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ve doku hasarı ile ilgili olduğu bilinmektedir (Radi ve Matkovics, 1988; Roche ve Boge, 1993; Canlı ve Stagg, 1996; Wong ve Wong, 2000; Ribeiro ve ark, 2002; Dautremepuits ve ark, 2004).

Bu çalışmada Hg^{+2}'nin 0,3 ve 0,03 µg/mL ve 0, 1 ve 10 ppt tuzluluk derişimlerinde 3 gün ve 30 gün süre ile etkisinde kalan *O. niloticus*'ların solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2}-ATPaz aktivitesini belirlemek amaçlanmıştır.

Deney süresi boyunca sadece 0 ppt tuzluluktaki 0,03 µM Hg^{+2} etkisinde bir adet balık ölümü gözlenmiştir. Ölüm söz konusu olduğunda sadece metalin cinsinden bahsetmek yetersiz olur. Çünkü balık türü, cinsiyet ve yaş gibi biyolojik faktörlerle birlikte ortamın diğer fiziksel ve kimyasal koşulları da metal toksisitesi de etkendir. Örneğin, Öner ve ark (2008), yaptığı çalışmada tatlı su balığı *O. niloticus*'u farklı sürelerde (0, 5, 10, 20 ve 30 gün) 0,05 µg/mL derişimlerindeki Cu^{+2}, Cd^{+2}, Cr^{+3}, Ag^{+} ve Zn^{+2} etkisine bırakmıştır. Ag^{+} etkisinde kalan balıkların tamamı 16. gün sonunda ölmüştür. Benzer şekilde bir alabalık türü olan *Salmo gairdneri* 0,03 µg/mL Cu^{+2} ve 0,1 µg/mL Cd^{+2} etkisinde kısa sürede ölmüştür (Viale ve Calamari, 1984). Bu çalışmada bir balık ölümü gözlenmiş ve bu ölen balığın düşük Hg^{+2} derişiminde ve tuz eklenmeyen koşullarda olması, balık ölümünün deney koşulları nedeniyle değil, doğal bir ölüm olduğu sonucunu çıkarmaktadır.

Yapılan çalışmalar ağır metallerin sucul ortamdaki etkilerinin karmaşık olduğunu ve suyun fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Balık ozmoregülasyon sisteminin önemli bir parçası olan ATPaz

enzimlerinin bu koşullardan nasıl etkilendiğini araştırmak bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Enzim aktivite düzeylerinin farklı tuzluluk, metalin dozu, etki süresi ve doku tipine göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre, akut etki sonucunda 0,3 μg/mL Hg^{+2} içeren balıkların Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde 1 ptt tuzlulukta (%26) gibi anlamlı olmayan azalışlar göstermiştir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi 1 ppt (%66) ve 10 ptt (%81) tuzlulukta Hg^{+2} içeren balıklarda artış görülmüştür. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi 1 ppt tuzlulukta Hg^{+2} içeren balıklarda ise (%20) artış görülmüştür fakat istatiksel olarak anlamlı değildir. Benzer şekilde kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde de (%20) artış görülmüştür. Kronik süreçte (0,03 μg/mL Hg^{+2} ve 3 gün) solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi artış göstermiştir. Örneğin; 10 ppt tuzlulukta Hg^{+2} içeren balıklarda Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi (%50) artış göstermiştir. Mg^{+2}-ATPaz aktivitesinde görülen artışların 1 ppt (%38) ve 10 ppt (%21) tuzlulukta Hg^{+2} içeren balıklarda görülenleri anlamlı bulunmuştur. Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde ise tüm gruplarda artış görülmüştür. Bu artışlar 0 ptt (%46), 1 ppt (%60) ve 10 ppt (%34) tuzluluktakiler istatiksel olarak anlamlıdır. Kas Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinde ise yine artış görülmüştür. Bu artışlar 1 ppt (%44) ve 10 ppt (%41) tuzluluk içeren gruplar istatiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.3.).

