



**BAKIR PİRİTİYON’UN İKİ TÜR TATLI SU BİVALVİ ÜZERİNDEKİ
EKOTOKSİKOLOJİK ETKİLERİ**

Elif PAÇAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2017

Elif PAÇAL tarafından hazırlanan “BAKIR PİRİTİYON'UN İKİ TÜR TATLI SU BİVALVİ ÜZERİNDEKİ EKOTOKSİKOLOJİK ETKİLERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Burçin Aşkım GÜMÜŞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

B. Aşkım
.....

Başkan: Prof. Dr. Figen ERKOÇ

Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Fi. Erkoç
.....

Üye: Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Ayhan.
.....

Üye: Prof. Dr. Selma SEVEN ÇALIŞKAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Selma
.....

Üye: Prof. Dr. A. Çağlan GÜNAL

Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

çaglan
.....

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2017

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif PAÇAL

14/07/2017

BAKIR PİRİTİYON'UN
İKİ TÜR TATLI SU BİVALVİ ÜZERİNDEKİ EKOTOKSİKOLOJİK ETKİLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Elif PAÇAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2017

ÖZET

Bu çalışmada, gemilerde kullanılan antifouling boyalar içerisinde bulunan yükseltici biyosit bakır piritiyon'un (CuPT) iki tür tatlı su bivalvi (*Dreissena polymorpha*, *Unio mancus eucirrus*) üzerindeki akut toksik ve subletal etkileri belirlenmiştir. Probit Analiz Yöntemi kullanılarak LC₅₀ değerleri (µg/L) ve %95 güven aralıkları *D. polymorpha* 48.saat LC₅₀ değeri 7,32 (hesaplanamadı), 72.saat LC₅₀ 52,72 (17,30-hesaplanamadı), 96.saat LC₅₀ 23,88 (13,120-1040,40), 7. gün LC₅₀ 8,72 (Hesaplanamadı) olarak hesaplanmıştır. Subletal deneyde *U. mancus eucirrus* tatlı su midyesi kullanılarak önceden saptanan subletal değer olan 5 µg/L bakır piritiyon uygulanmıştır. Deney sonucunda midyelerin ağırlık, uzunluk, kalınlık ve yükseklik parametreleri ölçülmüş, total hemosit sayısı, doku malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerine etkisi belirlenmiştir. Total hemosit sayısı bakır piritiyon'a maruz kalma sonucunda kontrole göre artış göstermiştir ($p > 0,05$). Solungaç dokularındaki MDA düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak artmıştır ($p > 0,05$). Sindirim bezi MDA düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$). Solungaç dokularındaki GSH düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak artmıştır ($p > 0,05$). Sindirim bezi GSH düzeyi 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$). Sonuç olarak; bakır piritiyon'un tatlı su midyesi *D. polymorpha* üzerinde akut maruziyette yüksek toksik etkisi olduğu belirlenmiştir. *U. mancus eucirrus* üzerinde subletal konsantrasyonda bakır piritiyon'un lipid peroksidasyon ve glutatyon düzeylerinin etkilendiği belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20302

Anahtar Kelimeler : Biyodeney, bakır piritiyon, *Dreissena polymorpha*, *Unio mancus eucirrus*, total hemosit sayısı, malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH)

Sayfa Adedi : 65

Danışman : Doç. Dr. Burçin Aşkım GÜMÜŞ

ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF COPPER PYRITHIONE ON THE TWO
SPECIES OF FRESHWATER BIVALVE

(M. Sc. Thesis)

Elif PAÇAL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2017

ABSTRACT

In this study, acute and sublethal toxic effects of copper pyrithione (CuPT) used as antifouling agent/biocide in ship paints were investigated using two fresh water bivalve species: *Dreissena polymorpha*, *Unio mancus eucirrus*. LC₅₀ values as µg/L and their 95% confidence intervals for *Dreissena polymorpha* were calculated as: 48 h 7,32 (unavailable), 72 h 52,72 (17,30-unavailable), 96 h 23,88 (13,120-1040,40), 7. day 8,72 using Probit Analysis Method. Sublethal concentration of 5 µg/L copper pyrithione was applied to fresh water mussel *U. mancus eucirrus*, based on preliminary experiments, for the sublethal exposure experiments. Weight, length, thickness and height parameters of the mussels were measured at the end of the experiments and effects on total hemocyte count, tissue malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels were determined. Total hemocyte counts were increased as a result of exposure to copper pyrithione ($p > 0,05$). MDA levels in gill tissues increased statistically after 96 hours compared to the controls group ($p > 0,05$). However, MDA levels increased significantly in digestive gland tissue when compared with the controls ($p < 0,05$). GSH levels in the gill tissues increased statistically at the end of 96 hours according to the control group ($p > 0,05$). GSH levels in digestive gland increased significantly in digestive gland tissue when compared with the controls ($p < 0,05$). In conclusion, copper pyrithione was found to be highly toxic to fresh water mussel *D. polymorpha* after acute exposure. Copper pyrithione also showed impact on lipid peroxidation and GSH levels in *U. mancus eucirrus*.

Science Code : 20302

Key Words : Bioassay, copper pyrithione, *Dreissena polymorpha*, *Unio mancus eucirrus*, total hemocyte counts, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH)

Page Number : 65

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Burçin Aşkım GÜMÜŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü desteği ile yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili danışman hocam Doç. Dr. Burçin Aşkın GÜMÜŞ (Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca maddi manevi her türlü desteğini üzerimde hissettiğim, bilgi ve tecrübeleriyle bilimsel olarak ufkumu genişleten ve geliştiren, sevdiğim bilim yolunda adımlarımı daha karalı atmamda en büyük yardımcım olan sevgili hocam Prof. Dr. Figen ERKOÇ (Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi)'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarından faydalandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Aysel Çağlan KARASU, Yrd. Doç. Dr. Feriha YILDIRIM, Doç. Dr. Belda ERKMEN, Öğr. Gör. Göktuğ GÜL, Dr. Zuhal YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sayesinde tanıdığım hayatımda önemli bir yer edinen, yüksek lisans çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan canım arkadaşım Pınar ARSLAN'a teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmalarım boyunca emeğini esirgemeyen arkadaşlarım Gülsüm BATMAZ, Leila MEHRNİA ve Kevser YILMAZ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bütün hayatım boyunca beni maddi ve manevi her zaman destekleyen her kararında arkamda olan aileme, yüksek lisansa başlamam konusunda en büyük destekçim olan başta sevgili babam Sefer PAÇAL olmak üzere canım annem Semahat PAÇAL, ablalarım Gülşah KURU, Yüksel PAÇAL, Ayten TEZCAN ve Hacer ÇALIŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	5
2.1. Zebra Midye (<i>D. polymorpha</i>)’nin Sistematik Pozisyonu ve Biyolojik Özellikleri.....	5
2.2. <i>Unio mancus eucirrus</i> Türünün Sistematik Pozisyonu ve Biyolojik Özellikleri	8
2.3. Bakır Piritiyon ve Tatlı Su Canlılarıyla İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar	10
2.4. Antifouling Boyalar	13
2.5. Antifouling Boyanın Çalışma Prensibi	14
2.6. Antifouling Boyaların ve Bileşiklerin Sınıflandırması	16
2.6.1. Konvansiyonel antifouling boyalar	16
2.6.2. Ablatif (yüzeyden çıkma durumu)/hidrasyon antifouling boyalar	16
2.6.3. Self-polishing kopolimer antifouling boyalar (kendi kendini parlatan) ...	17
2.6.4. Biyosit içermeyen antifouling boyalar	17
2.7. Antifouling Sistemlerin Tarihsel Gelişimi ve Kullanımı	18
2.8. Antifouling Sistemlerle İlgili Yasal Düzenlemeler	20
2.9. Bakır Piritiyon’un Fiziko-Kimyasal Özellikleri	23

	Sayfa
2.10. Piritiyon Grubu Antifouling Bileşiklerin Etki Mekanizması	26
2.11. Bakır Piritiyon ile İlgili Yasal Düzenlemeler	27
2.12. Biyodeney ve Biyodeneylede Kullanılan Bazı Terimler	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Tatlı su midyelerinin temini	31
3.1.2. Deney ortamı ve adaptasyon periyodu	32
3.1.3. Deney düzeneği	32
3.1.4. Bakır piritiyon çözeltilerinin hazırlanması	34
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Deney yöntemi	35
3.2.2. Deney sonrası uygulanan işlemler	35
3.2.3. Tatlı su midyesinden (<i>U. mancus eucirrus</i>) hemolemf alınması ve toplam hemosit sayısının belirlenmesi	36
3.2.4. Tatlı su midyesinden (<i>U. mancus eucirrus</i>) dokuların çıkartılması	37
3.2.5. Doku analizleri	38
3.2.6. Doku analiz yöntemlerin uygulanması.....	38
4. BULGULAR	41
4.1. Bakır Piritiyon'un Tatlı Su Midyesi (<i>D. polymorpha</i>) Üzerine Akut Toksik Etkisi	41
4.2. Bakır Piritiyon'un Tatlı Su Midyesi <i>Unio mancus eucirrus</i> Üzerine Subletal Toksik Etkisi	46
4.2.1. Toplam ağırlık-uzunluk-yükseklik-kalınlık değerlerine ilişkin bulgular .	46
4.2.2. Toplam hemosit sayısına ilişkin bulgular	49
4.3. Doku Analizlerinden Elde Edilen MDA Bulguları	50
4.4. Doku Analizlerinden Elde Edilen GSH Bulguları	51
5. TARTIŞMA	53

Sayfa

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	65



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. İdeal antifouling boya formülü	16
Çizelge 2.2. Alternatif antifouling sistemler.....	19
Çizelge 2.3. Bakır piritiyon'un fiziksel ve kimyasal özellikleri	23
Çizelge 2.4. Sucul ortamda yaşayan canlılar üzerindeki LC ₅₀ 'ye göre toksisite dereceleri	25
Çizelge 2.5. Bakır piritiyon'un etki ettiği sucul canlılar	26
Çizelge 4.1. Zebra midye (<i>D. polymorpha</i>) üzerinde bakır piritiyon'un akut toksisitesi	41
Çizelge 4.2. <i>U. mancus eucirrus</i> türünde ağırlık, uzunluk, yükseklik, kalınlık parametreleri.....	48
Çizelge 4.3. <i>U. mancus eucirrus</i> türünde toplam hemosit sayısı	49
Çizelge 4.4. Dokulardan elde edilen toplam MDA değerleri	51
Çizelge 4.5. Dokulardan elde edilen toplam GSH değerleri	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bakır piritiyon'un moleküler formülü	23
Şekil 4.1. Tatlı su midyesi (<i>D. polymorpha</i>) üzerine CuPT'nin 48 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği	42
Şekil 4.2. Tatlı Su Midyesi (<i>D. polymorpha</i>) üzerine CuPT'nin 72 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği	43
Şekil 4.3. Tatlı Su Midyesi (<i>D. polymorpha</i>) üzerine CuPT'nin 96 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği	44
Şekil 4.4. Tatlı Su Midyesi (<i>D. polymorpha</i>) üzerine CuPT'nin 7 günlük akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği	45
Şekil 4.5. Kontrol ve deney grubu toplam ağırlığın boxplot grafiğinde karşılaştırılması	46
Şekil 4.6. Kontrol ve deney grubu toplam uzunlukların boxplot grafiğinde karşılaştırılması	47
Şekil 4.7. Kontrol ve deney grubu toplam yüksekliklerin boxplot grafiğinde karşılaştırılması	47
Şekil 4.8. Kontrol ve deney grubu toplam kalınlıkların boxplot grafiğinde karşılaştırılması	48
Şekil 4.9. Kontrol ve deney grubu hemosit sayılarının boxplot grafiğinde karşılaştırılması	49
Şekil 4.10. Kontrol ve deney grubunun toplam MDA düzeyi farkları boxplot grafiğinde karşılaştırılması	50
Şekil 4.11. Kontrol ve deney grubunun toplam GSH düzeyi farkları boxplot grafiğinde karşılaştırılması	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Zebra midyeler (<i>D. polymorpha</i>)	5
Resim 2.2. <i>U. mancus eucirrus</i> kabuk görüntüsü	9
Resim 2.3. <i>U. mancus eucirrus</i> morfolojik yapısı	9
Resim 2.4. Biyositlerin boya filminden çıkışları.....	14
Resim 2.5. Standard bir antifouling boyanın etki mekanizması	15
Resim 3.1. Karasu Çayı (Sinop)	32
Resim 3.2. Zebra midye (<i>D. polymorpha</i>) biyodeney düzeneği	33
Resim 3.3. <i>U. mancus eucirrus</i> biyodeney düzeneği	34
Resim 3.4. <i>U. mancus eucirrus</i> ölçümleri; a) uzunluk b) yükseklik c) kalınlık	36
Resim 3.5. <i>U. mancus eucirrus</i> hemolemf sıvısı alınması	37
Resim 3.6. <i>U. mancus eucirrus</i> dokuları; a) solungaç b) sindirim bezi	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nM	NonoMolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

AB	Avrupa Birliği
CuPT	Bakır Piritiyon
DSİ	Devlet Su İşleri
EPA	Çevre Koruma Ajansı
IMO	International Maritime Organization
LC₅₀	Deney hayvanlarının yarısını öldüren konsantrasyon
LD₅₀	Deney hayvanlarının yarısını öldüren doz
MEPC	Marine Environment Protection Committee
NOEC	No Observed Effect Concentration
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
THSK	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
ZnPT	Çinko Piritiyon

1. GİRİŞ

Üç tarafı denizlerle çevrili ülkemizde deniz araçlarından yoğun bir şekilde yararlanılmaktadır. Deniz araçları, denizde hareket ederken sahillerimizi ve önemli limanlarımızı geri dönüşü mümkün olmayacak bir şekilde antifouling (çürüme önleyici) boyalardan salınan kimyasallarla kirletebilir. Ayrıca birçok akarsu, göl, nehir ve çay denizlere; denizlerde okyanuslara bağlantı sağlar ve bu şekildeki su döngüsünde bir bölgedeki kirlenme bütün sucul bölgelerde etkisini gösterebilir. Bu nedenle, ülkemiz kıyılarında rutin aralıklarla antifouling biyositlerin konsantrasyonlarının tespit edilmesi gerekmektedir.

Biyolojik kirlenmede istilacı türlerin yayılması; teknik problemler, deniz operasyonları için ekonomik zorluklar, aynı zamanda çevre sorunları oluşturmuştur. Bu durumdan dolayı son on yılda çeşitli antifouling teknolojileri geliştirilmiştir. Bunlar UV ışınları, sesüstü dalga, elektrik olmak üzere polimerik kaplamalar ve antifouling boyalarda öz parlatma sistemleridir. Fakat korumak için en yaygın uygulama biyosit içeren antifouling boyalar olmuştur. Birçok güçlendirici biyosit deniz ortamında hedef olmayan canlılar üzerinde biyosidal etkiye sahiptir (Qian, Chen ve Xu, 2013).

Yüzeyler üzerinde çeşitli mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların birikmesi olayına biyofouling denir. Deniz ortamında saatler ve günler içerisinde bakterilerden oluşan biyofilm tabakası meydana gelir. Haftalar sonunda diatom ve protozoa'dan oluşan başka bir biyofilm tabakası oluşmuş olur. Bu aşamadan sonra aylık ve yıllık dönemlerde alg sporları, hayvan larvaları oluşmaya başlar ve ileriki aşamalarda bu organizmaların yetişkinleri oluşarak biyofouling tabakasını genişletmiş olurlar. Sucul sistemlerde oluşan biyofouling tekne yüzeylerinde birikerek tekneye birçok açıdan zarar verir. Bunun önlenmesi içinde biyosit içeren antifouling boyalar kullanılır.

Antifouling boyalar bir tür biyosidal üründür. Biyosidal ürün; bir veya birden fazla aktif madde içeren, kullanıma hazır halde satışa sunulmuş, kimyasal ve biyolojik açıdan herhangi bir zararlı organizma üzerinde kontrol edici etki gösteren veya hareketini kısıtlayan, uzaklaştıran, zararsız kılan, yok eden aktif maddeleri ve müstahzarları (kullanıma hazır hale getirilmiş) olarak tanımlanır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Biyosidal Ürün Yönetmeliği [THSK], 2009).

Antifouling bileşikler, birçok organizmada çeşitli zararlı etkilere neden olur; alg fotosentezi, enerji üretimi, stres yanıtları da olmak üzere biyolojik çeşitli aktiviteler, genotoksik hasar, bağışıklık sistemi baskılanmış protein ekspresyonu, oksidasyonu, sinir iletimini, yüzey kimyasını, biyofilm oluşumunu ve yapışkan üretimini etkiler (Qian ve diğerleri, 2013).

Ülkemizde piyasada bulundurulmasına izin verilen bozunmayı önleyici ürünlerde en çok zineb ve dicopper oxide ikilisi (%13,16) ile copper pyrithione (bakır piritiyon) ve dicopper oxide ikilisi (%81,58) kullanılmaktadır ve bu ürünlerin tamamı profesyonel kullanıcılara yöneliktir. Zineb ve copper pyrithione, Avrupa Birliği'nin biyosidal ürünlerin aktif maddelerinin değerlendirilmesine ilişkin programı kapsamında değerlendirilmiştir. Zineb 2014 yılında, copper pyrithione (bakır piritiyon) ise 2015 yılında bozunmayı önleyici ürünlerde aktif madde olarak kullanımına onay verilen kimyasallardandır, dicopper oxide ise halen değerlendirilmekte olan bir kimyasaldır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı Bilgilendirme Broşürleri [THSK], 2015).

Bakır piritiyon esas olarak antimikrobiyal olarak kullanılır. Yüksek konsantrasyonlarda tekrarlanan maruz kalmalar sonucu iskelet kası atrofisi, periferik sinir hasarı hayvan çalışmalarında rapor edilmiştir (Arch Chemicals, 2010). Bakır piritiyon son derece etkin geniş spektrumlu bir biyosit olup birçok sucul canlı üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Balıklarda notokord anormallikleri, kas liflerinde dağınıklık, oksidatif stres oluşumu (Trombetta, 2015), deniz kestanesinde erken embriyogenez döneminde embriyotoksik olduğu ve embriyolarda mortalite görüldüğü bildirilmiştir (H. Wang, Li, Huang, Xu, ve Y. Wang, 2011).

Biyoindikatör tür, belli çevre koşullarının ya da tür topluluklarının göstergesi olarak kullanılabilen türlerdir. Bu türler besin zincirinin her halkasından seçilip kullanılmakta ve sucul alanların ağır metal kirliliği hakkında bilgi edinilmesi sağlanmaktadır. Biyoindikatör olarak kullanılan organizmaların büyük bir çoğunluğunu dibe bağlı yaşayan ya da çok yavaş hareket edebilen bentik canlılar oluşturmaktadır. Belirli bir bölgede yaşayan bentik grubu canlıları sediment içinde gömülü yaşadıkları gibi sediment üzerinde de yaşamaktadır. Gerek bu ortamdan beslenmeleri gerekse yaşamaları nedeniyle kirliliğe yoğun bir şekilde maruz kalırlar. Yavaş hareket etmeleri sebebiyle ortamdan uzaklaşmaları

yavaş olmakta ya da çoğu sesil türler gibi ortamda sabit kaldıklarından kirliliğin etkisiyle ölümler görülebilmektedir (Başçınar, 2009).