Balıklarda fizyolojik olayların tam olarak yapılabilmesi ve canlılığın sürdürülebilmesi için hücre içi ve hücre dışı arasında iyon derişimlerindeki dengenin sürekli olarak korunması gerektiğinden, bunu sağlamak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Örneğin, Na^{+}/K^{+}-ATPaz sistemi hücre içinde K^{+}'nın, hücre dışında da Na^{+}'nın yüksek derişimlerde tutulmasını (Satyavath ve Rao, 2000), Na^{+}/K^{+}-ATPaz ile Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz enzimlerinin solungaçlarda ilgili iyonların aktif taşınmalarını (Sloman ve ark, 2003; Rogers ve ark, 2003), karbonik anhidraz enzimi Na^{+} ve Ca^{+2}'nin taşınmasını (McGeer ve ark, 2000) sağlayarak iyon dengesi ile elektrokimyasal değişimi ve hücre hacminin

regülasyonunu sağlamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Grosell ve ark, 2003)

Balıklarda solungaç dokusu solunum gazları, elektrolitler, su ve nitrojenli atıkların taşınmasının ve asit-baz dengesinin gerçekleştiği biyolojik ortamdaki tartışmasız en karmaşık epitellerden biridir. Bu karmaşık fonksiyonları yerine getirebilmek için yüzlerce filament ile binlerce lameller yapıdan oluşan bu epitel doku balığın toplam yüzey alanının yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. Bu anlamda da metallerin toksik özelliklerinin gözlendiği birincil hedef organlardan biridir (Heath, 1987; De La Torre ve ark, 2007). Solungaç dokusu boşaltım ve ozmoregülasyonda rol oynar. Böylece balıklarda homeostazinin korunması ve metabolizma artıklarının atılışı, bu organların birlikte ve uyumlu bir biçimde çalışmalarıyla sağlanır.

Solungaçta, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut süreçte anlamlı olmayan azalış gösterirken, kronik süreçte görülen artış anlamlıdır (Çizelge 4.3.). Örneğin, akut süreçte Cu^{+2} etkisine bırakılan *C. carpio* ve *O. mykiss*'te solungaç Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde azalış olmasına karşın (Lauren ve McDonald, 1987; De Boeck ve ark, 2007), uzun süreli etki Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin normal düzeye dönmesine (Lauren ve McDonald, 1987) ya da artmasına neden olmuştur (McGeer ve ark, 2000).

Mg^{+2}'nin solungaç apikal membranlarında pasif bir şekilde taşındığı belirlenmiştir. Mg^{+2} derişimi, ouabaine duyarlı olmayan bir integral membran proteini olan Mg^{+2}-ATPaz tarafından kontrol edilmekte ve ağır metallerin Mg^{+2}-ATPaz'ı inhibe etmesi sonucu Mg^{+2} düzeyi değişebilmektedir (Thaker ve ark, 1996; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2008b, 2011). Mitokondriyal Mg^{+2}-ATPaz, balık ATPaz sisteminde en önemli enerji bağıntılı enzimdir ve Mg^{+2}-ATPaz inhibisyonu oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir. Bu çalışmada solungaç dokusunun Mg^{+2}-ATPaz aktivitesine baktığımızda genel olarak artış göstermiştir

ve bu artışların akut ve kronik süreçteki tuzluluk içeren gruplarda anlamlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3.).

Ca^{+2}-ATPaz sarkoplazmik retikulum tübüllerinde yer almakta ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak, hücre zarının stabilizasyonunu sağlamak üzere hücrede düşük Ca^{+2} derişimini korumak için sitoplazmadan Ca^{+2}, yi taşımada görev yapmaktadır (Watson ve Beamish, 1981; Saxena ve ark, 2000). Ca^{+2}-ATPaz inhibisyonuna neden olan metaller toksisitelerine göre sıralandığında, sıralama Hg^{+2} >Pb^{+2} >Cu^{+2} >Cd^{+2} >Zn^{+2} şeklindedir (Viarengo ve ark, 1993). Bir çok biyokimyasal mekanizmada enzimlerle birlikte yaşamsal öneme sahip birinci serideki geçiş metalleri (Fe^{+2}, Zn^{+2}, Co^{+3} ve Cu^{+2}) yüksek derişimlerde ATPaz kofaktörleri (Na^{+}, K^{+} ve Mg^{+2}) ile yarışmakta ve enzim fonksiyonel grupları olan –SH, $-NH_2$ veya –COOH ile kompleks oluşturmaktadır. Bununla birlikte metabolizmada herhangi bir rol üstlenmeyen metaller (Cd^{+2}, Hg^{+2}) de bu fonksiyonel gruplara bağlanarak enzim aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır. Vasic ve ark (2009), yaptıkları çalışmada bu metallerin etkilerinin artan derişimle doğru orantılı olarak ATPaz aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada solungaç dokusunun Ca^{+2}-ATPaz aktivitesine baktığımızda, akut süreçte anlamlı olmayan azalış gösterirken, kronik süreçte görülen artış anlamlıdır (Çizelge 4.3.).

Solungaç dokusunun enzim aktivite düzeylerine baktığımızda, akut süreçte % olarak en fazla Mg^{+2}-ATPaz etkilenmiş olup bunu sırayla Ca^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz izlerken, kronik süreçte % olarak en fazla Ca^{+2}-ATPaz etkilenmiş olup bunu sırayla Mg^{+2}-ATPaz ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz izlemiştir. Enzim aktivitelerinin bazı durumlar dışında genel olarak artış göstermesine karşın, özellikle Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinde anlamlı olmamakla birlikte azalış göstermiştir (Çizelge 4.3.). Atlı (2009), *O. niloticus* ile yaptığı çalışmada, metal etkileri ile Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin azaldığını göstermiştir. De La Torre ve ark (2007), balıkta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında

artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır.

Kas dokusu da balıkta besin zincirinde önemli bir besin kaynağı oluşturması nedeniyle ve Ca^{+2}-ATPaz aktivitesinin en yüksek aktivite gösterdiği doku olmasından dolayı metal toksisite çalışmalarında önemli bir belirteç doku olarak çalışılmaktadır (Heath, 1987; De La Torre ve ark, 2007). Bu çalışmada kas dokusunun ATPaz aktivitesini incelediğimizde, kronik süreçte ve artan tuzluluk düzeylerinde Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi genel olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Solungaç dokusu ile kas dokusu arasında Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi bakımından bir karşılaştırma yapıldığında ise iki dokuda da artış olmasına rağmen % değerlere baktığımızda solungaç dokusunun kas dokusuna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Araştırıcılar Hg^{+2}'nin dokularda ozmoregülatör sistemi bozduğunu, ATPaz enzim sistemini inhibe ederek iyon ve metabolitlerin emiliminin azaldığını vurgulamışlardır. Poopal ve ark (2013), *Cirrhinus mrigala*'da Hg^{+2} için 96 saat LC50 değerini 0,34 mg/L olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada ayrıca *C. mrigala*'yı 96 saat boyunca 0,068 ve 0,034 mg/L^{-1} $HgCI_2$'ye maruz bırakmış ve solungaç ve beyin dokuda Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ile iyon düzeyleri (Na^+, K^+ ve CI^-) incelenmiştir. Deney süresince Na^+/K^+-ATPaz aktiviteleri ile iyon düzeylerinin (Na^+, K^+ ve CI^-) farklı konsantrasyonlardaki $HgCI_2$'den etkilenerek azalış gösterdiği belirlenmiştir. Na^+/K^+-ATPaz gibi Hg^{+2}'ye oldukça duyarlı enzimlerde Hg^{+2} enzimlerdeki sülfür atomuna bağlanarak çoğu enzimi inhibe etmektedir. Solungaç ve beyin dokuda Na^+/K^+-ATPaz aktivitelerinin inhibisyonu muhtemelen Hg^{+2} toksisitesi ile hücre membranındaki fizyokimyasal değişimlerden kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak Na^+/K^+-ATPaz enziminin inhibisyonu

membrandaki aktif taşımayı bloke ederek iyon transferi ve ozmoregülatör fonksiyonları da etkileyebilmektedir.