Sulardaki kirlilik izleme çalışmalarına bakıldığında, omurgasızlar biyotik faktörlerin sağlam kontrolünü sağladıkları için önemli seçeneklerdir. Midyeler denizlerde bol miktarda bulunmaları, metalleri yüksek yoğunluklarda biriktirip, bunları uzun bir süre bünyelerinde tutmalarından dolayı sularda kirliliği yansıtan biyolojik indikatörlerin başında gelir. Zebra midye (*Dreissena polymorpha*), denizlerde ve tatlı sularda yaşayan istilacı türlerin başında gelir. Yaşadıkları bölgelerde birçok zarara neden oldukları için son zamanlarda bu canlılarla mücadele için birçok yöntem geliştirilmektedir. Kolay temin edilen ve türü, biyoçeşitlilik açısından tehdit altında olmayan zebra midyeleri ekotoksikolojik araştırmalarda belirtilen özelliklerinden dolayı kullanışlı biyoindikatör tür olarak tercih edilmesini sağlamaktadır; geniş yayılım, yıl boyu temin edilme imkanı, yeterli vücut büyüklüğü, sesil organizma olmaları, kolay örneklenmeleri, 3-5 yıl kadar yaşayabilmeleri ve laboratuvar şartlarına yüksek direnç göstermemeleri, hem lentik hem de lotik sularda ve nehir ağızlarında yaşayabilmeleri bu canlıları avantajlı kılan özellikleridir. Diğer taraftan zebra midyelerinin filtreleme kapasiteleri çok yüksek olduğundan çevresel kirleticileri hızla almakta ve biyomonitoring çalışmalarında büyük avantaj sağlamaktadır. %5'e kadar tuzluluğu tolere edebildiği için gametlerini çevre sulara serbestçe salabilmektedir. Avrupa ülkelerinde 200 yıldır çok yaygın bulunduğu fizyolojik, anatomik ve ekolojik özellikleri detaylı çalışılmıştır (Binelli, Torre, Magni ve Parolini, 2015).

Unio mancus eucirrus türü biyoindikatör olarak kullanılabilecek, ekotoksikolojik çalışmalara fizyolojik olarak uygun, bir canlı türüdür. *Unio*'lar kirlilik stresine maruz kalarak ortadan kaybolan ilk canlılar olarak bildirilmiştir. *Unio* cinsinin tercih edilmesinde; çevresel kirleticilerin seviyelerine karşı hassas olması, sesil yaşamaları, uzun ömürlü olmaları, çok geniş yayılım alanına sahip olmaları, kirletici analizleri için yeterli dokuyu kolayca sağlayacak büyüklükte olmaları bu canlıları toksik çalışmalarda kullanmak için avantaj sağlar (Hassel ve Farris, 2007).

Yapılan literatür taramalarında sucul alanlardaki kirliliğin izlenmesinde hedef olmayan organizmalar grubunda olan ve en çok etkilenen bentik canlılar olan kabuklular üzerindeki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un, iki tür tatlı su

midyesi üzerindeki ekotoksikolojik etkisinin incelendiği bir çalışma tespit edilmemiştir. Bu çalışmada bakır piritiyon'un zebra midye (*D. polymorpha*) üzerindeki 96 saatlik akut LC₅₀ değeri ve *U. mancus eucirrus* üzerindeki subletal etkisi incelenmiştir. Subletal etkiye maruz kalan *U. mancus eucirrus* türünün total hemosit (omurgasızlarda kan hücrelerinin genel adı) sayısı ile solungaç ve sindirim bezi dokularındaki MDA, GSH değerlerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgularla, omurgalı ve memeli hayvanlarla çalışmanın etik olarak sınırlı olduğu günümüzde alternatif olarak omurgasız trlerin yaygınlaşması ve bu türler üzerinde kaynak değerlerin belirlenmesi amacıyla bilgi alt yapısı oluşturulmuş, bentik canlı türleri olan midyelerin ekotoksikolojik çalışmalarda model organizma olarak kullanılabilirliği araştırılmış, doku lipid peroksidasyon düzeyi belirlenmiş, glutatyon tayin miktarı yapılarak litaratre katkı sağlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Zebra Midye (*D. polymorpha*)'nin Sistematik Pozisyonu ve Biyolojik Özellikleri

Alem: Animalia

Şube: Mollusca

Sınıf: Bivalvia

Takım: Cardiida

Üst Familya: Dreissenaceae

Familya: Dreissenidae

Cins: *Dreissena* (Beneden, 1835)

Tür: *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)

Dreissena polymorpha, yaygın olarak kullanılan zebra midye adını, kabukları üzerindeki siyah-beyaz şeritlerden almaktadır (Bobat, Hengirman ve Zaplethal, 2001). Kabuklarındaki şeritlerin renkleri koyu ve açık olarak değişebilir.



Resim 2.1. Zebra midyeler (*D. polymorpha*)

Zooplanktonlarla beslenmeleri sebebiyle yerel besin zincirlerine zarar verirler. Yerel yumuşakçaların ekolojik görevlerini yerine getirmelerini engelleyerek büyük ekonomik zararlara sebep olup, yerel midye türlerine yapışarak onları öldürürler. Zebra midyesi 7 ile 400 mikron aralığındaki organik ve inorganik parçacıkları süzebilir. Planktonları süzdükleri için suyun berraklığını arttırırlar, berraklık arttıkça, güneş ışığı daha derinlere ulaşabilir, bu da fotosentetik organizmaların daha derinlerde de gelişebilmesine imkân verir. Motorlara yapışırlar ve soğutma sularının bulunduğu sistemlerde kanalların tıkanmasına sebep olurlar.

Zebra midyenin dişileri genellikle bir yıl içinde üreme yeteneğine kavuşurlar. Suyu bırakılan yumurtalar, su içinde erkek eşey hücreleri ile döllenir. Dişi midye bir defada 40 000 adet yumurta yumurtlayabilir ve bir üreme mevsimi boyunca bıraktığı yumurta sayısı bir milyona ulaşabilir. Tüm yıl boyunca ılık olan sularda yumurtlama dönemi daha uzun olabilir. Yumurtaların kuluçka süresi 3-5 gündür. Yumurtadan çıkan kurtçuk ya da larvalar bir aya kadar uzayan sürelerle suda özgürce yüzer. Bu dönem planktonik dönem olarak da adlandırılır. Kurtçuk ya da larvalar yumurtadan çıktıklarında 80–100 mikron boyutundadır. Larvalar için en uygun gelişme sıcaklıkları 20-22°C'dir. Larvaları pasif yayılışlıdır. Bu süre sonunda larvalar, ayakları aracılığıyla tabanda sürünerek yerleşebileceği bir yer arar ve bu sırada boyutları 180–290 mikrona kadar ulaşmış olur. Larvanın tabana yerleşmesinden sonra genç midye dönemi ya da yerleşik dönem başlar. Larvalar tutunma yerlerine ya da tabana, vücutlarında ayaklarının yakınında bulunan ve saçak şeklinde ve güçlü iplikçiklerden oluşan tutunma organı ile bağlanır. Genç midyeler tutunmak için sert ya da kayalık yüzeyler ile kendi ergin bireylerinde ve sularda bulunan diğer canlılar üzerinde yerleşme gösterirler. Ergin döneme doğru midyelerin su hızlarının 2 m/s'nin üzerinde olduğu sularda tutunmaları güçleşir (Devlet Su İşleri [DSİ], 2012: 2).

Zebra midye hem su alma borucukları ve hem de su verme borucukları bulunan ve suyu süzerek beslenen canlılardır. Bir canlı, günde 1 litre suyu süzerek içindeki alglerle beslenebilir. Zebra midye bir yaşında iken boyutları 5-10 mm olup, 5 yıl kadar yaşamakta ve en çok 50 mm boya ulaşabilmektedir. Boyutlar yaşama yerine göre önemli ölçüde değişebilmektedir. Bu canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için kalsiyum önemli bir besin maddesidir ve en uygun yoğunlukları 25-125 ppm arasında değişmektedir. Midyenin yaşamını sürdürmesinde önemli olan diğer çevresel etkenler su sıcaklığı, pH ve çözünmüş

oksijendir. En uygun su sıcaklıkları 17–25°C'tur ve 31°C'un üzerindeki sıcaklıklar genellikle öldürücüdür (DSİ, 2012: 3).

Zebra midye Hazar Denizi havzasındaki Ural Irmağı ve kollarındaki bir tür topluluğundan Rus bilimci ve kâşif Pyotr Simon Pallas tarafından tanımlanmıştır. Zebra midye konusundaki araştırmalara, son 150 yılda, midyenin doğal yayılış alanlarından Avrupa'daki tatlı sulara bulaşmasıyla başladığı, 1988'de Kuzey Amerika'ya girmesiyle de çalışmaların yoğunlaştığı anlaşılmaktadır. 18. yüzyılın sonları ile 19. yüzyılın başlarında, çok geniş alanlarda inşa edilen kanallar aracılığıyla Avrupa'nın bütün büyük boşaltma kanallarına yayılmıştır (DSİ, 2012: 1). İzleyen yıllarda yayılma alanı Danimarka, İsveç, Finlandiya, İrlanda ile diğer tüm Batı Avrupa'yı kapsayacak biçimde genişlemiştir. İngiltere'de ilk kez 1824 yılında belirlenmiştir. Bu kadar hızla yayılmasının nedeninin, son derece yüksek olan üreme ve uyum sağlama yeteneğinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Zebra midyeye Kuzey Amerika'da ilk kez 1988 yılında rastlanmış, ancak midyenin Amerika'ya ilk kez 1986 yılında girdiği kabul edilmiştir. Zebra midyenin büyük toplulukları ise ilk kez Kanada'nın Huron ve Erie Göllerini birbirine bağlayan St. Clair Gölünde saptanmıştır (Bobat ve diğerleri, 2001).

Zebra midye yurdumuzun pek çok tatlısu gölünde de doğal olarak bulunmaktadır. Bu doğal bulunuş, yaklaşık 600 milyon yıl öncesine dayanmaktadır. Paleozoyik'in Kambriyen dönemi başında, genişliği şimdiki Akdeniz kadar olan ve Çin'e kadar uzanan büyük bir okyanus kuşağında bulunmaktaydı. Ancak Kretase döneminde devamlı tektonik olaylar sonucu bu okyanusun kapsadığı alanda büyük değişimler olmuş ve Tersiyerin ikinci yarısında acı-tatlı su özelliğinde büyük bir iç deniz (Tethys Denizi) meydana gelmiştir. Bu deniz günümüzde üç ayrı su parçası (Karadeniz, Hazar Denizi ve Aral Gölü) halinde bulunmaktadır. Anadolu'nun oluşumu da Üst Kretase dönemine rastlamaktadır. Tersiyerin sonuna doğru tüm Anadolu deniz seviyesinden hemen hemen 1000 metrelik bir yükseliş göstermiş ve aslında bir acı su türü olan zebra midye Türkiye'nin akarsu ve göllerine Tethys Denizinin bir kalıtı olarak girmiştir. Yurdumuzda Çanakkale Yapıdak yöresindeki Neojen tabakaları içinde fosil olarak da bulunmuştur. Geldiay ve Bilgin (1973) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, zebra midyeye Göller Bölgesindeki Eğirdir, Kovada, Beyşehir ve Burdur Gölleri ile Marmara Bölgesindeki Sapanca Göl'ünde rastlandığı belirtilmiştir. Yine aynı kaynağa göre bu tür, genellikle çalkantılı ve akıntılı göl ve diğer su depolarında koloni halinde yaşamakta ve bazen su borularını ve kanalları tıkayacak kadar fazla

çoğalmaktadır. Hazar Denizi'nin ve Karadeniz'in yerli türüdür. Şu anda Birleşik Krallık (UK), Batı Avrupa, Kanada ve ABD'ye yayılmış bulunmaktadır (Bobat ve diğerleri, 2001).

Filtreleme sistemi sonucu olarak göller ve nehirlerin plankton topluluklarında büyük değişikliklere neden olabilir. Fitoplankton sayılarında azalma ve biyokütlede besin zincirinde balık larvaları ve diğer tüketicilerin gıdalarının sınırlanmasına neden olur. Zebra midye tarafından fitoplanktonun yüksek tüketimi suyun berraklaşmasında ekosistem fonksiyonlarında ve habitat da değişime neden olur. Yumuşak yüzeylerde yoğun kolonizasyon balık beslenmesini engelleyebilir ve sert yüzeylerde kolonizasyon balıkların yumurtlamasını etkiler. Zebra midye denitrifikasyon oranlarını arttırarak ekosistemdeki azot döngüsü sürecini etkileyebilir. Tatlı su midyeleri (Unionoida) en tehlikeli faunal grup olarak Kuzey Amerika'da türlerin % 60'ı için tehlike olarak kabul edilir.

2.2. *Unio mancus eucirrus* Türünün Sistematik Pozisyonu ve Biyolojik Özellikleri

Alem: Animalia

Şube: Coelomata

Sınıf : Bivalvia

Altsınıf : Eulamellibranchiata

Takım : Unionoida

Familya : Unionidae

Cins : *Unio* (Philipsson, 1788)

Tür : *Unio mancus eucirrus* (Bourguignat, 1860)

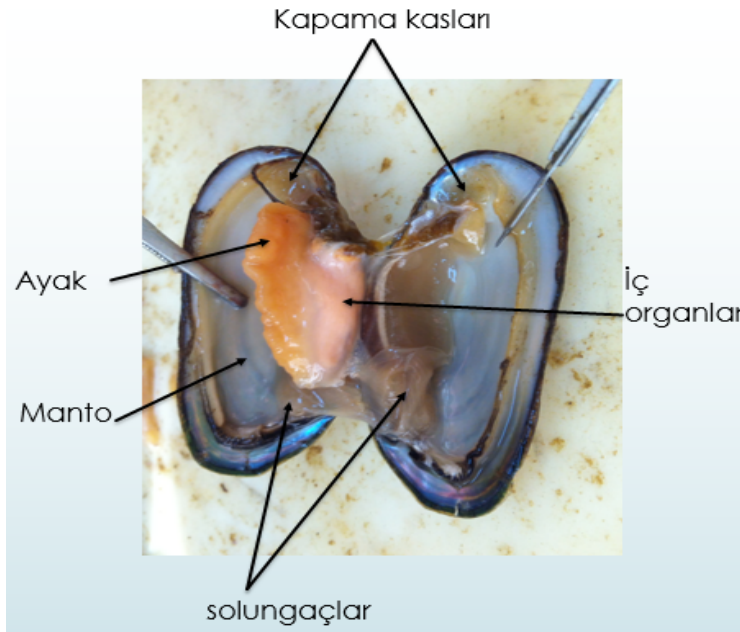
Unio cinsi taksonomisinin incelenmesi halen devam etmektedir, popülasyon büyüklüğü hala tam olarak bilinmiyor. Bu durumun nedeni biyolojik bilgilerin yetersizliği (Glochidium morfolojisi, üreme stratejileri, larval dönemde konakçı olduğu balık) ve popülasyonlardaki eksik moleküler göstergelerdir. Bu sebeplerden dolayı tatlı su midyelerindeki kabuk morfolojisinin polimorfik olması *Unio*'nun temelini oluşturmaktadır (Araujo, Gómez ve Machordom, 2005). Türkiye'de çeşitli araştırmacılar tarafından *Unio* cinsine ait altı tür (*Unio pictorum*, *Unio hueti*, *Unio terminalis*, *Unio elongatulus*, *Unio tigridis*, *Unio stevenianus*) saptanmıştır. Türkiye'de *U. mancus eucirrus* türüne Bekteşaga Göleti'nde (Öktener, 2004) ve Karasu Çay'ında rastlanmıştır.

Genelde tatlı sularda yaşarlar. Kabukları ön (anterior), arka (posterior), karın (ventral), sırt (dorsal) olmak üzere dört kısmı ayrılır. İki kabuğu birbirine elastik ligament bağlar.



Resim 2.2. *U. mancus eucirrus* kabuk görüntüsü

Midye kabuklarının iç kısmı sedef madde ile kaplıdır. Midyenin iki adet solungacı vardır ve bunlar ayak kısmının yanında bulunur. Anterior kısmında her iki kabukta kapama kasları mevcuttur. İç organlar dorsal kısma tutunmuştur, kabuğun iç kısmında manto boşluğu bulunur.



Resim 2.3. *U. mancus eucirrus* morfolojik yapısı

Bu tür, Akdeniz Bölgesi boyunca, Kuzeydoğu Afrika'da ve Orta Doğu'da, Kuzeydoğu İspanya'da bulunabilir. Avusturya, Bosna-Hersek, Hırvatistan, Kıbrıs, Fransa, Yunanistan, İtalya, Lübnan, Karadağ, Slovenya, İspanya, İsviçre, Suriye ve Türkiye'de mevcuttur.

Unionoidae familyasının neredeyse kozmopolit bir yapıdadır ama özellikle Kuzey Amerika'da en büyük çeşitliliğine ulaşır. Unionidae midyeleri, su ekosistemlerinde ekolojik ve ekonomik açıdan çok önemlidir. Diğer bentik türlere göre biyokütleleri oldukça büyüktür. Kirliliğe karşı oldukça hassastırlar.

Çoğu *Unio spp.*, *Unio mancus*, muhtemelen ilkbahar ve yaz aylarında yumurta üretme kapasitesine sahiptir. Bu tür, kumlu zeminli duran su habitatlarını tercih eder ve genellikle ağaç kökleri arasında bulunur. Tatlısu nehirleri, gölleri ve kanallarda bulunur. Balıklarda konakçı olabilirler.

Genel olarak tatlı su midyeleri ayrı eşeyli olmakla beraber çok nadir olarak hermofroditlik görülür. Olgun erkeklerde gonadlar krem-beyaz, dişilerde ise portakal sarısı tonlarındadır. Kabuklar kapalı iken cinsiyet ayrımı yapılamaz. Sperm ve yumurtanın döllenmesi ile glochidia larvası oluşur (Keskinbalta, 2015).

2.3. Bakır Piritiyon ve Tatlısu Canlılarıyla İlgili Yapılan Önceki Çalışmalar

Dahllöf ve diğerleri tarafından (2005: 22, 23) yılında yapılan çalışmada deniz suyunda CuPT (Bakır piritiyon) ve ZnPT (Çinko piritiyon) için bozunma zamanının dolaylı yoldan tahmini yapılmaya çalışılmıştır. Biyo-bozunma sulandırılmış ZnPT ve CuPT, steril deniz suyu veya doğal deniz suyunda incelenmiştir. Fotodegradasyon yarı ömrü ZnPT için $8,3 \pm 0,9$ dk ve CuPT $7,1 \pm 0,2$ dk olarak tahmin edilmiştir. ZnPT ve CuPT duyarlılığı, ZnPT ve CuPT fotosentez doz-cevap eğrileri elde edilerek ölçülmüştür. ZnPT ve CuPT değerleri sırası ile 2 ilâ 60 nM, 4 ilâ 25 nM olarak değişim göstermiştir. Ayrıca ZnPT duyarlılığı, hücre başına düşük fosfat konsantrasyonunu arttırmıştır ($< 0,2$ nmol/ hücre). CuPT suda toksisite ve fosfat konsantrasyonu arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Sonuç olarak, sucul ortamlarda ZnPT ve CuPT etkisi fitoplanktonlarda sınırlı olarak fosfatı artırabilir. Deniz suyunda CuPT ve ZnPT etkisi araştırılmıştır. EC_{50} CuPT ve ZnPT toksisitesi pelajik bakteri, yosun ve zooplankton toplulukları için 1,60-60 nM arasında değişmiştir. 0,001 nM/g kuru konsantrasyonu besin siklusunu etkilemiştir. Deniz

ortamında salınan tekne boyalarında mevcut ZnPT ve CuPT transchelated sonucunda CuPT daha istikrarlı ve pelajik canlılar için ZnPTden daha toksik bulunmuştur. Ayrıca ZnPT ve CuPT deniz ortamında birincil ve ikincil tüketim fonksiyonlarını ve besin döngüsünü etkileyebilir.