Yaptığımız deneyin sonuçlarına göre tuzluluk arttıkça, enzim aktivitelerinde de artış görülmüştür. 1 ve 10 tuzluluk etkisinde solungaç dokusunda akut süreç sonunda Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi anlamlı olmayan bir artış gösterirken, kronik süreç sonunda ise 10 ppt tuzlulukta görülen artış anlamlıdır (Çizelge 4.3.). Tuzlu su etkisinde azalan solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi klorit hücre sayısındaki azalmayla ilişkili olabilmektedir. Az tuzlu ortamdaki ozmoregülasyon metabolik gereksinimi kan ozmotik gradientinin minimal olması nedeniyle azalmaktadır. Ayrıca araştırıcılar balıklarda tatlı sudan tuzlu suya doğrudan transferi sonrasında görülen ölçümlerin, dehidrasyon sonucu Na^+/K^+-ATPaz fonksiyonundaki hasardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (Güner ve ark, 2005). Saoud ve ark (2007), deniz balığı ***Siganus rivulatus***'u farklı sürelerdeki çeşitli tuzluluk derişimlerinin etkisine bırakmış ve solungaç Na^+/K^+-ATPaz aktivitesinin azalan tuzlulukta arttığını gözlemlemişlerdir. Tuzlu su etkisinin tatlı suya göre daha fazla olduğunu bunun da branşiyal oksijen düzeyi ve ATP tüketimi gibi sonuçlarla ilişkili olmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Araştırıcılar tuzlu su etkisinin tatlı suya göre daha fazla olduğunu, bunun da solungaçtaki oksijen düzeyi ve ATP tüketimi gibi sonuçlarla ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır. Buna paralel olarak da bu çalışmada solungaç dokusunun ATPaz aktivitelerine baktığımızda, 1 ve 10 ptt tuzluluk etkisinde yer alan balıklarda, Ca^{+2}-ATPaz'ın ve Mg^{+2}-ATPaz aktivitelerinde artış görülmüştür (Çizelge 4.3.).

Sucul organizmalar genellikle metallerin akut etkilerinden çok düşük düzeylerinin uzun süreli etkilerine maruz kalmaktadır. Akut ve kronik stres altında sucul organizmalarda özgün moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik tepkileri kapsayan farklı ekolojik değişiklikler gözlenebilmektedir. Kronik süreç sırasında toksik maddeye karşı gelişen dirençliliğe bağlı olası uyum

mekanizmalarının indüklendiği görülebilmektedir (McDonald ve Wood, 1993; Silvestre ve ark., 2005). Bu anlamda çevresel risk değerlendirilmesinde metallerin kısa süreli yüksek derişimlerinin etkisinin değerlendirilmesi yanında özellikle uzun süreli çevresel düzeylerine daha yakın düşük derişimdeki metallerin etkilerinin değerlendirilmesi daha fazla önem kazanmaktadır. Bu da bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Bu çalışmada akut ve kronik süreçleri incelediğimizde, anlamlı artışların kronik süreçte ve genel olarak tuzluluk etkisinde yer alan gruplarda yer aldığı görülmektedir (Çizelge 4.3.). Enzim aktivitelerinde kronik süreçte gözlenen artışlar, metallothionein ve antioksidan sistemler gibi olası telafi ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi ile açıklanabilmektedir. De La Torre ve ark (2007), balıkta Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır. Bu nedenle de bu enzimlerin değişen ortam koşullarına verdikleri cevabın stresin sınıflandırılmasında ve metabolik uyum düzenlemelerinin yapılmasında önem kazandığını belirtmişlerdir.

Dokulardaki toplam protein düzeyi kısa süreli metal etkilerinde değişiklik gösterirken genel olarak kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir.

Elde edilen veriler Na^{+}/K^{+}-ATPaz'ın, Ca^{+2}-ATPaz'ın ve Mg^{+2}-ATPaz'ın hem tuzluluk hem de metal etkilerinin belirlenmesinde duyarlı bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer yandan bu sonuçların bize verdiği enzim aktiviteleri ile diğer ölçülen parametrelerin metallere verdikleri tepkilerinin, derişim ve süresi ile civa ve tuzluluk ile doku tipine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir.

Bu çalışma ile metal ve tuzluluk içeren sulardaki balıkların enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açan kimyasal mekanizmanın anlaşılmasının önemi vurgulanmaktadır. Aynı zamanda toksik maddelerin saptanmasında ATPaz aktivite değişimini temel alan analizler basit, kullanışlı ve hızlı ölçüm sağladığından ekotoksikoloji çalışmalarında uyarıcı sistem olarak kullanılabilmektedir.

Çizelge 4.3. Civa ve tuzluluğun etkisinde kalan sularda *Oreochromis niloticus'*un solungaç ve kas dokularındaki ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri.

		Solungaç				**Kas**	
Tuzluluk	**Deney Koşulları**	**Na^{+}/K^{+}-ATPaz**	**Mg^{+2}-ATPaz**	**Ca^{+2}-ATPaz**	**Protein**	**Ca^{+2}-ATPaz**	**Protein**
0 ppt	**Akut Hg^{+2}**	**8↓**	**4↑**	**7↑**	**1↑**	**13 ↑**	**13↓**
1 ppt	**Akut Hg^{+2}**	**26↓**	***66↑**	**20↑**	**0**	**20↑**	**12↑**
10 ppt	**Akut Hg^{+2}**	**11↓**	***81↑**	**19↑**	**3↓**	**5↓**	**18↑**
0 ppt	**Kronik Hg^{+2}**	**22↑**	**20↑**	***46↑**	**3↑**	**4↓**	**6↓**
1 ppt	**Kronik Hg^{+2}**	**3↑**	***38↑**	***60↑**	**15↓**	***44↑**	**5↓**
10 ppt	**Kronik Hg^{+2}**	***50 ↑**	**21↑**	***34↑**	**9↑**	***41↑**	**10↑**

'*' kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farkı belirtmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada yapılan deneyler sonucunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

1. *O. niloticus* farklı tuzluluk (0, 1, 10 ppt) derişimlerindeki sularda civa etkisine akut (0,3 µM Hg, 3 gün) ve kronik (0,03 µM Hg, 30 gün) olarak maruz bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda balıklarda solungaç dokusunda Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Mg^{+2}-ATPaz ve Ca^{+2}-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca^{+2} - ATPaz aktivitesi ölçülmüştür.
2. Deney süresince *O. niloticus*' larda sadece 0 ppt tuzluluktaki 0,03 µM Hg^{+2} etkisinde bir adet ölüm gözlenmiştir.
3. Solungaçta, Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitesi akut süreçte anlamlı bir değişim göstermezken, kronik süreç sonunda 10 ppt tuzlulukta Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda anlamlı artış görülmüştür.
4. Solungaçta, Mg^{+2}-ATPaz aktivitesi akut ve kronik süreç sonunda artış gösterirken bu artışların 1 ve 10 ptt tuzlulukta Hg^{+2} etkisinde kalan balıklarda anlamlı artış görülmüştür.
5. Solungaçta, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi akut süreçte anlamlı bir değişim göstermezken, kronik süreç sonunda tüm balıklarda anlamlı artış görülmüştür.
6. Kasta, Ca^{+2}-ATPaz aktivitesi akut süreçte anlamlı bir değişim göstermezken, kronik süreçte artış göstermiştir. Bu artışların 1 ve 10 ppt Hg^{+2} tuzluluk etkisinde kalan balıklarda anlamlı olduğu görülmüştür.
7. Toplam protein düzeyleri ise genel olarak herhangi bir değişiklik göstermemiştir.