2006 yılında Mochida ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada antifouling bileşikler olan CuPT, ZnPT ve Cu'nın *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843) ve *Heptacarpus futilirostris* (Bate, 1888) üzerinde toksisitesi incelenmiştir. 96. saat LC₅₀ değeri CuPT ve ZnPT için kırmızı çipurada sırasıyla 9,3 ve 98,2 g/L, karides için 2,5 ve 120 g/L olduğu gözlemlenmiştir. Histolojik gözlemlerde solungaçlarda ikincil lamellerde hipoksi oluşması ölüme neden olduğu düşünülmüştür. Cu için LC₅₀ değeri kırmızı çipura ve karides için 84,4 ve 113 g/L olarak bulunmuştur.

Apostolos ve Isao tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada diuron ve CuPT'nin *Artemia franciscana* (Artemiidae) üzerindeki toksisitesi; tuzluluk ve sıcaklık etkisi incelenmiştir. Yüksek tuzluluk etkisinde CuPT'ye maruz kalma sonucu mortalite görülmüştür. Sıcaklık azalmasının CuPT'nin etkisini azalttığı gözlemlenmiştir.

Mochida ve diğerlerinin 2009'da yaptığı deneyde *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766) türü erken yaşam evresinde CuPT'ye maruz bırakılmıştır. Kuluçka, hayatta kalma, büyüme ve morfolojik anormallikleri ölçülmüştür. 2 ve 4 µg/L CuPT'ye maruz bırakıldığında hayatta kalma ve büyümenin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra morfolojik anormallikler, omurga deformitesi, yanal kaslarda inflamatuvar kitleler meydana gelmiştir.

Turner, Barrett, ve Brown tarafından 2009'da yapılan çalışmada denizdeki zemine oturan tekneden toplanan zehirli boya parçacıkları öğütülüp, statik akvaryumda tutulan, filtre beslenen *Mytilus edulis*'e uygulanmıştır. Cu and Zn konsantrasyonları 16 saat beslenme fazı ve 24saat temizlenme fazında deniz suyunda ölçüldü. İşlenmiş parçacıklardaki Cu ve Zn konsantrasyonları ve dağılımları, *M. edulis*'in besin açısından canlı silt olup olmadığına bakılmaksızın boya partiküllerini emdirdiğini ve parçacık ayırımı mekanizmasının belirgin olmadığını gösterdi. Organın diğer bölmelerinde (örn: kabuk, solungaç) artan konsantrasyonlar, sulu metalin biyotik ve abiyotik alımının da önemli olduğunu

belirtmekle birlikte, visseral toplulukta ve depürasyon sırasında sulu fazda Cu ve Zn zenginleştirmesi bu iddiaları destekledi.

Trombetta'nın 2010 yılında yaptığı çalışmasında juvenil *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814) üzerinde 2-64 mg/L CuPT'nin akut toksisitesini araştırmıştır. Deney sonucu solungaç dokularında çomak parmak şeklinde lamel, ödem, ikincil lamel füzyon, sırt yapılarının kaybı ve epitelde pul pul dökülme gözlenmiştir.

Romano, Rittscholf, McClellan-Green ve Holm 2010 yılında yaptıkları çalışmada Barnacle familyası ve populasyonları arasındaki bakır piritiyon'un toksisite değişimi, *Balanus amphitrite* (Darwin, 1854) naupli larvası üzerinde incelenmiştir. CuPT için naupli alttürünün LC₅₀ değerleri lokaliteler arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir (4,0 mg ve 6,1 mg). Aileler arasında larva ölüm değişimleri %15,1 ve %98,9 arasında değişmiştir.

Sureda ve diğerleri tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada zebra midye üzerinde biyositlerin kümülatif ve sinerjistik etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada zebra midye kontrolü için poli (dialildimetil amonyum klorür) ve potasyum klorür, ikili karışımın potansiyel etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak yetişkinlerde büyüklüğe göre etkinin değiştiği, veliger larvasında potasyum klorür dozunun etkisinin düşük olduğu belirlenmiştir. Karışımın yetişkinlerde hedef azaltma programında umut verici olduğu ancak veliger larvası için aynı durumun geçerli olmadığı düşünülmüştür.

Wang ve diğerleri tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada tek ve karışık antifouling maddeler (Bakır piritiyon, diklofluanid, tolifluanid, sea nine 211 ve Irgarol 1051) kullanılarak *Strongylocentrotus intermediatus*'un (denizkestanesi) erken embriyogenez üzerine toksisitesi değerlendirildi. Bu bileşiklerin toksik etkisi embriyogenez başarısını %50 azaltarak göstermiştir (EC₅₀). Embriyoları bireysel olarak etkileyen toksisite madde sırası CuPT > Sea nine > tolifluanid > diklofluanid > Irgarol 1051. Toksisite karışımları (ikili, üçlü, kuartern ve beşli) indeksi değerlendirildi ve bakır piritiyon-sea nine 211 kombinasyonu EC₅₀ değeri 7,87 nM olarak belirlendi. Sea Nine 211- tolifluanid arasında antagonist etki gözlenmiştir. Beş organik kimyasallar arasında CuPT embriyolar üzerine en toksik bileşik olmuş çok düşük konsantrasyonlarda bile (0,15-33,75 nM) etkili olmuştur.

2012 yılında Ankara DSI'nin yapmış olduğu bir projede kapalı su sistemlerinde zebra midye ile mücadelede, filtrasyon yöntemi kimyasal kullanılmaması ve damla sulama sistemine filtre edilmiş su sağlaması avantajları üzerine araştırılmıştır.

Qian ve diğerleri, (2013) tarafından yapılan bir çalışmada antifouling bileşiklerin moleküler mekanizması sucul canlılarda incelenmiştir. Bu bileşikler alg fotosentezini, enerji üretimi, stres yanıtları da olmak üzere biyolojik çeşitli aktiviteler, genotoksik hasar, bağışıklık sistemi baskılanmış protein ekspresyonu, sinir iletimini, yüzey kimyasını, biyofilm ve yapışkan üretimini etkilediği düşünülmüştür. Genel olarak, belirli bir moleküler hedef ve moleküler mekanizma çoğu antifouling bileşikte tespit edilememiştir; ancak eldeki verilerle moleküler hedef hakkında gelecekte duyarlı biyomarkerlar kullanılarak tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Trombetta 2015'de yaptığı çalışmada zebra balığı olan *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) embriyo gelişimi üzerinde CuPT'nin akut maruz kalma etkisini gözlemlemiştir. Döllenmeden sonraki 30. 96. ve 120. saatlerde morfolojik anormallikler gözlemiş, 12 µg/L'deki dozda notokord bükülmesi anomalisini tespit etmişlerdir. 12 ve 16 µg/L'de kas liflerinde dağınıklık, miyositlerde bozulmalar meydana gelmiştir.

2.4. Antifouling Boyalar

Biyofoulingin yol açtığı olumsuz etkileri önlemek amacıyla gemi yüzeylerinin su içerisinde kalan bölümlerine antifouling boyalar uygulanmaktadır. Amacı biyofoulingin oluşmasını engellemek olan bu sistemler tanımları gereği organizmaları uzaklaştırır, öldürür ya da büyümesini engeller.

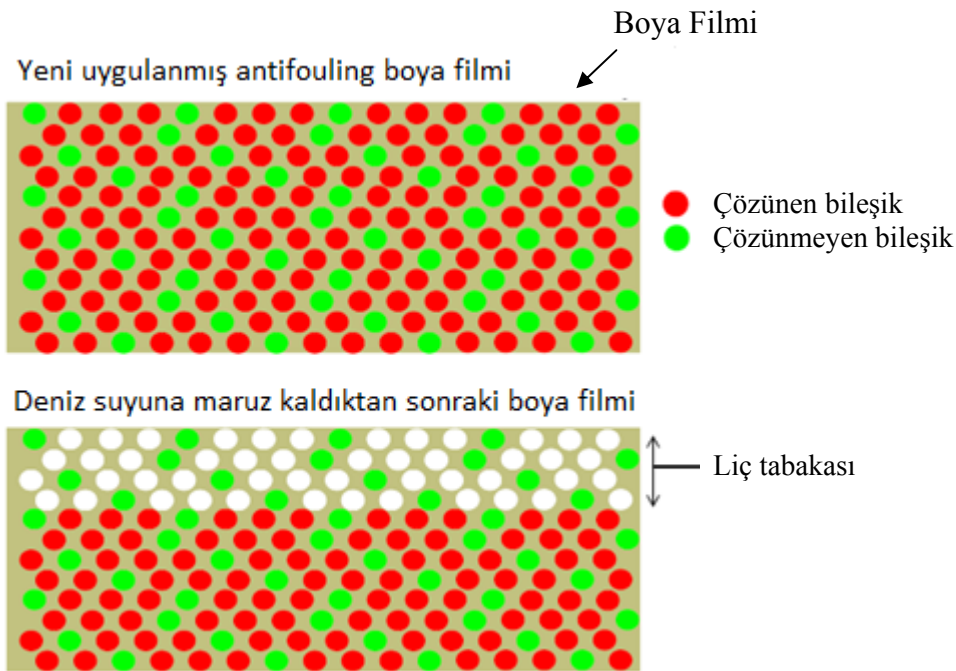
Biyofoulingin olumsuz etkilerini şöyle sıralayabiliriz:

- Yakıt tüketimi: gemi üzerindeki çok az miktarlarda bile biyofouling yakıt tüketiminde belirgin artışlara neden olabilir. Örneğin 6 ay biyofoulinge karşı korumasız olarak seyreden bir gemi üzerinde 150 kg/m² biyofouling birikebilir, bu da 40 000 m² sualtı yüzeyi olan bir gemi için düşünüldüğünde 6000 ton gibi bir değere ulaşmaktadır. Bu durum ise geminin yakıt tüketiminde %50'ye varan artışlara neden olabilir.

- Hava kirliliği: fazla yakıt tüketimi nedeniyle atmosfere verilen CO_2 , SO_2 , NO_2 gazlarının seviyeleri artar. Global olarak düşünüldüğünde böyle bir durumda 22 milyon CO_2 ve 0,6 milyon ton SO_2 'nin atmosfere girdiği tahmin edilmiştir. Ayrıca antifouling boyaların gemi üzerinden uzaklaştırılması sırasında kullanılan çözücüler de atmosfere zararlı kimyasalların karışmasına neden olurlar.
- İstilacı türlerin taşınımı: istilacı türler bir doğal su ekosisteminden diğerine istenmeden çeşitli yollarla taşınan organizmalardır. Bu organizmaların taşınma yollarından biri de biyofoulingdir. İstilacı türler ekolojik ve ekonomik açıdan büyük tehlike oluşturabilirler. Transfer edildikleri bölgedeki ekonomik olarak önemli olan türlerin kaybolmasına, biyolojik çeşitliliğin azalmasına ve/veya çeşitli hastalıkların taşınmasına ve yayılmasına neden olabilirler (Okay, 2004).

2.5. Antifouling Boyanın Çalışma Prensibi

Antifouling boyaların etki sistemleri bu boyaların kullanımında önemli bir etkindir. Son yıllarda antifouling boya kullanımı selfpolishing esasına dayanır. Bu sistemde boya su ile temas etmeye başladığı andan itibaren deniz suyu ile kimyasal bir reaksiyona girer ve erime başlar. Antifouling boyanın içerisinde bulunan reçinemsî yapı içerisindeki biyosidal aktif madde boyanın su ile temasının ardından suya salınır ve antifouling etkisini bu şekilde göstermiş olur (Özan, 2014).



Resim 2.4. Biyositlerin boya filminden çıkışları (Özan, 2014)

Antifouling boyaların matriks özellikleri önem arz eder. Bu özellikler boyanın içindeki biyositin yayılma hızı ve etki süresi gibi iki önemli parametrenin belirlenmesinde etkilidir. İdeal durumlarda biyosit boyanın yapısını oluşturan reçinemi yapı içerisinde dağılmış durumda olmalı ve boyanın su ile temasından sonra bu yapı biyositi yavaşça suya salmalıdır. Eğer biyosit suyla temastan sonra hızlı bir şekilde ortama yayılırsa, boyanın antifouling etkisi kısa süreli olacaktır. Antifouling boya teknolojisinin ilk yıllarında boyaların etki süreleri 12 ay ile sınırlıydı. Daha sonra klorlanmış kauçuk ve vinil reçineler boya yapılarında kullanılmaya başlandı. Bu gelişme boyaların etki süresini 2 seneye kadar çıkardı.



Resim 2.5. Standard bir antifouling boyanın çalışma mekanizması (Özan, 2014)

İdeal bir antifouling sistemden, suyla temas ettikten sonra biyositin fouling organizmaları öldürmesi, hemen sonrasında ise ekosisteme zarar vermeyecek türlerine parçalanması beklenir. İdeal bir antifouling bileşiğin sahip olması gereken özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- Aktivitesinin geniş spektrumlu olması
- Memelilerde toksisitesinin düşük olması
- Deniz suyu içerisindeki çözünürlüğünün düşük olması
- Besin zincirinde düşük biyoakümülyasyon
- Çevrede kalıcı olmaması, hızlı parçalanması (yani yarılanma ömrünün kısa olması)
- Boya hammaddeleri ile uyumlu olması
- Uygun fiyat ve performansa sahip olması
- Yalnız hedef organizmalar üzerinde toksisitesinin yüksek olması

Antifouling boyaların içeriğine bakıldığında bu boyaların genel olarak tutucu (binder), temel biyosit (çoğunlukla bakır(I)oksit), güçlendirici biyosit, solvan, fiber, pigment ve diğer katkı maddelerinden oluştuğu gözlenir.

Çizelge 2.1. İdeal antifouling boya formülü (Yünlü, 2011)

Antifouling boya formül	Yüzde (%)
Etkin madde, biyosit	5-50
Bağlayıcılar	25-30
Dolgu maddeleri	35-40
Solvanlar	15-20
Diğer	5

2.6. Antifouling Boyaların ve Bileşiklerin Sınıflandırılması

Tiribütülin (TBT) içermeyen antifouling boyaları genel olarak 4 ana kategoriye ayırmak mümkündür.

2.6.1. Konvansiyonel antifouling boyalar

Sert çözünmez bir bağlayıcıdan oluşur. Klorlanmış kauçuk ve polivinil klorür ve yüksek konsantrasyonlarda Cu_2O ve yükseltici biyositler fiziksel olarak sert matris içinde dağılırlar. Bu boyalarda deniz suyuyla temas sonucunda biyosit yayılır ve boya tabakasının matrisinden kolayca ayrılır. Bu durumdan dolayı da bu boyalar kısa süreli etkili olmaktadır.

2.6.2. Ablatif (yüzeyden çıkma durumu) /hidrasyon antifouling boyalar

Bu boyalarda boya film matrisi uzun süre dayanacak şekilde tasarlanmış dayanıklı malzemeden yapılmazlar. Bu boyalarda, film matrisi karışımı çözünür/bağlayıcının bir karışımıdır. Vinil klorür-vinil asetat kopolimeri ve vinil klorür-vinil izobütil etilen klorür ve çam sakacı, zamanla yok etmek için tasarlanmıştır, böylece biyosit serbest bırakılır. Bu boyaların 1,5-2 yıllık ömürleri vardır.

2.6.3. Self-polishing kopolimer antifouling boyalar (kendi kendini parlatan)

Biyositlerin kendinden parlayan kopolimerden (SPC) kirlenmeye karşı serbest bırakma davranışı geleneksel ablatif boyalardan farklıdır. TBT-SPC, tribütülin metakrilat (TBTMA) ile, metil metakrilat (MMA) bir kopolimerdir. Deniz suyu hidrofil kopolimer ile etkileşime girebilir ve TBT'yi parçalayan bir hidroliz reaksiyonu başlatır. TBT kopolimer (TBT-acrylate) elde edilir ve deniz suyuna bırakılır. Öte yandan, TBT içermeyen SPC'ler ilâve ile akrilik kopolimerlerdir. SPC antifouling boyaların ömrü genellikle 3-5 yıldır. TBT içermeyen SPC'nin kimyasal yapıları bakır akrilik kopolimer (Cu-akrilat), çinko-akrilik kopolimer (Zn-akrilat) ve silik-akrilik kopolimer (Si-akrilat) olarak gösterilmektedir (Arai, Harino, Ohji, Langston, 2009: 5, 6).

2.6.4. Biyosit içermeyen antifouling boyalar

Biyosid içermeyen zehirli boya (yani faul bırakan kaplamalar) bir silikondan elastomer ve kirlilik yaratan organizmaların atılmasını önleyen bir fluoropolimer biyositlerin kullanımını içerir. Ultra pürüzsüz, düşük yüzey enerjisi ve kaygan yüzeyi bu boyaların yakıt verimliliği, hız ve bakım maliyetlerinin kontrol edilmesini sağlar; zira kirlilik yaratan organizmalar tipik olarak gemi gövdesinin yüzeyine yapışamaz veya zorluk çekerler (Arai ve diğerleri, 2009: 6, 7).

Antifouling bileşikler:

- Tribütülin (TBT)
- TPT
- Dikloro difenil Trikloroethan (DDT)
- Bakır piritiyon (CuPT)
- Çinko piritiyon (ZnPT)
- Irgarol 1051
- Dichloroflomid
- Chlorothalonil
- Sea Nine 211 (DCOIT)
- Triazine
- Zineb

- Ziram
- Preventol A6 (Diuron)
- PK (PTPB) (Piridin-trifenilboran)
- Diuron

2.7. Antifouling Sistemlerin Tarihsel Gelişimi ve Kullanımı

Biyofoulingin zararlı etkilerinin yok edilmesine yönelik çalışmalar çok eski dönemlerde başlamıştır. Kartacalılar ve Fenikeliler gemilerinin tabanlarını zift ve bakır ile kaplayarak biyofoulingi önlemeye çalışmışlardır. Sonraları arsenikli ve sülfürlü maddelerle gemilerinin tabanlarını kaplamışlardır. Yunanlar ve Romalılar ise kurşun kaplamayı bir önlem olarak kullanmıştır.

18. yüzyıl sonlarına kadar foulingile mücadele için en efektif metod, gemilerin karaya çekilerek elle su altı yüzeylerinin temizlenmesi olmuştur. İlk olarak 1758 yılında HMS Alarm Fırkateyni üzerinde bakır kaplama kullanılarak fouling kontrolü için bir deney yapılmış ve deneyin başarılı olmasıyla birlikte, 1780 yılına kadar İngiliz Donanmasında bakır kaplama, foulingden korunma yöntemi olarak kullanılmıştır (Demirel, 2012).