5.2. Öneriler

1. Bu çalışma tuzluluğun ve tuzluluk ile metalin ATPaz enzimleri üzerinde meydana getirdiği değişimleri inceleyerek, osmoregülasyon sistemin subletal metal kirliliği için duyarlı bir belirteç olarak kullanılabilme potansiyelini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Bilindiği gibi metal toksisitesini etkileyen faktörler arasında tuzluluğun yanında su sertliği, pH ve organik madde içeriği de sayılmaktadır.
2. Doğal ortamlarındaki metal etkilerini gözlemlemek için deniz ve tatlı su balıkları karşılaştırmalı olarak incelenebilir.
3. Farklı balık türlerinde yapılacak ATPaz aktivite ölçümleri kullanılarak bu türlerin toksisite mekanizmalarının duyarlığı ve dirençliği arasında bir karşılaştırma yapılabilir.
4. Enzimatik veya enzimatik olmayan başka mekanizmaların metal ve tuzluluk etkilerine verdiği cevaplar sonucunda bunların biyoindikatör olma potansiyelleri değerlendirilebilir.
5. Metallerin toksik etkilerinin belirlenmesinde kullandığımız ATPaz enzimlerinin yanında oksidatif hasarın tanısında önemli olan antioksidan enzimleri de ölçülebilir.

KAYNAKLAR

Alves, L.C., Glover, C.N. and Wood C.M., 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archives of Environmental Contamination andToxicology, 51: 615-625.

Anderson, M.B., Preslan, J.E., Jolibois, L., Bollinger, J.E., and Gearge, W.J., 1997. Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp clayfish (*Procambarus clarkii*). Journal of Hazardous Materials, 54: 15-29.

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

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

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. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana, 206.

Atlı, G., and Canlı, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology, 20: 1861–1869.

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

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

Baysoy, E., 2012. Tatlı Su Balığı *Oreochromis niloticus*'un ATPaz Aktivitelerine Metal (Cr, Pb) ve Tuzluluğun etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, 43.

Berntssen, M. H. G., Aatland, A., and Handy, R. D., 2003. Chronic Dietary Mercury Exposure Causes Oxidative Stress, Brain Lesions, and Altered Behaviour in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) parr. Aquat. Toxicol. 65: 55–72.

Bervoets, L., Campenhout, K.V., Reynders, H., Knapen, D., Covacı, A., and Blust, R., 2009. Bioaccumulation of Micropollutants and Biomarker Responses in Caged Carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 720-728.

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

Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., and Walsh, P.J., 2005. Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertabretes. Aquatic Toxicology, 72:67-82.

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

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

Carvalho, Cs, and Fernandes, Mn (2006) Effect of temperature on copper toxicity and haematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high Ph. Aquaculture 251: 109-117.

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

Canlı, M., ve Atlı, G., 2003. The Relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe,Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. Environmental Pollution, 121: 129-136.

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

Cihangir, N. ve Sağlam, N. 1997 "Phanerochaete chrysosporium ME-446 ile Ağır Metallerin Biyosorbsiyonu Üzerine Çalışmalar" DOĞA Tr. Journal Of Biology (21) 267 -272p.

Dautremepuits, C., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., and Vernet, G., 2004. Modulation in Hepatic and Head Kidney Parameters of Carp (*Cyprinus carpio* L.) Induced by Copper and Chitosan. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 137: 325–333.

De Boeck, G., Hattink, J., Franklin, N.M., Bucking, C.P., Wood, S., Walsh, P.J., and Wood, C.M., 2007. Copper Toxicity in the Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) Urea Loss Contributes to the Osmoregulatory Disturbance. Aquatic Toxicology, 84: 133-141.