Çözüm 19. yüzyılın ortalarında antifouling boyaların bulunmasına kadar sürmüştür. Antifouling boya kullanımının ilk zamanlarında biyosit olarak bakır-oksit kullanılıyordu. Sonraki süreçte organo-civa, kurşun, arsenik içeren bileşikler, DDT gibi kimyasallar antifouling boyalarda biyosit olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1970'lerde TBT bazlı boyaların kullanımına başlanmıştır, bu boyalar 5 yıla kadar koruma sağlayabiliyordu. TBT'nin tek başına yıllık global üretiminin 1990'ların sonunda 4 000 ton olarak tahmin edilmektedir (Arai ve diğerleri, 2009: 39). 1980'lerde TBT bazlı kopolimer boyaların kullanımı söz konusu olmuştur. TBT uzun süreli koruma etkisine sahip olması nedeniyle avantajlı bir antifouling boya olarak görülmüştü. Fakat yarılanma ömrünün uzun olması TBT'nin sedimentlerde ve organizmalarda birikmesine yol açmıştır. Yapılan araştırmalarda TBT'nin düşük konsantrasyonlarda bile sucul organizmalarda toksik etkileri olduğu gözlemlenmiş, insana kadar uzanan besin zincirinde giderek artan seviyelerde birikebileceği düşünülmüştür. Bu dönemde TBT toksisitesi Fransa'nın Arcachon Körfezinde bulunan *Crassostrea giga* ıstridyelerinde tespit edilmiş larvalarda azalma,

kabuk malformasyonları gözlemlenmiştir (Arai ve diğerleri, 2009: 40). Bunun üzerine 1982’de Fransa’da 25m’den uzun gemilerde TBT maddelerinin kullanımı yasaklanmıştır. 1970’li yıllardaki çalışmalar TBT’nin biyolojik etkileri üzerine odaklanmışken, 1980’lerde analitik yöntemler geliştirilmiş, bileşiğe özgü deniz ve tatlı sularda, çökeltelerde bütülinlerin analizi yapılmıştır. 1990 yılında kalay içermeyen antifouling boyalar geliştirilmiş, bunun çevresel etkiler oluşturmaları üzerine IMO (International Maritime Organization), ülkelere 25m’den kısa deniz araçları için antifouling boya kullanımının yasaklanması tavsiyesini getirmiştir. Bu durum üzerine Japonya, Yeni Zelanda, Avustralya TBT içeren boyaları yasaklamıştır. TBT’ye bağlı bazı organizmalarda imposex görülmesi üzerine ABD, Kanada, İsveç ve Hollanda TBT’nin gemi yüzeyinden salınım hızları ile ilgili birtakım kısıtlamalar getirmişlerdir. 1995’de IMO, antifouling ajanların zararlı etkileri ile ilgili MEPC (Marine Environment Protection Committee) araştırma grubunu kurmuştur. 1997’de Japonya’da TBT bazlı boyaların üretimi durdurulmuştur. 1998’de IMO-MEPC tarafından kalaylı organik bileşikler içeren antifouling sistemlerin kullanılmasını yasaklayan kurallar hazırlanmış, 1999’da bu kurallar resmen onaylanmıştır. 2003 yılında kalaylı organik bileşik içeren boyaların ilk uygulamaları yasaklanmıştır (Okay, 2004). 2008 yılında kalaylı organik içeren boyaların kullanımları tamamen yasaklanmıştır. Bunun üzerine alternatif antifouling bileşikler geliştirilmeye başlanmıştır.

Çizelge 2.2. Alternatif antifouling sistemler (Okay, 2004)

Ürün/Yöntem	Avantajlar/Dezavantajlar
Bakır bazlı boyalar	TBT’den daha az toksik ve yaygın olarak kullanılmakta. Yalnız deniz faunasına karşı etkili. Herbisitler eklenerek floraya da etkili hale getirilebiliyor.
Kalay içermeyen boyalar	Foulinge karşı çok etkili değil, bu nedenle sık sefer yapmayan gemiler için uygun.
Yapışmayan kaplamalar	Antifouling bileşik içermezler, ancak uygulandıkları zaman çok kaygan bir yüzey yaratarak organizmaların yapışmasını önlerler. Fouling olduğu zaman yüzeyin çok kaygan olması nedeniyle temizlenmesi kolaydır.
Temizlik	Foulingin az olduğu durumlar için geçerlidir. Dönen fırçalar ve basınçlı su kullanılır.

Çizelge 2.2. (devam) Alternatif antifouling sistemler (Okay, 2004)

Ürün/ Yöntem	Avantajlar/Dezavantajlar
Doğal bileşikler	Doğada üretilen bazı maddeler. Örneğin bazı enzimler bakteri yapışmasını önleyebilirler.
Elektrik	Gemi yüzeyi ile deniz suyu arasında bir elektrik yük farkının yaratılması foulingi önler. Sistem oldukça etkin, ancak kolayca bozulabilir ve pahalıdır. Ayrıca korozyonu ve enerji tüketimini artırır.
Dikenli kaplamalar	Kaplama yüzeyinde mikroskobik dikenler içerir. Verimi dikenlerin boyuna ve dağılımına bağlıdır. Bazı kabukluların ve alglerin yapışmalarını çevreye zarar vermeden engeller. Ancak sürtünmeyi artırır, bu nedenle geminin bazı statik yüzeylerinde (soğutma suyu girişleri, şamandıralar vb.) kullanılabilir.

2.8. Antifouling Sistemlerle İlgili Yasal Düzenlemeler

Antifouling sistemlerin kullanımıyla ilgili tüm dünyada birçok yasal düzenlemeler yapılmıştır. Deniz güvenliği için gemilerde organik kalaylı bileşiklerinin yasaklanması yönergesi (EC782/2003) 14 Nisan 2003 tarihinde kabul edilmiştir. Bu yönerge ile birlik, organik kalaylı bileşiklerin çevre ve insansılığı üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve/veya azaltmak için limanları üzerinde bu bileşikler olan gemilerin girişini yasaklamıştır (Aytuğ, 2014).

Deniz ekosisteminde organokalay bileşiklerinin etkileri imposeks, kabuklularda şekil bozuklukları, midye larvalarının ölümü gibi değişik şekillerde belirir. Bu olumsuz etkiler 1980'li yıllarda Fransa'da ıstıdyelerde keşfedildi ve Fransız yetkililer 1982 yılında 25 m'den daha uzun deniz araçlarında TBT içeren boyaların kullanımını yasakladılar. Birkaç yıl sonra benzer kararlar İngiltere, ABD, İsveç, Hollanda, Yeni Zelanda ve Japonya'da alındı ve 1989 yılında Avrupa birliği de aynı kararı kabul etti (89/677/CEE). IMO (International Maritime Organization) 1 Ocak 2003 tarihinden sonra TBT bazlı antifouling katkılı boyaların gemilerde kullanımı bütün dünyada yasaklanmıştır. IMO, TBT'nin 1 Ocak 2008 tarihinden sonra tamamen yasaklanmasını sağlamak için MEPC (The Marine

Environmental Protection Committee) tarafından geliştirilen anlaşmayı kabul etmiştir (Arai ve diğerleri, 2009: 24).

Kabuklu canlıların yaşadığı sulara ilişkin konsey yönergesi (2006/113/EC): kabuklu canlıların yaşadığı suların kalite değerlerine ilişkin ilk düzenleme, 30 Ekim 1979 tarih ve 79/923/EEC sayılı konsey yönergesidir. 12 Aralık 2006 tarihli ve 2006/113/EC sayılı yönergeyle, bu yönerge ve diğer düzenlemeler birleştirilmiştir. 2006/113/EC sayılı yönergenin amacı, üye ülkeler tarafından kabuklu deniz ürünlerinin yaşadığı sular olarak tanımlanan tuzlu sular ve kıyı suları ile suda yaşayan kabuklu canlıların korunmasını sağlamak ve bu amaçla alınan tedbirler neticesinde daha kaliteli ürün elde edebilmektir. Yönerge bu amaca ulaşılması için üye ülkeler tarafından uyulması gereken parametreler (pH, sıcaklık, renk, askıda katı madde, çözünmüş oksijen, bazı maddelerin varlığı, kabuklu canlıların lezzetini etkileyen maddeler vb.) için başvurulacak analiz yöntemi ve numune alım sıklığına ilişkin bilgiler içermektedir (Aytuğ, 2014).

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından AB 98/8/EC Direktifi doğrultusunda hazırlanan ve 27449 sayılı (4. Mükerrer) ve 31 Aralık 2009 tarihinde Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren Biyosidal Ürünler Yönetmeliği’ne göre öncelikle, tüm biyosidal ürünlerde olduğu gibi ruhsatlandırılacak antifouling boyanın aktif maddesi yönetmelikte listelenen aktif maddeler içerisinde bulunmalıdır. Bunun ile birlikte bu aktif maddenin/maddelerin, antifouling boyanın kullanım alanı olan “bozunmayı önleyici ürünler” için uygun olan aktif maddelerden (bakır piritiyon gibi) olması gerekmektedir (Erensoy, 2013).

Antifouling boyaların ruhsatlandırılması, diğer biyosidal ürünlerde olduğu gibi bir kaç aşamadan oluşmaktadır; hatta antifouling boyalarda, ürünlerin renk versiyonlarının olması sebebi ile bu aşamalar daha detaylı bir şekilde işlenmektedir.

Bu aşamalardan ilki, yukarıda da bahsettiğimiz gibi, aktif maddenin uygunluğudur. Ön başvurunun bakanlık yetkililerince değerlendirilmesinde öncelikle aktif madde kontrolü yapılmaktadır. Bununla birlikte, ürünün içeriği oluşturan her bir maddenin ürün içerisindeki fonksiyonunun belirtilmesi de önemlidir. Ürüne ait örnek etiketin yönetmelikte belirtilen tüm hususları karşılıyor olması gerekmektedir. Bu hususlardan bazıları örneğin, etikette aktif madde ismi verilmeli ürün içerisindeki yüzde oranı net miktar olarak etikette belirtilmeli; ürünün sınıflandırması etiket üzerinde eğer varsa sembolü ile belirtilmeli ve

ürüne ait Güvenlik Bilgi Formu (GBF) ile uyumlu olmalı ve bu GBF hazırlama konusunda eğitim almış ve akredite kuruluş tarafından sertifikalanmış yetkili bir kişi tarafından hazırlanmış olmalı; ürünün etkin olduğu iddia edilen organizma isimleri etiket üzerinde bulunmalı; yanlış yorum ve uygulamalara sebep olabilecek sözlü, yazılı ve görsel yayınlar bulundurmamalıdır (Erensoy, 2013).

Antifouling ürünlerin, biyosidal ürün ruhsatı alınması ile ilgili ön başvurunun tamamlanması sonrasında, ürünlerin bakanlık tarafından istenen analizlerinin tamamlanması ve literatür taraması ile birlikte ruhsat dosyalarının hazırlanması gerekmektedir. Henüz bir mutabakata erişilmemesi ve ilgili laboratuvarın analizleri yapmaya başlamaması sebebi ile bakanlık tarafından onaylı laboratuvarlarda yapılması gereken bu analizler tamamlanamamış ve dolayısıyla hiçbir antifouling boya firması ruhsat alamamıştır.

Antifouling boyaların Sağlık Bakanlığı tarafından denetimlerinin sıklaştığı ve ruhsatsız ürünlere cezaların kesilmeye başlandığı bu günlerde, boyaların güvenli kullanımı için ruhsatlı ve etiketleri anlaşılabilir ürünlerin kullanılmasına dikkat çekilmelidir (Erensoy, 2013).

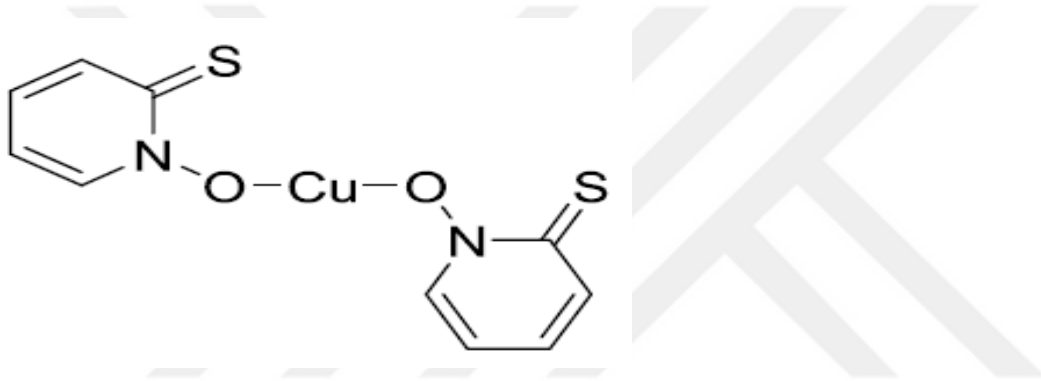
Genel prensip olarak bozunmayı önleyici ürünlerin (antifouling boyaların) kullanımı esnasında;

- Solumanın ve cilde temansın önüne geçilmesi,
- Kişisel koruyucu ekipman kullanılması,
- İyi havalandırılan yerlerde kullanımı,
- Isı ve ateş kaynaklarından uzak tutulması,
- Kesinlikle toprağa ya da suya karışarak çevreye yayılmasının önlenmesi,
- Kanalizasyona karışmasının önlenmesi,
- Maruziyet, alevlenme, çevreye yayılma ihtimallerine karşı senaryoların oluşturularak uygun tedbirlerin alınması gereklidir (Okay, 2004).

2.9. Bakır Piritiyon'un Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Bakır piritiyon, organokalay bileşikleri yerine 1996 yılında geliştirilen, antifouling boyaların içeriğinde kullanılan yükseltici bir biyosittir. Avrupa biyosidal yönetmeliği adı altında desteklenmektedir. Bakır piritiyon iki pirition ligandın merkezi bakır iyonuna bağlanmasıyla oluşur. Bakır piritiyon(Cu) 2-pyridinethiol-1-oxide için ortak addır (Arch chemicals, 2008).

Piritiyon kompleksleri nötr ve hidrofobik olup, suda düşük bir çözünürlük ile organik maddeye yüksek oranda bir afinite oluşturur.



Şekil 2.1. Bakır piritiyon'un moleküler formülü (Cui, 2014)

Çizelge 2.3. Bakır piritiyon'un fiziksel ve kimyasal özellikleri (Arch Chemicals, 2010; Arch chemicals 2008; EU, 2015)

Fiziksel durumu	Katı, toz, sıvı
Renk	Zeytin yeşili
Moleküler ağırlığı	315,85 g/mol
25°C'deki pH değeri	5,0-7,0
Erime sıcaklığı	278°C
Suda çözünürlük	Çözünürlük < 1,0 ppm
Kokusu	Kokusuz
Minumum saflık derecesi	950 g/kg

Bakır piritiyon güneş ışığına karşı duyarlıdır ve hızlı bir şekilde bozunmaya uğrar. Yarı ömrü çevre koşullarına bağlı olarak birkaç dakika ile birkaç saat arasında değişmektedir (Arch Chemicals, 2010).

Üretim sırasında potansiyel maruz kalma, güçlü endüstriyel hijyen protokolleri ve süreçleriyle sınırlı üretim ekipmanları mühendislik ve kişisel kullanımı koruyucu ekipman gerektirir. Bakır piritiyon esas olarak antimikrobiyal olarak kullanılır. Zehirli boyalar, koruma sanayi ürünler, lif, deri ve kauçuk koruma sanayinde kullanılır. Bakır piritiyon son derece etkin geniş spektrumlu bir biyosit olup bakterileri, algleri ve fungusları kontrol etmek için kullanılır (Arch Chemicals, 2008).

Bakır piritiyon'u toz veya duman şeklinde solumak son derece toksik kabul edilir. Deride tahriş edici değildir. Toz şeklinde alındığında içerik kusturulmalıdır. Gözleri aşındırır, ciddi göz yanmasına veya tahrişine neden olur. Ciddi yaralanmaları önlemek için hemen yıkanmalıdır.

Kronik maruziyette bilinen ve beklenen etkileri vardır. Bakır piritiyon'un, embriyonik etkileri ile üreme üzerine olumsuz etkileri olması beklenmektedir. Bakır piritiyon suda yüksek oranda çok zehirli olarak kabul edilir. Güneş ışığıyla hızlı bir bozunmaya uğrar çevre varlığı çok kısa ömürlüdür. Laboratuvar çalışmalarında belirli türlerde kas atrofisine neden olduğu görülmektedir. Bireysel tüketiciye bu ürün konsantre formda satılamaz. Ancak endüstriyel alanda satılması mümkündür. Konsantre ürün olanlar veya sulandırılmış olanlar dikkatlice etiketteki yönergeleri izlenerek kullanılmalıdır (Arch Chemicals, 2008). Ülkemizde de sağlık bakanlığının izinli biyosidal ürünler listesinde yer almaktadır.

Bakır piritiyon'un, algistatik olduğu (büyümeyi engellediği halde öldürmediği) tatlı su yeşil alginde (*Selenastrum capricornutum*) tespit edilmiştir. Yüz yirmi saatlik EC₅₀, 35 µg/L ve yüz yirmi saatlik NOEC büyümesinin 18 µg/L olduğu tespit edilmiştir. Bakır piritiyon için zehirlilik verileri, piritiyon bileşiğinin sudaki omurgasız hayvanlar için çok toksik olduğunu göstermiştir. *Daphnia magna*'ya karşı akut bir copper pyrithione testi, 48 saatlik NOEC'nin 7,9 µg/L olduğu saptanırken, 48 saatlik EC₅₀'si 22 µg/L olarak bildirilmiştir. Bakır piritiyon kullanılarak deniz doğusu istirideri (*Crassostrea virginica*) için 96 saatlik EC₅₀ 11 µg/L olarak hesaplanmış ve 96 saatlik NOEC büyümesi 6,9 µg/L olarak hesaplanmıştır. Bakır piritiyon bileşiği tatlısu balığı için çok toksik olarak kabul

edilir, *fathead minnow* karşı pyrethione testi (*Pimephales promelas*) 96 saatlik LC_{50} 4,3 $\mu\text{g/L}$. NOEC subletal 2,8 $\mu\text{g/L}$ olduğu tespit edilmiştir. Bakır piritiyon'u ağızdan uygulamayı takiben orta düzeyde toksik olduğu gösterilmiştir (Advisory Committee on Pesticides[ACP], 2005: xvi).

Yukarıda da görüldüğü üzere bakır piritiyon'un sucul canlılar üzerinde yüksek oranda toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Sucul ekosistemlerde bulunan canlılar besin ağının önemli basamaklarını oluşturur ve biyoakümüle ederler. Bu nedenle sucul çevrede meydana gelecek toksisite tüm canlıların etkilenmesine neden olabilir.

Çizelge 2.4. Sucul ortamda yaşayan canlılar üzerindeki LC_{50} 'ye göre toksisite dereceleri (Tunca, 2015)

Toksisite derecesi	$LC_{50}(\mu\text{g/L})$
Çok yüksek toksik	<100
Yüksek toksik	100-1 000
Orta derecede toksik	1 000-10 000
Az toksik	10 000-100 000
Akut toksik değil	>100 000

Memeli hayvanlarda bakır piritiyon'a maruz kalma yolları; oral, dermal ve inhalasyon yoluyla maruz kalmaz. Akut oral, dermal veya teneffüs sonrası insanda maruz kalma verilerde mevcut değildir. Akut bir oral çalışmada, bakır piritiyon için sıçan LD_{50} değeri erkeklerde 1075 mg/kg, kadınlarda 500 ila 1000 mg/kg arasındadır. 1000 mg/kg ve üzeri, her iki cinsiyette GI (gastro intestinal yol) yolun tahrişi gözlenmiştir. Genel olarak bu çalışmaya dayanılarak, bakır piritiyon'un AB sınıflandırma kriterlerine göre, oral yol ile maruz kalmada zararlı olduğu gösterilmiştir. Sıçanlarda akut inhalasyon maruziyeti çalışması, bakır piritiyon'un çok toksik olduğunu dört saatlik LC_{50} değerinin 70 mgolarak belirlenmiştir. Bakır piritiyon, *Pseudomanas putida*'ya aerobik koşullar altında 16 saatlik EC_{50} değeri 6,0 mg/L ve NOEC 0,078 mg/L olarak tespit edilmiştir (Advisory Committee on Pesticides, 2005: xv).

Çizelge 2.5. Bakır piritiyon'un etki ettiği sucul canlılar (Guardiola, 2012)

Yaygın isim	Uygulamalar	Etki mekanizması	Tür	Etkiler
Bakır piritiyon (CuPT)	Mikrobisit	Çok-bölgeli inhibitör (metabolik süreçler)	<u>Crustacea</u> <i>Artemia salina</i>	Na/K ATPaz'ın inhibisyonu ve Mg^{+2} ATPaz enzim aktiviteleri
			<u>Mollusca</u> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Na/K ATPaz değişiklikleri ve Ca^{2+} ATPaz aktiviteleri
			<u>Teleost</u> <i>Fundulus heteroclitus</i> <i>Oncorhynchus kisutch</i>	Solungaç osmoregülasyonunda değişiklikler Solungaç osmoregülasyonunda değişiklikler

2.10. Piritiyon Grubu Antifouling Bileşiklerin Etki Mekanizması

Steril deniz suyu güneş ışığına maruz bırakıldığında, degradasyonun dolaylı tahmini ZnPT ve CuPT için yarılanma ömrü 7-8 dakika olduğu düşünülmüştür. Azaltılmış ışık ve karanlık ortamda bileşikler 48 saatten fazla kararlıdır. CuPT ve ZnPT aynı grup kimyasal olduğundan ve ekosistemde CuPT, ZnPT'ye dönüştüğünden etki mekanizmaları birlikte ele alınarak sunulmuştur. ZnPT ve CuPT'nin etki mekanizması, hücre membranlarının parçalanması, pH gradyanlarının bozulması, metallerle ve proteinlerle kompleks bağlanma gerçekleştirmesi şeklindedir. Bu mekanizmalar ATP sentezinin bozulmasına ve hücrelerdeki metallerin ve diğer katyonların açığının yanı sıra zarlar yoluyla taşınmasına yol açar. Pyrithione molekülleri 320-355 nm arasındaki dalga boyları arasında fotoliz olabilir veya kimyasal ya da biyolojik oksidasyon ile parçalanır. ZnPT ve CuPT bakterileri, yosunları ve zooplanktonu hem direk etkilerle, hem de toplulukların işlev ve yapısındaki değişikliklere (besin maddesi döngüsündeki değişiklikler) bağlı olarak dolaylı bir şekilde

etkiler. CuPT için toksisite, sudaki yüksek fosfat konsantrasyonunda en düşük düzeydedir (Dahllöf ve diğerleri, 2005: 12, 21).

2.11. Bakır Piritiyon ile İlgili Yasal Düzenlemeler

EPA antimikrobiyal ajan olarak gemilerde alg ve foulantların önlenmesi için copper omadine (CuPT) kullanımını bildirmiştir. 25m ve daha uzun gemilerde lisanslı uygulamacılar tarafından tekne boyalarında bu ürün kullanılabilir (Lonza, 2012). Bakır piritiyon, komisyon uygulama yönetmeliği (AB) 2015/984 24 Haziran 2015 tarihli kararla biyosidal ürünler için mevcut aktif madde, ürün tipi 21 olarak kullanımı onaylanmıştır. Fakat ürün tipi 21 için kullanılan ve bakır piritiyon içeren biyosidal ürünlerden, 98/8/EC sayılı direktifin 5. maddesi'nde belirtilen şartları yerine getirmesi beklenirken, kullanımına ilişkin belirli koşullara uyulması şarttır.

Zehirli boya ürünlerinin kullanımı ile ilgili risklerin kabul edilebilirliğinin yanı sıra, önerilen risk hafifletme tedbirlerinin uygunluğunun daha fazla teyit edilmesi gerekmektedir. Mevcut zehirli aktif maddelerin onaylarının yenilenmesi sırasında, uygulanan risk azaltma önlemlerinin yanı sıra, bu maddelerin riskleri ve faydalarının gözden geçirilmesi ve karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için bu maddelerin onaylanma son kullanma tarihi aynı olmalıdır.

AB değerlendirme komisyonun hazırlamış olduğu yönetmelikte biyosidal ürünlerin yetkilendirilmesi aşağıdaki koşullara tabidir:

- 1) Bakır piritiyon içeren ürünler, profesyonel olmayan kullanıcılar tarafından yetkilendirilmemelidir.
- 2) Endüstriyel veya profesyonel kullanıcılar için güvenli operasyonel prosedürler ve uygun organizasyon önlemleri oluşturulacaktır. Ürünler, maruz kalmanın kabul edilebilir bir seviyeye düşürülemediği durumlarda, uygun kişisel koruyucu ekipmanlarla birlikte kullanılacaktır.
- 3) Etiketlerin ve eğer varsa, kullanma talimatları, çocukların, arıtılmış yüzeyler kuru olana kadar uzakta tutulacakları belirtilmelidir.
- 4) Etiketlerin ve tedarik edilen yerlerin, yetkili ürünlerin güvenlik veri sayfalarında, bakım ve onarım faaliyetlerinin, doğrudan kayıpları önlemek ve çevreye verilen emisyonları en

aza indirmek için kapalı bir alanda ve geçirimsiz sert yerde yürütüleceğini ve zararlı bakır piritiyon atıklarının yeniden kullanım ve imha amacıyla toplanması (EU, 2015).

Ülkemizde Bakır piritiyon T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı tarafından yayımlanan kullanımına izin verilen biyosidal ürünler arasında aktif maddelere ait listeler içerisinde "liste 1" de yer almaktadır.

2.12. Biyodeny ve Biyodenylerde Kullanılan Bazı Terimler

Sucul ortamda mevcut kirliliğin ve toksik maddenin canlı üzerinde yaptığı etkilerin değerlendirilmesinde çoğunlukla saha ve laboratuvar çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda ya canlının yaşadığı ortam koşullarına benzer koşullar (tam kontrollü) laboratuvar (*in vitro*) ortamına aktararak biyodenyler olarak adlandırılan çalışmalar yapılmaktadır ya da toksik madde varlığının sucul sistemler üzerinde yarattığı etkilerin araştırılması amacıyla örnek toplanarak incelenmektedir (*in situ*) (Tunca, 2015).

Biyodenyler, doğrudan canlı materyalin kullanıldığı deneylerdir, çoğunlukla da toksik maddelerin etkilerinin tespiti yapıldığı için zehir deneyleri olarak da adlandırılırlar (Tunca, 2015). Biyodenyler deney sürelerine göre genel olarak; kısa süreli (akut) ve uzun süreli (kronik) olmak üzere ikiye ayrılır.

Akut toksisite deneylerinde genellikle LC_{50} değerinin hesaplanmasının nedeni, kirleticilere karşı ölüm öncesi bireysel ve toplu reaksiyonu yani genellikle canlının ölümünü baz almak içindir.

Zehir; Canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir kimyasal madde zehir olarak adlandırılır. Canlının sağlığında geçici ya da sürekli olarak olumsuz etki yapabilir.

Zehirlilik (Toksisite); sularda tabii dengeyi bozan organizmaların hayat sürelerini kısaltan ve/veya ortam şartlarını bozan her türlü yabancı etkidir. Diğer bir deyişle; kirleticilerin organizmalar üzerine zararlı etkisidir (Tunca, 2015).

Subletal Doz; canlıda doğrudan ölüme neden olan düzeyin altındaki dozdur.

Akut zehirlenme, kimyasal maddenin toksik dozuna bir kere veya kısa zaman (24 saat) içinde birçok kere maruz kalma sonucu görülür.

Kronik zehirlenme, uzun süre (3 aydan fazla) akut toksik dozun altında maruz kalma sonucu oluşan kronik zehirlenme kümülatif zehirlerle görülür. Genel olarak bir zehirin organizmadan atılım hızı, absorpsiyon hızına göre daha yavaş ise, bu toksik madde organizmada birikebilir yani "kümülatif özellik" gösterir.

LD₅₀ (median letal doz): "deney hayvanlarına belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, bu hayvan popülasyonunun %50'sini öldüren dozu" olarak tanımlanır (Vural, 2005: 228)

LC₅₀ ise: "belirli bir süreliğine, çevrede (su, hava gibi) bulunan kimyasal maddeye maruz kalan deney hayvanlarının %50'sini öldüren madde konsantrasyonu" olarak ifade edilir (Vural, 2005: 228)

LD₅₀ tayini: Yukarıda verilen LD₅₀ tanımı, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Kuruluşu (The Organization For Economic Cooperation and Development: OECD) tarafından daha açık olarak: "Bir maddenin deney hayvanlarının %50'ini öldürecek beklenen ve istatistiksel olarak tayin edilen tek dozu" şeklinde tanımlanmaktadır (Vural, 2005: 228).

LD₅₀ ve LC₅₀ tayininde kullanılan en basit yöntem, grafiksel yöntem olup, etkinin kuantal olduğu (hep veya hiç) düşüncesine dayanır. Böylece deney grubunda, doza karşı cevap (ölüm) yüzdesi ve normal dağılımdaki kümülatif etki değerlendirilmesi yapılır (Vural, 2005: 229).

Doz-probit ilişkisi: Doz-cevap ilişkisinde doza karşı ölüm "probit birimi"ne dönüştürülerek gösterilebilir. Özellikle probit esasına dayanan doz-cevap eğrisi, aynı LD₅₀ değerini veren maddelerin, diğer dozlardaki toksisitelerini karşılaştırmada önemlidir.

Bağımlı ya da açıklanan değişkeni evet-hayır, başarılı-başarısız gibi yanıtlardan oluşan, 0 ve 1 olarak kodlanan kategorik modeller, iki uçlu ya da gölge-bağımlı değişkenli modeller olarak adlandırılır. Bu modelleri tahmin etmek için Doğrusal olasılık, Logit ve Probit gibi çeşitli analiz yöntemleri kullanılır.

Probit analizi logistik regresyona alternatif olarak kullanılan bir modeldir. Her iki analiz birbirine oldukça benzerdir ve her iki yöntem ile elde edilen olasılık tahminleri birbirine oldukça yakın değerlerdir. Logistik regresyon analizinde log odd'lar (bahis oranları) kullanılırken probit analizinde kümülatif normal dağılım kullanılır.

Finney'in probit analizi, özellikle yaşam bilimleri alanında yapılan deneysel çalışmalarda, birimlere uygulanan doz miktarlarına karşı alınan cevaplar (doz-cevap) için düzenlenmiş olmasına rağmen daha geniş amaçlar için de kullanılabilir. Probit analizi, belli bir bağımlı değişken (cevap) oranına ulaşmak için gerekli olan bağımsız değişken etkisinin tahmin edilmesine imkan sağlar.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tatlı su midyelerinin temini

Bu araştırmada iki midye türü kullanılmıştır. Bunlardan biri olan zebra midye (*D. polymorpha*) (Pallas, 1771), Ekim 2015’de Kesikköprü Barajından elde edilmiştir. Kesikköprü Barajı Ankara’nın Bala ilçesinde, Kızılırmak üzerinde, sulama ve enerji üretimi amacı ile 1959– 1966 yılları arasında inşa edilmiş bir barajdır. Toprak ve kaya gövde dolgu tipi olan barajın gövde hacmi 900 000 m³, akarsu yatağından yüksekliği 49,10 m’dir. 39° 23’ 43,08’’ kuzey enlemi, 33° 25’ 15,6’’ doğu boylamı arasındadır. Kesikköprü Barajında bulunan hidroelektrik santraldeki borularda zebra midyeler kolonize halde bulunur.

Çalışılan ikinci tür *Unio mancus eucirrus* (Bourguignat, 1860) Ekim 2015’de Sinop ilinin Karasu Çay’ından midyelere yüzeyde ulaşılabilen kısımlarda el ile, daha sığ olan kısımlarda kepçe ile toplanmıştır. Işık almayan mavi termoslar içine konularak Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir. Sinop’ta bulunan Karasu Çayı; Küre dağlarında gündüzlü ormanlarından doğar. Uzunluğu 80 km, Sinop’un 8 km batısından denize dökülür. Karasu Çay’ını Kınık, Çakçak, Hasan, Ramlı ve Taşnaklar dereleri beslemektedir. Örneklerin toplandığı Karasu Çay’ının koordinatları; 41° 57’ 17,96’’ kuzey enlemi, 31° 1’ 11,24’’ doğu boylamı, GPS irtifa 21,3 m’dir.



Resim 3.1. Karasu Çayı (Sinop)

3.1.2. Deney ortamı ve adaptasyon periyodu

Kesikköprü Barajından el ile toplanan zebra midye (*D. polymorpha*) ile Sinop ilinin Karasu Çayından yine elle toplanmak suretiyle elde edilen *U. mancus eucirrus* bireyleri serin ve nemli ortamda laboratuvara getirilerek burada daha önceden hazırlanmış ve 48 saat havalandırılarak dinlendirilmiş şebeke suyu içeren akvaryum ve cam kaplara ayrı bir şekilde konularak bir hafta adapte edilmişlerdir. Bu süreçte midyelerin gerektiğinde tatlı su algleri ile beslenmeleri sağlanmıştır.

3.1.3. Deney düzeneği

Zebra midye (*D. polymorpha*)

Zebra midye deneyinde 3 L hacimli 7 adet cam kap kullanılmıştır. Cam kaplar içerisine 2 L Ankara şebekesinden çeşme suyu konularak kloru uçması için 48 saat dinlendirilmiş ve gerekli havalandırma düzeneği sağlanmıştır. Her bir cam kaba 20 adet zebra midyesi (*D.*

polymorpha) konulmuştur. Deney öncesi cam kaplardaki su parametreleri; sıcaklık 21°C, iletkenlik 204,7 µS/cm, çözünmüş oksijen (DO) 4,25 mg/L olarak tespit edilmiştir.



Resim 3.2. Zebra midye (*D. polymorpha*) biyodeney düzeneği

U. mancus eucirrus

U. mancus eucirrus deneyimizde 20 L'lik 3 adet akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlar içerisine 15 L su konularak merkezi havalandırma uygulanmış ve her bir akvaryuma 15 midye konulmuştur. Deney öncesi akvaryumdaki su parametreleri; sıcaklık $19,1 \pm 0,16^\circ\text{C}$, iletkenlik 256,6 µS/cm, pH $8,16 \pm 0,2$, çözünmüş oksijen (DO) 6,25 mg/L olarak tespit edilmiştir.



Resim 3.3. *U. mancus eucirrus* biyodeneý düzeneđi

3.1.4. Bakır piritiýon çözeltilerinin hazırlanması

Zebra midye (*D. polymorpha*) türünün akut toksisitesi için yapılan biyodeneýde stok çözelti, katı bakır piritiýon'un (CuPT; Arch Chemicals, U.K.) tartılıp volumetrik cam balon jodede belirli hacim DMSO ile tamamlanması ile hazırlanmıştır. *U. mancus eucirrus* türünün subletal deneyinde stok çözeltileri hazırlanırken katı haldeki bakır piritiýon (CuPT; Arch Chemicals, U.K.) maddesi tartılıp volumetrik cam balon jodede belirli hacim DMSO ile çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler kullanım öncesinde belirli sıcaklıkta tutulmuş ve madde ışıık ortamında yıkıma uğramaya başladığı için balon jojenin etrafı ışıık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmıştır. Akvaryum ve cam kaplarda dozlama yapılırken otomatik mikro pipet kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney yöntemi

Akut toksik deneyde: zebra midye (*D. polymorpha*) bireyleri Kesikköprü Barajından toplandıktan sonra soğuk ortamda laboratuvara getirilerek bir hafta adapte edilmişlerdir. Dinlendirilip sürekli havalandırılan şebeke suyu ortamına, 2 L'lik cam kaplara, 20'şer midye olarak aktarılan midyelerin ortalama boyları 20,01 mm ($\pm 3,02$)'dir. DMSO içinde çözülen CuPT çözeltisi ile 1, 4, 10, 20 ve 80 $\mu\text{g/L}$ 'lik konsantrasyonlarda karanlıkta dozlama yapılmış ve deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Deneylerde hiçbir kimyasalın katılmadığı ve çözücü olarak kullanılan DMSO'nun katıldığı iki kontrol grubu kullanılmıştır.

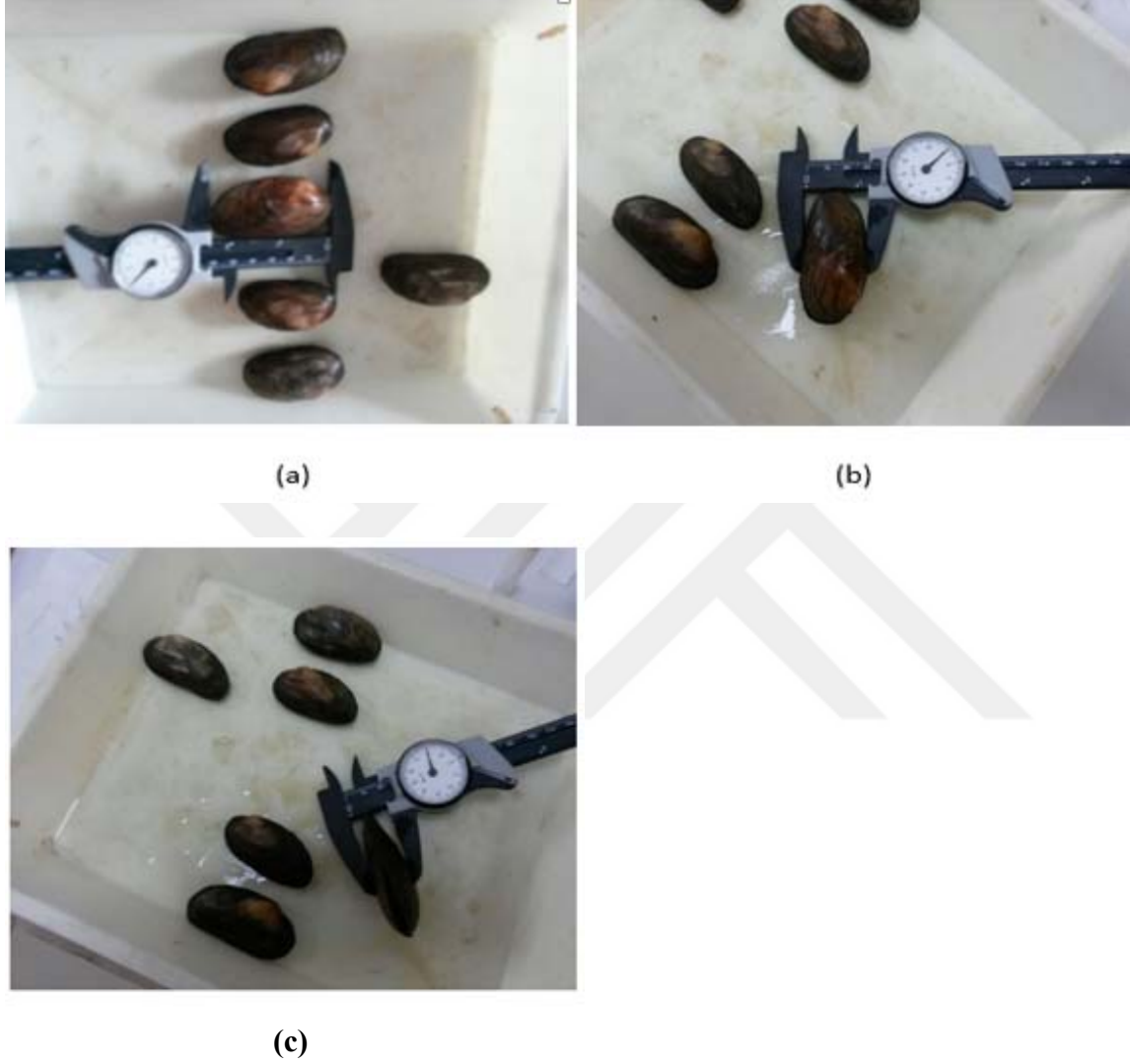
Subletal deneyde ise, *U. mancus eucirrus* türü kullanılmıştır. Subletal, bakır piritiyon (DMSO'da çözünerek hazırlanmıştır) maruziyet deneyinin doz aralığına belirlenen ön deney sonucunda karar verilmiştir. 20 L hacimli deney akvaryumuna 15 adet tatlı su midyesi konulmuş ve akvaryuma 5 $\mu\text{g/L}$ CuPT dozlanmıştır. Deneyde ayrıca 20 litrelik iki adet kontrol akvaryumu (DMSO ve negatif kontrol) oluşturulmuştur. İçerisine 15 adet midye konulmuş, havalanmış, kloru uçurulmuş şebeke suyu ile doldurulmuştur. Yapılan dozlama 96 saat boyunca gözlemlenmiştir.