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

Diaz, M., Cozzi, S., Almansa, E., CasarİegO, M., Bolanos, A., Cejas, J., and Lorenzo, A., 1998. Characterization of Intestinal Na^{+}-K^{+}-ATPase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a Tissue-Specific Heterogeneity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 121: 65 76.

Doğan., Z., 2013. Ca^{+2}, Pb^{+2} ve Ca^{+2}+ Pb^{+2} Etkisinde Kalan Balık (*Oreochromis niloticus*) Dokularında Na^{+}/K^{+}-ATPaz, Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz Aktivitelerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, 43.

Dorea, J. G., 2006. Fish meal in animal feed and human exposure to persistent bioaccumulative and toxic substances. Journal of Food Protection, *69* (11): 2777– 2785.

Douben, P. E. T., 1989. Uptake and elimination of waterborne cadmium by the fish *Neomacheilus barbatulus* (Stone Loach). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 18: 576-586.

Doudoroff, P., and Katz, M., 1953. Critical Review of Literature on the Toxicity of Industrial Wastes and Their Components to Fish: II The Metals, as Salts. Sewage Ind. Wastes 25: 802–839.

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

Ezemonye Lin, Ogeleka D.F., and Okieimen F.E., 2008. Lethal toxicity ofindustrial chemicals to early life stages of *Tilapia guineensis*. Journal of Hazardous Materials 157: 64-68.

Flik, G., Van Rijs, J.H., and Wendelaar Bonga, S.E., 1985. Evidence for High-affinity Ca^{2+}-ATPase Activity and ATP-driven Ca^{2+}-transport in Membrane Preparations of the Gill Epithelium of the Cichlid Fish *Oreochromis mossambicus*. Journal of Experimental Biology, 119: 335-347.

Fuentes, J., Soengas, Jl., Buceta, M., Otero, J., Rey, P. and Rebolledo, E., 1996. Kidney ATPase Response in Seawater-Transferred Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).Effect of Salinity and Fish Size.Journal of Physiology and Biochemistry,52(4):231-238

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

Giari, L., Simoni, E., Manera, M., and Dezfuli, B., 2008. Histo-cytological Responses of Dicentrarchus Labrax (L.) Following Mercury Mxposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 70, 400–410.

Gill, T. S., Tewari, H., and Pande, J., 1990. Use of the Fish Enzyme-System in Monitoring Waterquality Effects of Mercury on Tissue Enzymes. Comp. Biochem. Physiol. C 97: 287–292.

Gillis P.L., Mitchell R.J., Schwalb A.N., Mc Nichols K.A., Mackie G.L., Wood C.M., et al. 2008. Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: assessing the effect of copper hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species. Aquatic Toxicology 88: 137-145

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

Güner, Y., Özden, O., 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.

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

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

Hilmy, A.M., Abd El-Hamid, N.F., and Ghazaly, K.S., 1988. Variation of Zinc and Copper Levels with Sex and Size in Different Tissues of the Crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus). Folia Morphologica, 2: 160-166.

Kato, A., Doi, H., Nakada, T., Sakai, H., and Hirose, S., 2005. Takifugu obscurus is a Euryhaline Fugu Species Very Close to Takifugu rubripes and Suitable for Studying Osmoregulation. BMC Physioloy, 5:18.

Kim A.D., Gu M.B., Allen H.E., and Cha D., 2001. Physiochemical factors affecting the sensitivity of Ceriodaphnia bulba to copper. Environmental Monitoring and Assessment, 70:105-106.

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

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

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

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

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. and Baramaki, R., 2011. Influence of water hardness and pH on acute toxicity of Hg on freshwater fish *Capoeta fusca* World Journal of Fish and Marine Sciences, 3 (2): 132-136.

Mathan, R., Kurunthachalam, S. K., and Priya, M., 2010. Alterations in Plasma Electrolyte Levels of a Freshwater Fish *Cyprinus carpio* Exposed to Acidic pH. Toxicological and Environmental Chemistry, 92(1): 149-157.