Biyodeney sistemi OECD (1993) ve ulusal mevzuatta verilen (Resmi Gazete, 1991) standard metotlara göre yapılmıştır. Deney sonuçları Finney'in probit analiz yöntemine göre EPA tarafından geliştirilen paket program (EPA Probit Analysis Program Version 1.5, A.B.D.) ile LC_{50} ve %95 güven aralığı hesaplanmıştır.

3.2.2. Deney sonrası uygulanan işlemler

Deney sırasında (96.saat) zebra (*D. polymorpha*) midyelerinin her gün kabuklarına uyarı verilerek el yardımıyla açılmaya çalışılarak canlılıkları tespit edilmiş, eğer kabuklar açılıyorsa ölü, açılmaya çalışıldığında tekrar kapanıyorsa canlı kabul edilmiştir. Bu şekilde yapılan canlılık tayininden sonra ölü bireyler kaydedilerek ağırlık, uzunluk, yükseklik ve kalınlık değerleri not edilmiştir.

U. mancus eucirrus türünde deney bitiminde (96. saat sonunda) her midyenin önce kağıt havlu ile kurularak fazla suları uzaklaştırılmış, ağırlık (Sartorius, TE313S terazi) yükseklik, uzunluk ve kalınlık parametreleri kumpas aleti kullanılarak ölçülmüştür.



Resim 3.4. *U. mancus eucirrus* ölçümleri; a) Uzunluk b) Yükseklik c) Kalınlık

3.2.3. Tatlı su midyesinden (*U. mancus eucirrus*) hemolemf alınması ve toplam hemosit sayısının belirlenmesi

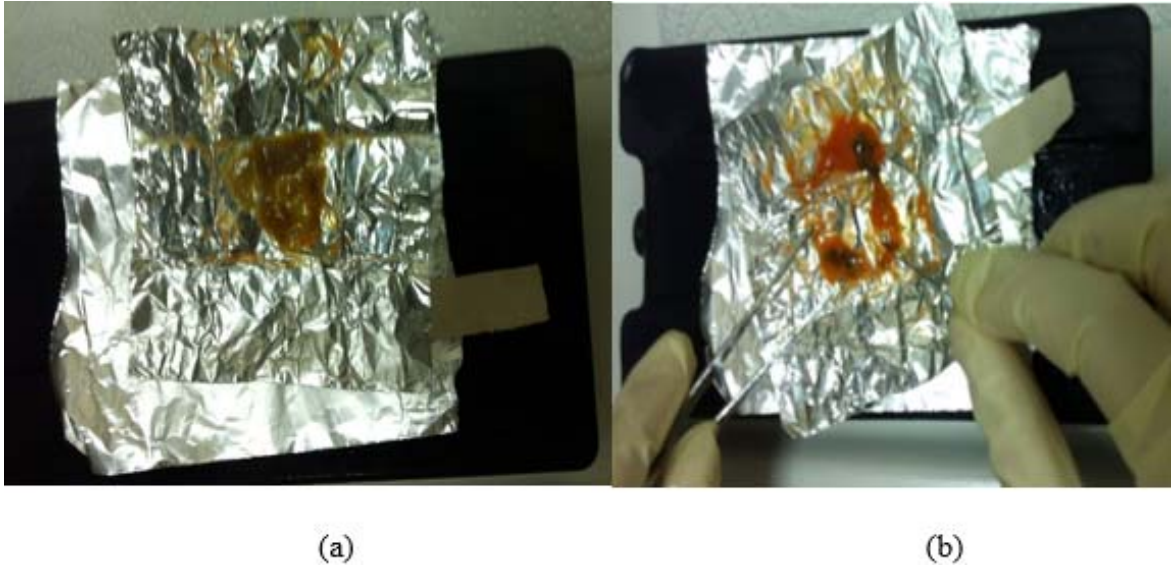
Tatlı su midyelerinin ilk olarak umbo kısmına yakın bölgesinden 2,5 ml'lik enjektör kullanılarak hemolenf sıvısı alınmış 1:1 oranında %4'lük formaldehitte sulandırılmıştır (%4'lük formaldehit; 96 ml distile suya 4 ml formaldehit). Hemolemfde THS/ml hemosit sayımı hemositometrede tüm hücreler sayıldıktan sonra (Sepici-Dinçel ve diğerleri, 2013) metodunun modifikasyonu ile hesaplanmıştır.



Resim 3.5. *U. mancus eucirrus* hemolemf sıvısı alınması

3.2.4. Tatlı su midyesinden (*U. mancus eucirrus*) dokuların çıkartılması

Midyelerin hemolenfleri alındıktan sonra diseksiyon işlemine geçilmiştir. Diseksiyon işleminde biyokimya için ayrılan 10 örneğin her birinin solungaç ve sindirim bezi söz konusu dokulardaki biyobelirteçleri tespit etmek amacıyla alınarak alüminyum folyoya sarılmış, şoklama yöntemi ile sıvı azota atılmış ve parametre ölçümlerinin yapılacağı zamana kadar -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Resim 3.6. *U. mancus eucirrus* dokuları; a) solungaç b) sindirim bezi

3.2.5. Doku analizleri

Kullanılan aletler

- Homojenizatör MICCRA D-1 Mikro
- Hassas terazi SARTORIUS
- Santrifüj HETTICH Micro 200 R Soğutmalı
- Spektrofotometre BLOKIT EL X 800 Bioelisa Reader
- Spektrofotometre BIOCHROM Libra S22 UV/VIS
- Vortex HEIDOLPH
- Benmari Isıticılı Su Banyosu
- Derin dondurucu DAIHAN
- pH-metre JENWAY
- Magnetik karıştırıcı Isıticılı HEIDOLPH
- Kar makinesi ELECTROLUX
- Otomatik pipet

Kullanılan kimyasal maddeler

Trikloraasetik asit (TCA), etil alkol Merck firmasından alındı. 5,5' ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), tiyobarbitürik asit (TBA), bütül hidroksitoluen (BHT), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sodyum sitrat Sigma firmasından alındı.

3.2.6. Doku analiz yöntemlerinin uygulanması

Solungaç ve sindirim bezi TBARS düzeyinin ölçülmesi

Solungaç ve sindirim bezi dokusunda lipid peroksidasyon düzeyi tiyobarbitürik asit (TBA) reaktif madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı (Casini 1986; Kurtel 1992). Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk trikloroasetik asit (TCA) (100 mg doku + 900 μL %10'luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra 15 dakika süreyle 4 000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4 000 rpm'de 8 dakika tekrar santrifüj edildi. Örnekten 250 μL alınarak üzerine 10 μL %1'lik bütül hidroksitoluen (BHT) ve 250 μL %0,67'lik tiobarbitürik asit (TBA) eklendi. Daha sonra örnekler 100°C'da kaynayan su

banyosunda 15 dakika bekletildi. Daha sonra soğutularak 4 000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her bir örneğin absorbansı 532 nm’de tayin edildi. Solungaç ve sindirim bezi dokusu lipid peroksidasyon düzeyi $1,56 \times 10^5$ M/cm ekstinksiyon katsayısı kullanılarak malondialdehit (MDA) eşdeğeri olarak ifade edildi.

Solungaç ve sindirim bezi glutatyon düzeyinin ölçülmesi

Solungaç ve sindirim bezi dokusunda glutatyon (GSH) tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı (Aykaç 1985; Ellman 1959). Lipid peroksidasyonunda anlatıldığı şekilde solungaç ve sindirim bezi dokuları homojenize edilip santrifüj edildikten sonra, 100 µL süpernatant, 400 µL 0,3 M Na₂PO₄.2H₂O ve 50 µL ditiyobisnitrobenzoat (DTNB) (0,4 mg/ml %1’lik sodyum sitrat) çözeltisi ile karıştırıldı. Örnekler oda ısında 5-10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü ve glutatyon düzeyleri 13,600 M/cm ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Deney sonuçlarının değerlendirilmesi

MDA ve GSH tayini sonuçları gruplar arası farkın tespiti için önce normal dağılım ve varyansların homojenliği testlerinden geçirildi; bu şartları sağlayanlar parametrik t-testi ve tek yönlü ANOVA ile; sağlamayanlar bunların non-parametrik muadilleri olan Mann-Whitney U ve Kruskall Wallis H testleri ile analiz edildi. Anlamlılık düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Bakır Piritiyon'un Tatlı Su Midyesi (*D. polymorpha*) Üzerine Akut Toksik Etkisi

Bu çalışmada antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un zebra midye (*D. polymorpha*) üzerine akut toksik etkileri (LC₅₀) 24., 48., 72., 96. Saat ve 7 gün maruziyetten sonra statik biyodeneyle belirlenmiştir. Asıl dozlama deneylerinden önce ön deneyler yapılarak bakır piritiyon için maruziyet/uygulama konsantrasyon aralığı belirlenmiştir.

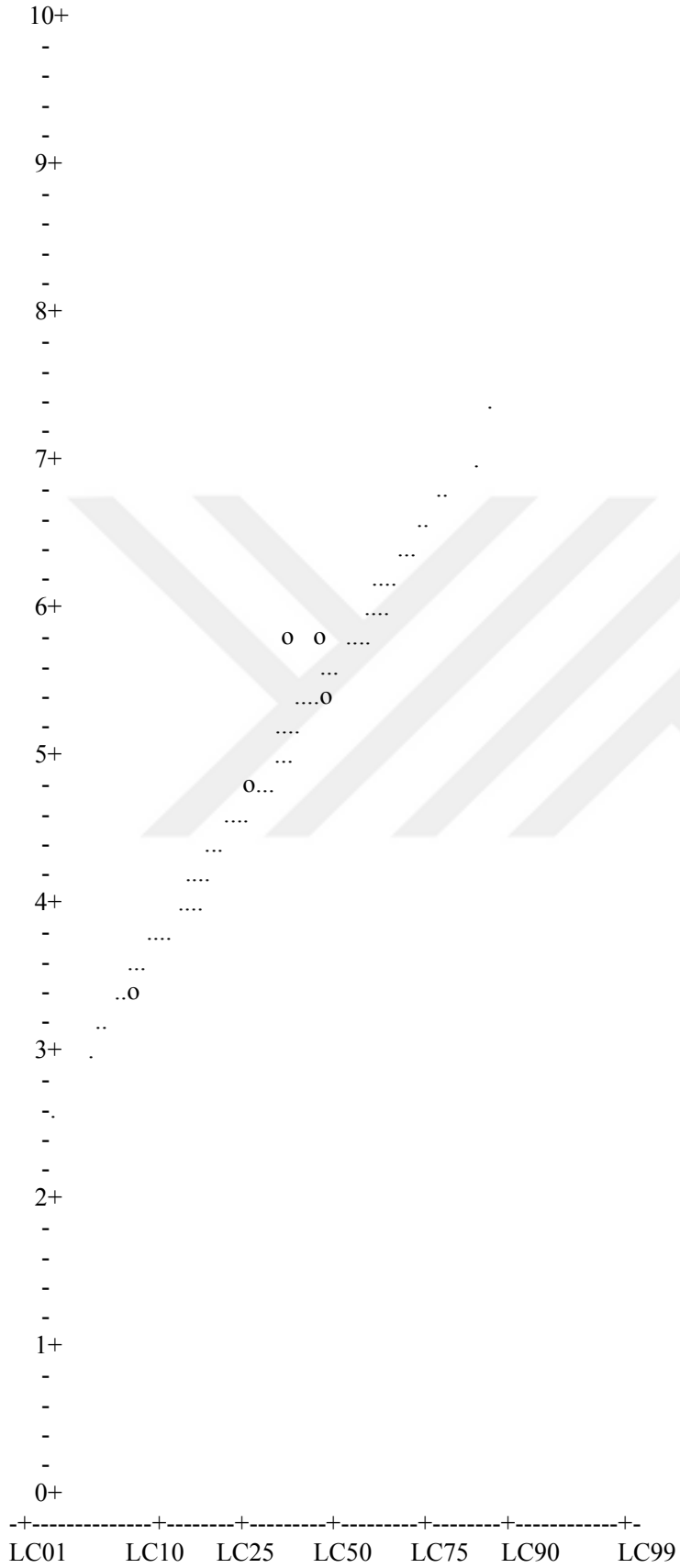
Toksisite deneyleri boyunca kontrol gruplarında ölüm saptanmamıştır. Deney grubunda ise ölen tatlı su midyeleri kapakçıklarının el yardımıyla açılıp tekrar kapanmadığı tespit edildikten sonra (yani ölüm gerçekleştiği için kapak kasları görevini yerine getiremez ve açık kalır) ölü/mortalite olarak değerlendirilmiştir.

Kullanılan statik biyodeneyle sisteminde 48 saatlik LC₅₀ değeri 7,32 µg/L olarak hesaplanmıştır. Yirmi dördüncü saat LC₅₀ değeri birey mortaliteleri hesap yapmaya uygun olmadığından, bulgu olarak verilememiştir. Akut toksisite 72., 96. saatlerde hesaplanmış ve diğer istatistik sonuçlarıyla birlikte çizelge 4.1 ve şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Zebra midye (*D. polymorpha*) üzerinde bakır piritiyon'un akut toksisitesi

CuPT maruziyeti (h)	LC ₅₀ (µg/L)	Güven Aralığı (%95)	Eğim ± S.E.M	Intercept ± S.E.M
48	7,32	Hesaplanamadı	0,98 ± 0,51	4,15 ± 0,37
72	52,72	1,30-	1,63 ± 0,80	2,17 ± 0,75
96	23,88	13,120 – 1040,40	1,90 ± 0,74	2,38 ± 0,67
7.Gün	8,72	Hesaplanamadı	2,11 ± 0,80	3,00 ± 0,68

Probit

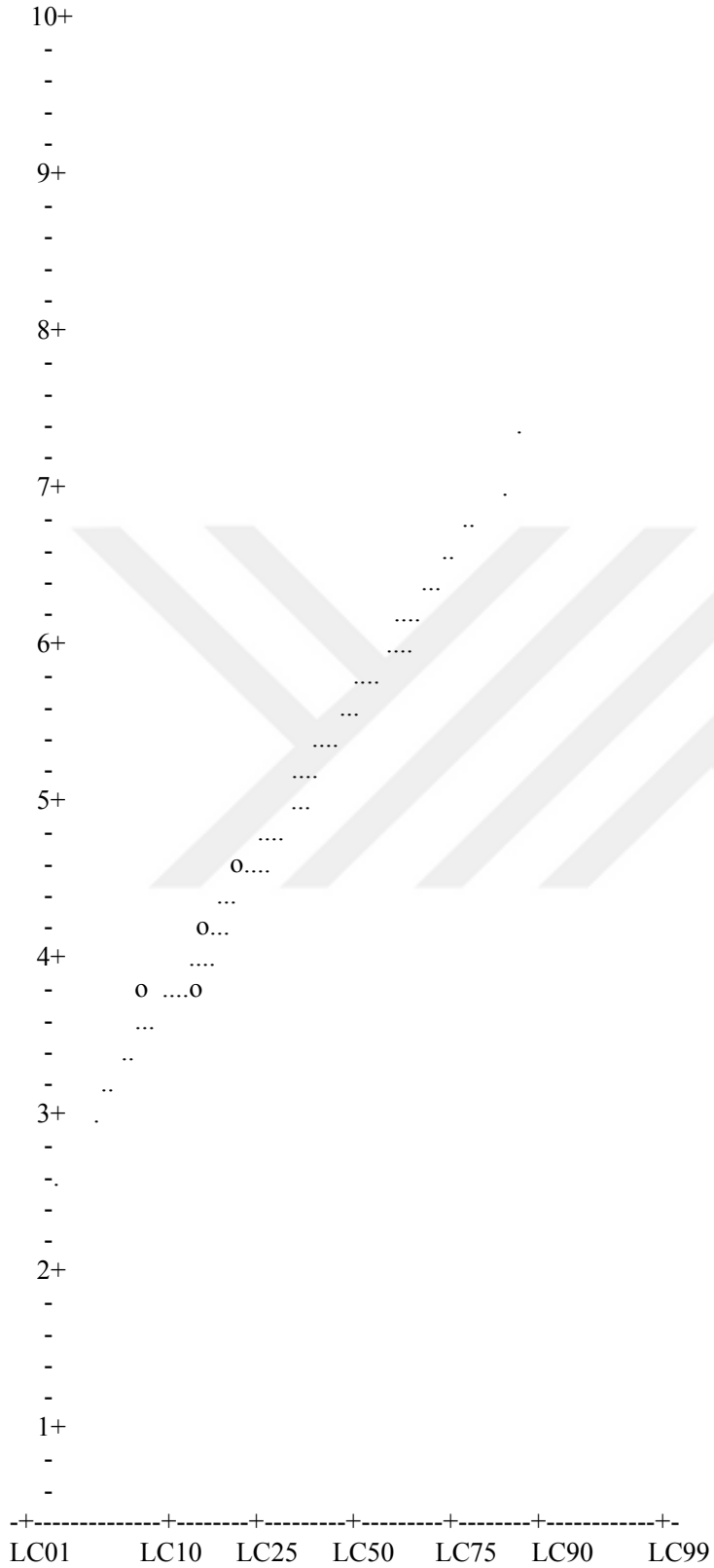


Şekil 4.1. Tatlı su midyesi (*D. polymorpha*) üzerine CuPT'nin 48 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği

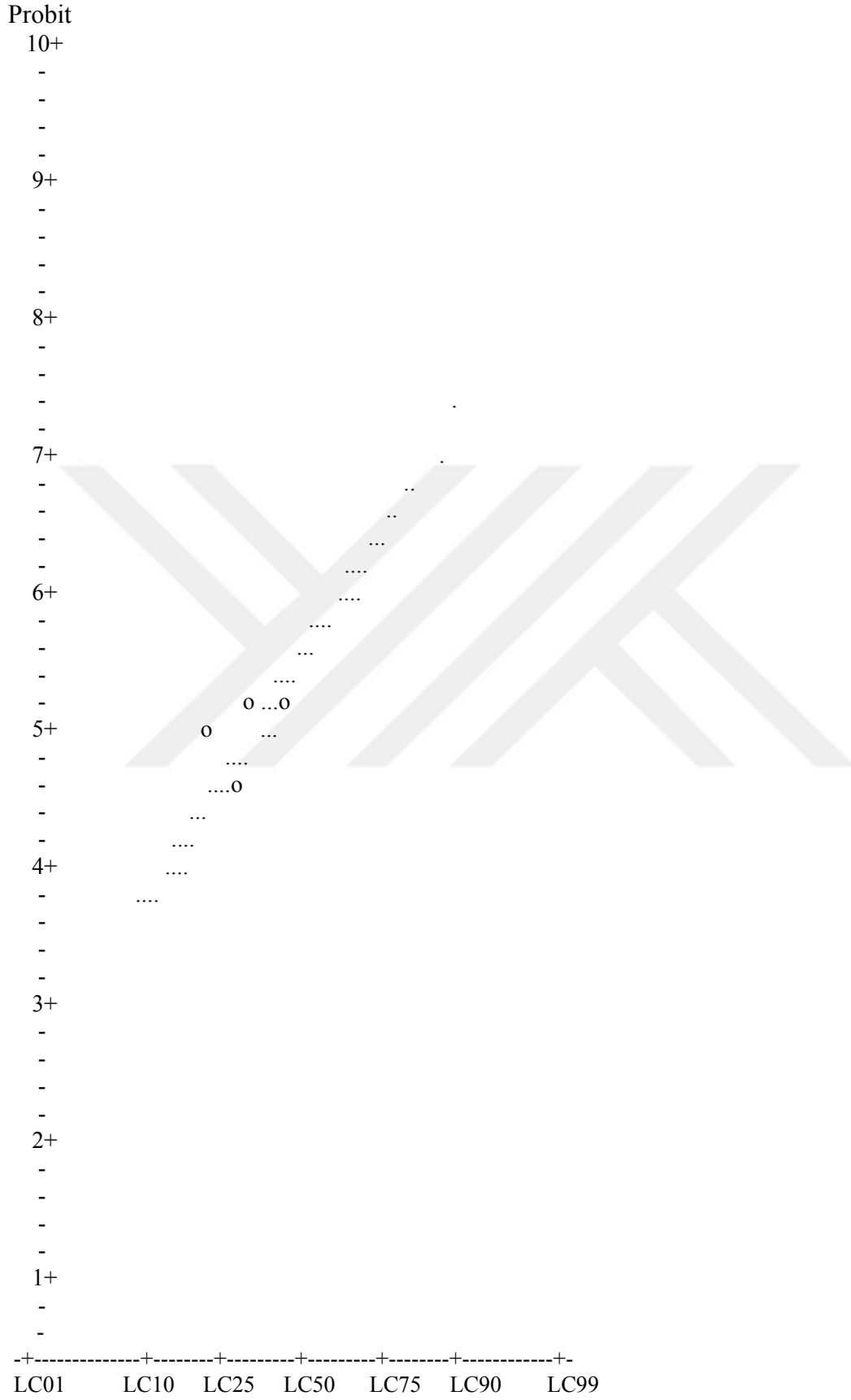


Şekil 4.2. Tatlı su midyesi (*D. polymorpha*) üzerine CuPT'nin 72 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği

Probit



Şekil 4.3. Tatlı su midyesi (*D. polymorpha*) üzerine CuPT'nin 96 saatlik akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği



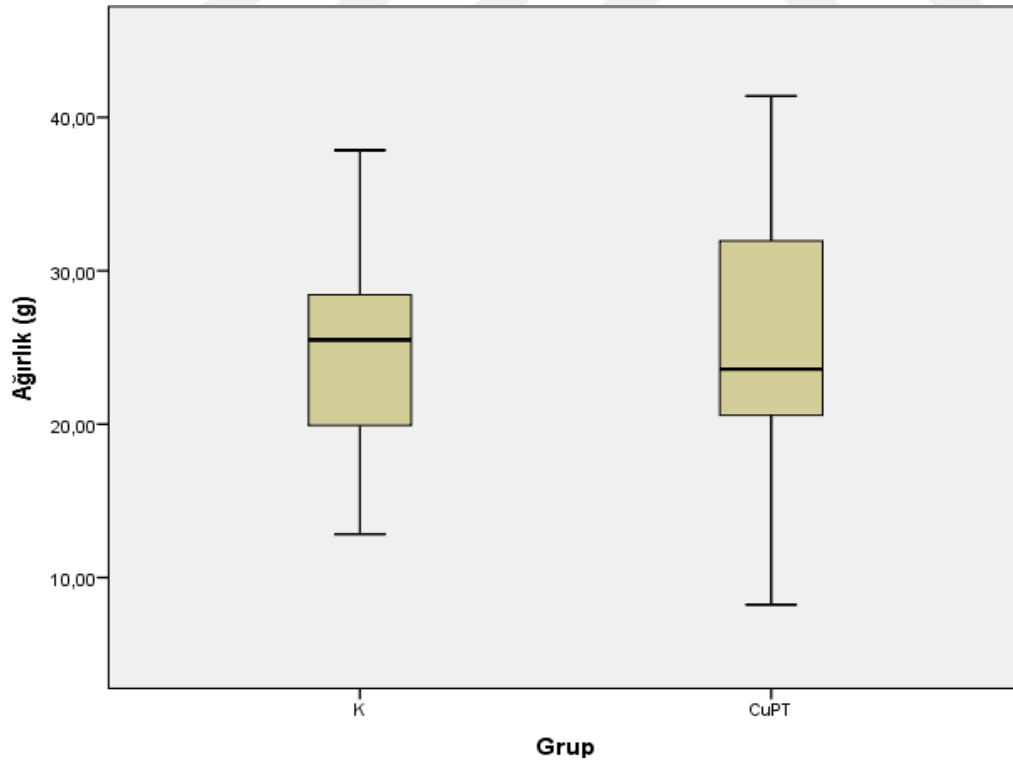
Şekil 4.4. Tatlı su midyesi (*D. polymorpha*) üzerine CuPT'nin 7 günlük akut toksisitesi ve hesaplanan probit değerleri regresyon grafiği

4.2. Bakır Piritiyon'un Tatlı Su Midyesi *Unio mancus eucirrus* Üzerine Subletal Toksik Etkisi

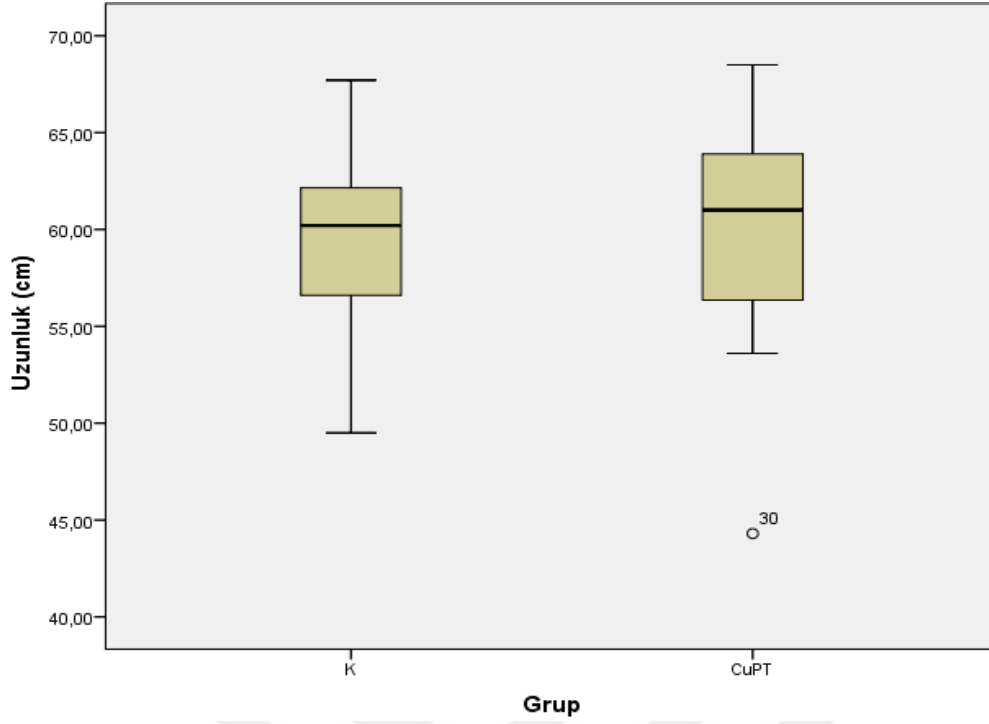
Bu çalışmada antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un indikatör tatlı su midyesi türü *U. mancus eucirrus* üzerine subletal etkisi incelenmiştir. Asıl deneyden önce daha önce yapılan ön çalışmalarda belirlenen 5 µg/L subletal maruziyet konsantrasyonu 96 saat uygulanmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO'da kontrole göre fark bulunamadığından verileri burada sunulmamıştır.

4.2.1. Toplam ağırlık-uzunluk-yükseklik-kalınlık sayısına ilişkin bulgular

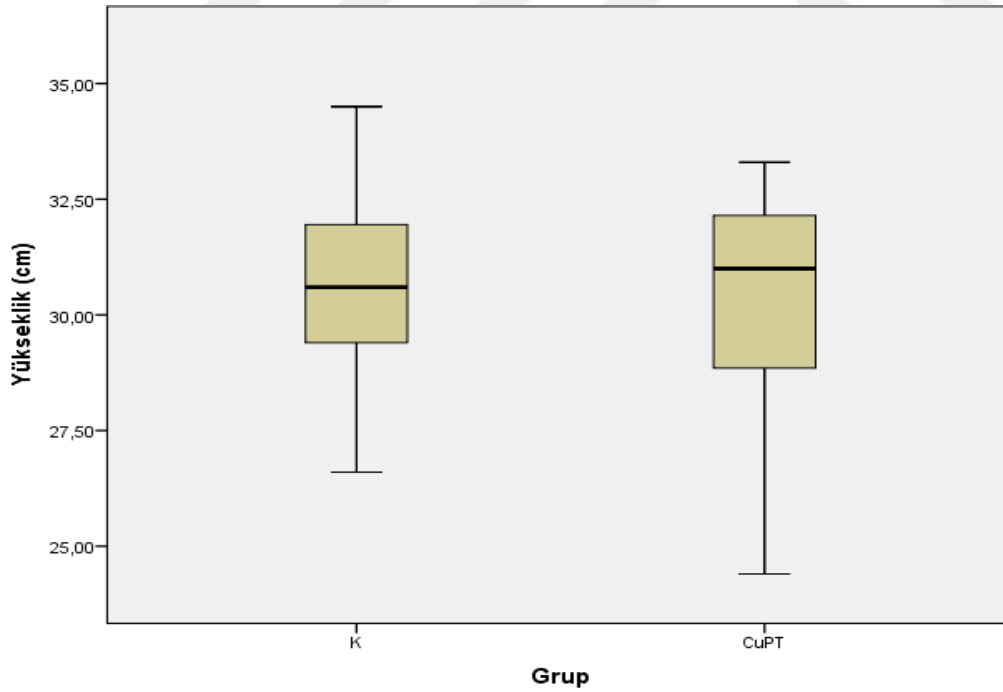
Doksan altı saatlik maruziyet deneyi süresince subletal bakır piritiyon'a maruz bırakılan tatlı su midyesi *U. mancus eucirrus*'un kontrol ve deney grubunda ortalama toplam ağırlık-uzunluk-yükseklik-kalınlık sayıları tespit edilmiştir. Kontrol ve deney grubu ortalama ağırlık-uzunluk-yükseklik-kalınlık sayıları arasında istatistiksel önem düzeyinde farklı bulunmamıştır ($p > 0,05$).



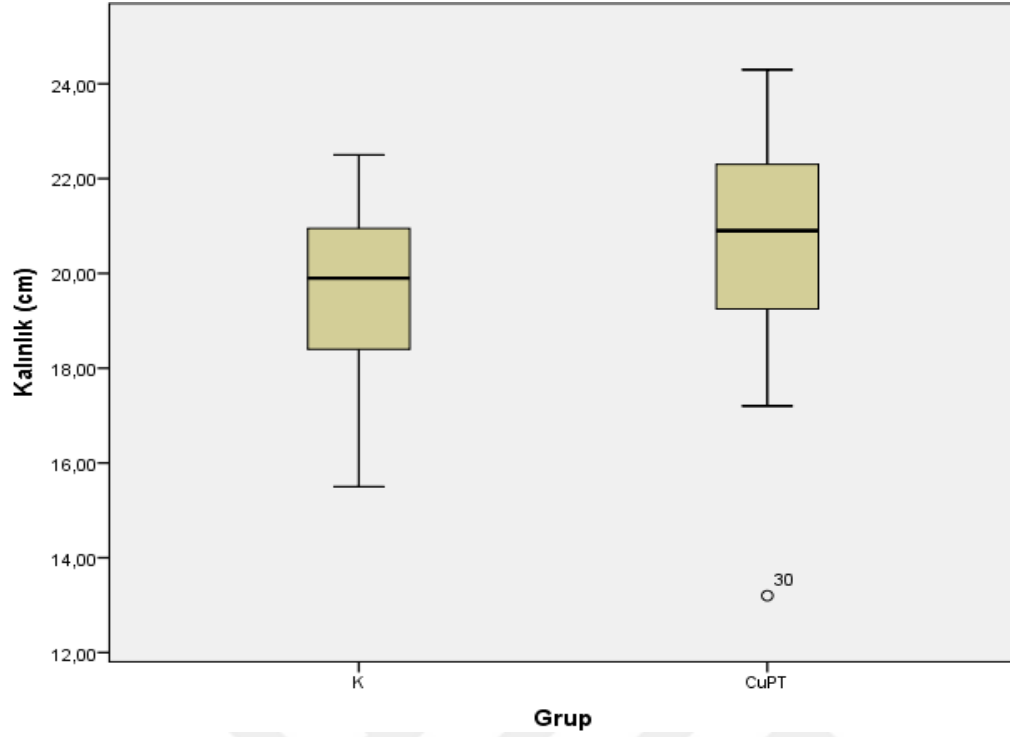
Şekil 4.5. Kontrol ve deney grubu toplam ağırlığın boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)



Şekil 4.6. Kontrol ve deney grubu toplam uzunlukların boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)



Şekil 4.7. Kontrol ve deney grubu toplam yüksekliklerin boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)



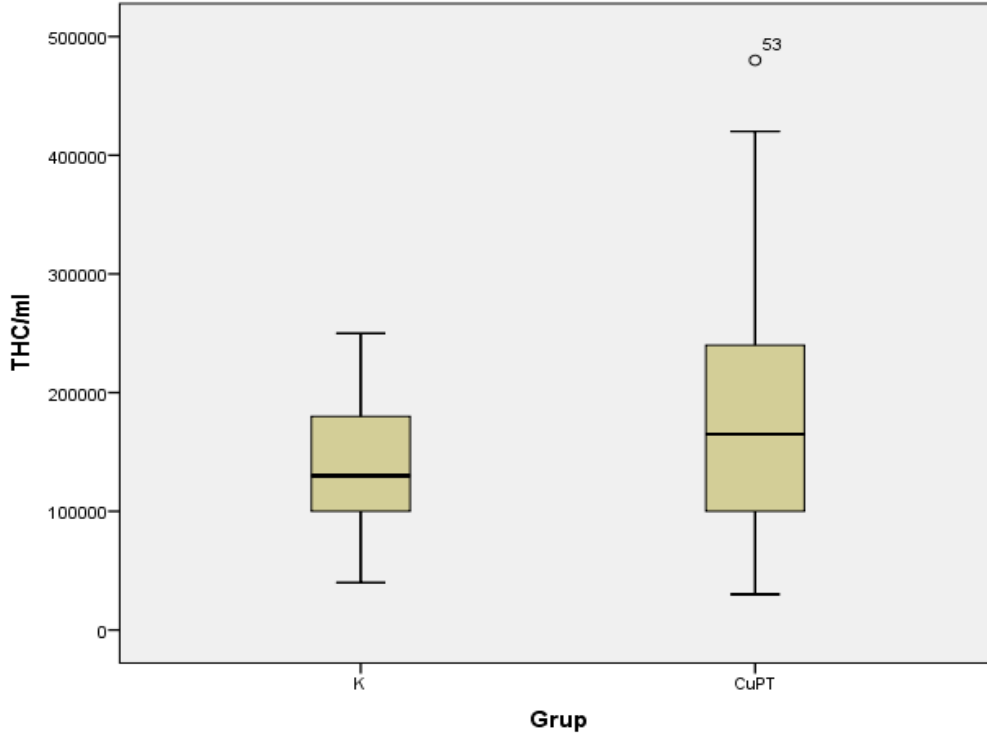
Şekil 4.8. Kontrol ve deney grubu toplam kalınlıkların boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Çizelge 4.2. *U. mancus eucirrus* türünde ağırlık, uzunluk, yükseklik, kalınlık parametreleri (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Grup	Ortalama $\pm$ SD	Güven aralığı (%95)
Ağırlık (g)		
CuPT	$25,90 \pm 2,30$	$20,97 \pm 30,83$
K	$24,83 \pm 1,94$	$20,68 \pm 28,10$
Uzunluk (cm)		
CuPT	$59,74 \pm 1,57$	$59,39 \pm 1,57$
K	$59,38 \pm 1,39$	$56,40 \pm 62,35$
Yükseklik (cm)		
CuPT	$30,30 \pm 0,62$	$28,99 \pm 31,63$
K	$30,57 \pm 0,61$	$29,26 \pm 31,88$
Kalınlık (cm)		
CuPT	$20,44 \pm 0,74$	$18,86 \pm 22,02$
K	$19,45 \pm 0,58$	$18,20 \pm 20,69$

4.2.2. Toplam hemosit sayısına ilişkin bulgular

Doksan altı saat deney süresince subletal ($5 \mu\text{g/L}$) bakır piritiyon'a maruz kalan tatlı su midyesi *U. mancus eucirrus*'un kontrol ve deney grubunda ortalama toplam hemosit sayıları THS/ml, sırasıyla: 139667 ± 10165 ; 179667 ± 20552) dır. Ortalama hemosit sayısı deney grubunda kontrol grubuna göre istatistik olarak artış göstermiştir ($p > 0,05$).



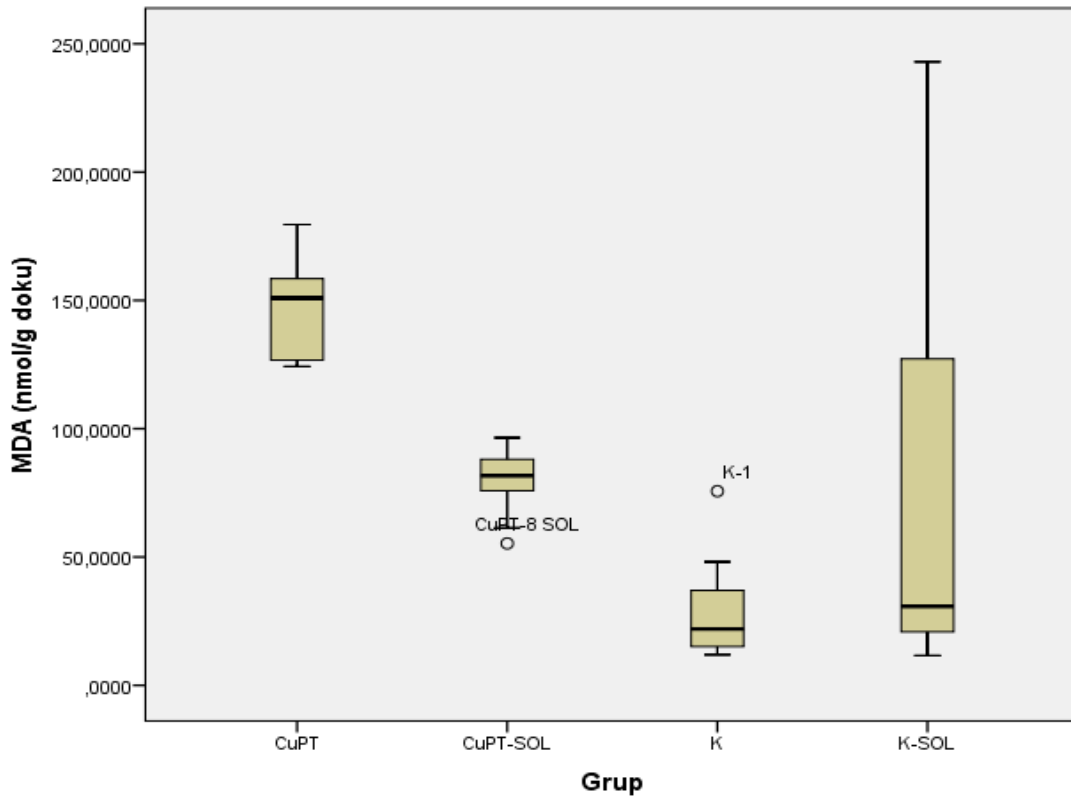
Şekil 4.9. Kontrol ve deney grubu hemosit sayılarının boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Çizelge 4.3. *U. mancus eucirrus* türünde toplam hemosit sayısı (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Grup	Ortalama $\pm$ SD	Güven aralığı (%95)
THS/mL CuPT	$179666,67 \pm 20552,614$	$137631,85 \pm 20552,614$
K	$139666,67 \pm 10165,112$	$118876,68 \pm 160456,66$

4.3. Doku Analizlerinden Elde Edilen MDA Bulguları

Doksan altı saat süresince subletal bakır piritiyon'a maruz kalan tatlı su midyesi *U. mancus eucirrus*'un sindirim bezi ve solungaç dokularındaki malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlenmiştir. Doksan altı saat boyunca bakır piritiyon'a maruz kalmış solungaç dokularındaki MDA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde artmıştır ($p > 0,05$). Sindirim bezi MDA düzeyleri ise kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$).