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

Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L, Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S.C., Ferreiracravo, M., Ventura-Lima, J., and Bianchini, A., 2007. Pollution Biomarkers in Estuarine Animals: Critical Review and New Perspectives Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 146: 221-234.

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

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

Parvez, S., Sayeed, I., and Raisuddin, S., 2006. Decreased Gill ATPase Activities in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to a Diluted Paper Mill Effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 62–66.

Poopal, R. K., Ramesh, M., & Dinesh, B. (2013). Short-term mercury exposure on Na+/K+-ATPase activity and ionoregulation in gill and brain of an Indian major carp, Cirrhinus mrigala. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 27(1), 70-75.

Radi A.A.R., and Matkovics B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. Comparative Biochemistry Physiology C, 90: 69-72.

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

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

Roche, H., and Boge, G., 1993. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. Toxicology In vitro, 7: 623-629.

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

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., and Andreu-Molıner, E., 2003. Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 434–441.

Saoud P., Sawsan Kreydiyyeh, Antoine Chalfoun, and Mazen Fakih., 2007. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na^+–K^+–ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*, 183-190

Satyavathi, C. and Rao, Y. P., 2000. Inhibition of Na+, K+-ATPase in *Penaeus indicus* Postlarvae by Lead. Comparative Biochemstry Physiology, C. 127: 11-22.

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

Silbergeld, E. K., Silva, I. A., & Nyland, J. F., 2005. Mercury and autoimmunity: Implications for occupational and environmental health. Toxicology and Applied Pharmacology, 207 (2 Suppl): 282–292.

Sloman, K. A., Morgan, T. P., Mcdonald, D. G. and Wood, C. M., 2003.Socially-induced Changes in Sodium Regulation Affect the Uptake of Waterborne Copper and Silver in the Rainbow trouth, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology, C. 135: 393-403.

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

Snarski, V. M., and Olson, G. F., 1982. Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Mercuric Chloride in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 2: 143–156.

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

Thaker, J., Chhaya, J., Nuzhat, S., Mittal, R., Mansuri, A.P., and Kundu, R., 1996. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dipes*. Toxicology 112: 237–244.

Türkmen, A., Türkmen, M., Tepe, Y., and Naz, M., 2004. İskenderun Körfezi Deniz Suyu Ağır Metal Konsantrasyonları ile Sıcaklık, pH, Oksijen ve Tuzluluk Değerleri Arasındaki Korelasyonlar. Mustafa Kemal Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 385-392.

Vasić, V, M., Čolović M, B., and Krstıć, D, Z., 2009. Mechanism of Na^+/K^+ATPase and Mg^{2+}-ATPase Inhibition by Metal Ions and Complexes. Society of Physical Chemists of Serbia, 63 (5a): 499-509.

Verbost, P.M., Flik, G., Lock, R.A.C., and Wendelaar Bonga, S.E., 1988. Cadmium Inhibits Plasma Membrane Calcium Transport. Journal of Membrane Biology, 102: 97-104.

Verger, P., Houdart, S., Marette, S., Roosen, J., and Blanchemanche, S., 2007. Impact of a risk–benefit advisory on fish consumption and dietary exposure to methylmercury in France. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 48: 259–269.

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

Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabbri, R., and Orunesu, M., 1993. Effects of Heavy Metals on the Ca^{2+}-ATPase Activity Present in Gill Cell Plasma-membrane of Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 106 (3): 655-660.

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

Watson, T.A., and Beamish, F.W.H.,, 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.

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

Wobeser, G., 1975a. Acute Toxicity of Methylmercury Chloride and Mercuric Chloride for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fry and Fingerlings. J. Fish. Res. Board Can. 32: 2005–2013.

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

Wrıght, D.A.. and Welbourn, P ., 2001. Environmental Toxicology Cambridge University Press, USA, 227-304

http://proteopedia.org/wiki/index.php/Ouabain

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladı. Çukurova Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu ve 2014 yılında Biyoloji Bölümü Moleküler Ekotoksikoloji Laboratuvarında yüksek lisansa başladı.