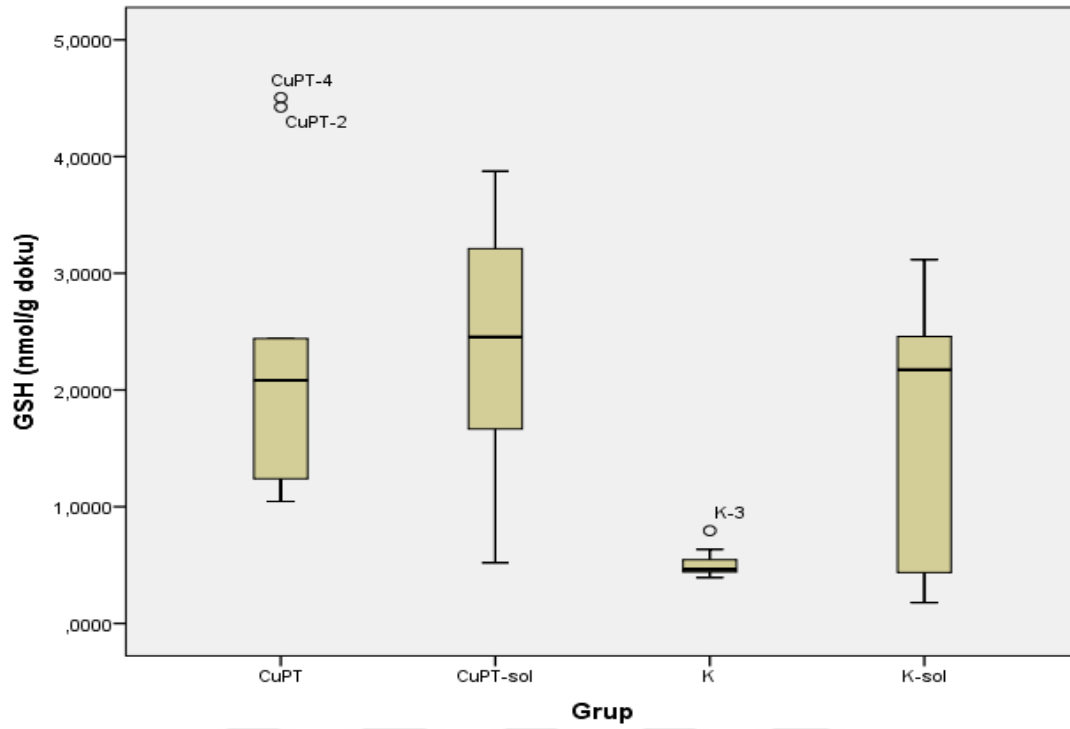
Şekil 4.10. Kontrol ve deney grubunun toplam MDA düzeyi farkları boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Çizelge 4.4. Dokulardan elde edilen toplam MDA değerleri (Sindirim bezi, “CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu; Solungaç dokusu “CuPT-sol”: Deney grubu, “K-sol”: Kontrol grubu)

Grup MDA (nmol/g doku)	Ortalama $\pm$ SD	Güven aralığı (%95)
CuPT	147,29 $\pm$ 6,00	131,35 $\pm$ 163,22
K	28,38 $\pm$ 6,38	13,95 $\pm$ 42,81
CuPT-sol	79,44 $\pm$ 3,99	70,43 $\pm$ 88,45
K-sol	74,16 $\pm$ 26,91	13,28 $\pm$ 135,04

4.4. Doku Analizlerinden Elde Edilen GSH Bulguları

Doksan altı saat süresince subletal bakır piritiyon’a maruz kalan tatlı su midyesi *U. mancus eucirrus*’un sindirim bezi ve solungaç dokularındaki glutatyon (GSH) düzeyleri belirlenmiştir. Doksan altı saat boyunca bakır piritiyon’a maruz kalmış solungaç dokularındaki ortalama glutatyon (GSH) düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştır ($p > 0,05$). Sindirim bezi glutatyon (GSH) düzeyleri ise kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.11. Kontrol ve deney grubunun toplam GSH düzeyi farkları boxplot grafiğinde karşılaştırılması (“CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu)

Çizelge 4.5. Dokulardan elde edilen toplam GSH değerleri (Sindirim bezi, “CuPT”: Deney grubu, “K”: Kontrol grubu; Solungaç dokusu, “CuPT-sol”: Deney grubu, “K-sol”: Kontrol grubu)

Grup GSH (nmol/g doku)	Ortalama $\pm$ SD	Güven aralığı (%95)
CuPT	$2,27 \pm 0,40$	$1,37 \pm 3,18$
K	$0,51 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,61$
CuPT-sol	$2,33 \pm 0,34$	$1,57 \pm 3,10$
K-Sol	$1,66 \pm 0,38$	$0,79 \pm 2,54$

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un zebra midyesi (*D. polymorpha*) üzerindeki akut toksik etkisi ve *Unio mancus eucirrus* üzerine subletal etkisi incelenmiştir. Zebra midyenin (*D. polymorpha*) bakır piritiyon'a 7 günlük akut maruziyet sonucu LC₅₀ değeri 8,72 µg/L olarak tespit edilmiştir. Deney sonuçlarına göre antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un zebra midye (*D. polymorpha*) için çok toksik olduğu saptanmıştır.

Toksikoloji çalışmalarında organizma seçiminde sudaki makro omurgasızlar biyotik faktörlerin tercih edilen indikatör türleri oldukları için değerli bir seçenektir. Omurgasız hayvanlar besin ağı nedeniyle hayvan türlerinin yaklaşık %95 kadarını etkileyebilecek düzeydedir. Bu grupta yer alan midyelerde yaşama alanlarının genişliği, canlılık faaliyetlerinin güçlü olması, üreme ve beslenme sistemleriyle nedeniyle biyoizlem çalışmalarında önemli indikatör türlerdir. Kirlilik göstergesi olarak midyelerin kullanılmaya başlanması 1950'lerde başlamış, 1970'lere gelindiğinde yaygınlaşmıştır (Van Hassel ve Farris, 2007). Zebra midyesi istilacı bir tür olduğundan günümüzde en büyük ve geri dönüşümü olmayan çevre problemi, iklim değişikliği dolayısıyla indikatör tür olarak son yıllarda kullanımı artmıştır. Yapılan araştırmalarda bakır piritiyon'un zebra midye (*D. polymorpha*) üzerine akut toksik etkisine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Zebra midye (*D. polymorpha*) daha çok ağır metal birikimi çalışmalarında embriyotoksikolojik, histopatolojik ve genotoksikolojik etkilerin incelenmesinde kullanılan tür olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalarda bakır piritiyon'un bazı omurgasızlar üzerindeki etkisinin (EC₅₀) ve mortalite ile hesaplanan toksisitesinin (LC₅₀) değerleri, birçok omurgalıya oranla daha yüksek derecede toksik olduğunu gösterilmiştir. Bu bağlamda yapılan bir toksisite çalışmasında Cyanobakter olan *Chroococcus minor* türü için 7 günlük EC₅₀ değeri ~50 µg/L, mikroalg olan *Skeletonema costatum* türü için 96 saatlik EC₅₀ değeri ~1,8 µg/L, Krustase olan *Tigriopus japonicus* türü için 96 saat LC₅₀ değeri 30 (26-36) µg/L, *Oryzias melastigma* türünün larvasına 96 saatlik LC₅₀ değeri 8,2 (8,0-8,4) µg/L olarak bildirilmiştir (Bao ve diğerleri, 2011). Bu sonuçlar bizimde çalışmış olduğumuz omurgasız canlı türü zebra midye (*D. polymorpha*) için tespit ettiğimiz 7 günlük LC₅₀ değeri ile örtüşmektedir.

Bir diğerk antifouling bileşik olan TBT ve TBTO toksisitesi, zebra midye gibi biyoizlem çalışmalarında kullanılan ve zebra midyesi ile birçok açıdan benzerlik gösteren *Mytilus edulis* üzerinde çalışılmış; 7 gün boyunca 0,5 µg/L ve üzeri konsantrasyonlarda TBT'ye maruz bırakılmış, midyelerdeki hücre canlılığında (nötral kırmızısı testi) anlamlı bir düşüş aktivitede değişiklik bulunmazken, DNA hasarı anlamlı artış göstermiştir (mikronükleus ve comet testleri; 0,5, 1 ve 5 µg/L TBTO). Bu çalışmada midyelerin 0,5 µg/L gibi düşük bir konsantrasyon maruziyetinde etkilenmesinde TBT'nin, bakır piritiyonile karşılaştırıldığında suda yarılanma sürelerinin farklı olması etkili olmuş olabilir (Hagger ve diğerleri, 2005).

U. mancus eucirrus ile yapılan subletal çalışma sonucundabakır piritiyon'a 96 saat maruziyette midyelerin ağırlık (g), uzunluk (cm), yükseklik (cm), kalınlık (cm) parametreleri maruz kalan deney ve kontrol grubunda incelenmiştir. Bakır piritiyon'a maruz kalan midyelerin ağırlıklarında, uzunluk, yükseklik ve kalınlıklarında kontrol grubuna göre fark gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$). Beklediğimiz farklılık büyüme üzerine herhangi bir etkinin incelenmesine yönelik değildir. Subletal dozun morfolometrik varyasyonlara göre değerlendirilmesini kapsar.

U. mancus eucirrus ile yapılan subletal çalışma sonucunda 96 saat süresince bakır piritiyon'a maruz kalan midyelerin hemosit sayılarının kontrol grubuna göre etkilerinde deney grubunda ortalama artış vardır; ancak kontrol grubuna göre bu artış istatistik olarak önemli düzeyde değildir ($p > 0,05$).

Zebra midye (*D. polymorpha*) hemositlerinin metal birikiminin incelendiği bir çalışmada hemositler kadmiyuma 21 saat süreyle maruz bırakılarak canlılık, fagositoz aktivite, oksidatif aktivite ve lizozomal içerik açısından incelenmiştir. Sonuç olarak kadmiyumun zebra midye hemositleri üzerinde zayıf etkiye sahip olduğu yalnızca test edilen en yüksek konsantrasyonda (10^{-3} M) etkisinin görüldüğü gözlemlenmiştir (Evariste ve diğerleri, 2017). Yukarıda belirtildiği gibi bu durum türün immün sistemi işleyişiyle ilgili olabilir. Bu sonuç bizimde savunduğumuz midyelerde çevresel kirleticilerin immün sistemi etkileyebileceği görüşünü destekler niteliktedir.

Gastropod *Haliotis diversicolor* (abalone) üzerinde TBT ve benzo[a]pyrene'nin (BaP) immün sisteme etkisinin incelendiği bir başka çalışmada, subletal BaP konsantrasyonuna

uzun süreli kronik maruz kalmanın bağışık ilişkili parametrelerin aktivitesinde değişim olarak immünokompetansını modüle ettiği gözlenmiştir. TBT'nin subletal konsantrasyonuna 21 gün boyunca maruz kalma sonucu, toplam hemosit sayısı, fagositoz, membran stabilitesi ve lizozom aktivitesi önemli derecede azalmıştır. Yirmi bir günlük maruziyetten sonra 14 gün iyileşme uygulanmış BaP'ne maruz kalan canlıların parametreleri normale dönmüş ve iyileşme gözlenmiştir. TBT'ye maruz kalan canlılarda 14 gün iyileşme uygulamasında hiçbir değişik gözlemlenmemiştir. Bu durum da TBT'nin BaP'den daha zararlı olduğu düşünülmüştür (Gopalakrishnan ve diğerleri, 2011). Bakır piritiyon, yasaklanan TBT'nin yerine önerilen alternatif bir bileşik olmasına rağmen çok toksiktir. Bizim çalışmamızda bakır piritiyon'a maruz kalma sonucu hemosit sayılarında artış gözlemlenmiştir. Bu farklılık immün sisteminin işleyişinin canlılarda farklı olmasıyla açıklanabilir. Midyelerde hemosiyanin kan pigmenti bulunur. Bizdeki demir elementinin aksine içinde bakır elementini ihtiva etmektedir. Bizim çalışmamızda hemosit sayısının artış göstermesinde hemolemin bakırı element olarak bağlamasının etkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca, TBT kadar toksik olduğunu düşündüğümüz bakır piritiyon'un böyle bir etki göstermesinde deneylerde farklı canlılar kullanılması, maruz kalma süresinin uzun olması ve bazı kimyasalların her canlıda farklı etkiler doğurabileceği sonucunu düşündürmektedir. Nitekim BaP'de bağışıklık parametrelerinde iyileşme görülmesi bu görüşü destekler niteliktedir.

Yağ asitlerinin oksidasyonu ile lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Bunların yıkımı ile biyoaktif aldehitler oluşur. Malondialdehit (MDA) bunlardan başlıcasıdır. MDA, lipid peroksidasyonunun bir parçalanma ürünüdür. *U. mancus eucirrus* midyesinin bakır piritiyon'a maruz kalması sonucu solungaç, sindirim bezi dokularının malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Solungaç dokularındaki malondialdehit (MDA) düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak artış göstermiştir ($p > 0,05$). Sindirim bezi MDA düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$).

Mytilus edulis midyesi ve *Crassostrea gigas* istridyesinde yapılan bir çalışmada canlılar ağır metaller olan gümüş, kadmiyum, bakır ve çinkoya 21 günlük maruziyetleri sonucu midyenin solungaçlarında ve sindirim bezlerinde MDA düzeyi artmış, istridyenin solungaçlarında MDA düzeyinde azalma görülmüştür (Gret ve diğerleri, 2002). Oksidatif strese bağlı olarak MDA düzeyinin artması beklenen bir durumdur. Midyenin solungaç ve

sindirim bezi MDA düzeyinde artış görülmesi bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan düşük moleküler ağırlıklı bir tripeptiddir. Doku antioksidanı olarak çok önemli bir savunma biyobelirtecidir. Zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli role sahiptir. Radikal kaynaklı hasara karşı koyar, enzimlere substrat olarak görev yapar. Glutasyon (GSH) oksidatif stres sürecinde vücutta azalır.

U. mancus eucirrus türünün bakır piritiyon'a maruz kalması sonucu solungaç, sindirim bezi dokularının glutasyon (GSH) düzeyleri belirlenmiştir. Solungaç dokularındaki glutasyon düzeyleri 96 saat sonunda kontrol grubuna göre ortalama olarak artış göstermiştir ($p > 0,05$). Sindirim bezi GSH düzeyi 96 saat sonunda kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli düzeyde artmıştır ($p < 0,05$).

Kontaminasyon özelliklerine göre biyolojik yanıtı incelemek için tatlı su bivalvi *Unio tumidus* dört farklı kontamine alana yerleştirilmiş ve 15 gün maruz bırakılmış. Sonuçta sindirim bezinde, solungaçlarda %70 oranında GSH düzeyleri azalmıştır. Oksidatif strese karşı savunma mekanizmasının çalıştığını ve redükte glutasyon depolarının azaldığını göstermektedir (Cossu, Doyotte, Babut, Exinger ve Vasseur, 2000).

Unio tumidus üzerinde yapılan bir başka çalışmada 30 µg/L bakır, 100 µg/L thiram'a ve iki kimyasalın kombinasyonuna üç gün midyeler maruz bırakılmıştır. Bakır ve thiram kombinasyonuna maruz kalan midyelerde GSH düzeyi önemli oranda azalmıştır. MDA oranı kimyasala maruz kalan midyelerde kontrole göre artış göstermiştir (Doyotte ve diğerleri, 1997). Bu çalışmalardan elde edilen sonucun bizim çalışmamızdan farklı olmasında maruziyet süresinin farklı olması, etki eden kimyasal türünün farklı olması ve midye türünün farklı olmasının etkili olduğu düşünülebilir.

Antifouling bileşik olan bakır piritiyon'un iki tür tatlı su canlısı üzerindeki akut toksisite ve subletal etkilerinin incelendiği çalışmamızda bakır piritiyon'un zebra midye (*D. polymorpha*) üzerinde çok toksik olduğu; *U. mancus eucirrus* üzerinde subletal uygulama sonucu biyokimyasal etkiler meydana geldiği gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Midyeler suyu süzerek beslenen, yumuşak vücut dokuları nedeniyle çeşitli maddeleri biriktirebilen canlılardır. Bu nedenle denizsel ve tatlı sularda kirliliğin izlenmesi tercih edilen canlılardır. Bizim deneyimizde kullandığımız zebra midyesi (*D. polymorpha*) türü tatlı sularda yaşamaktadır, fakat %5 oranında tuzluluğu tolere edebildiği için acı sularda da yaşayabilir, gametleri hareketli olduğu için çevre sulara da yayılarak gelişebilirler. Bu nedenlerden dolayı toksisite çalışmalarında kullanılabilecek önemli bir indikatör türüdür. Bir diğer tür *Unio mancus eucirrus* midyesinin etli yapısı sayesinde yumuşak doku yüzeyi geniş metal birikimi incelenmesinde ender türlerden birisidir. Bu canlı türüyle ilgili daha önce bu formatta bir çalışmaya rastlanmamış olması nedeniyle bulgularımız önem taşımaktadır.

Antifouling bileşiklerin zararlı etkileri son yıllarda daha kapsamlı araştırmaların yapılması sonucu dikkat çekici hale gelmiştir. Gemilerde biyofouling oluşumunun gemiye zararlı etkilerini önlemek amacıyla alternatif yollar geliştirilse de kimyasal yöntemler halen daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir kimyasal maddenin besin zincirine girerek sucul canlılarda birikmesi biyoakümülayon olarak adlandırılır. Biyomagnifikasyon ise suda bulunan kimyasal maddenin sudaki canlılarda besin zincirinin üst seviyelerine doğru gittikçe artan yoğunluklarda birikmesi olayıdır. Bakır piritiyon gibi suya karışan kimyasal maddeler, suda bulunan canlılarda besin zinciri yolu ile biyoakümülayon ve biyomagnifikasyona neden olabilmektedir.

Bakır piritiyon biyosidal ürünler içinde kullanımı giderek artış gösteren güçlü toksik etkiye sahip bir kimyasaldır. Antifouling bileşikler içinde de giderek artan oranlarda kullanılmaktadır. Bu nedenle yakın dönemde hedef olmayan canlılar üzerinde toksik etki oluşturan kimyasallar içinde üst sıralarda yer alacağı öngörülebilir. Bu tür biyositlerin mutajenite etkileri ve endokrin sistemin sinyal yollarına etki ettiği için endokrin bozucu etkileri olduğu düşünülmektedir (Cui ve diğerleri, 2014).

Çalışma kapsamında elde edilen veriler doğrultusunda bakır piritiyon'un uzun süreli veya yüksek dozlarda kullanımının, besin zinciri yoluyla insanlar ve hayvanlar üzerinde akut ve subakut toksik etkilerinin görülebileceği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgularla midye grubu canlılarda yapılacak genotoksik ve histolojik çalışmalara zemin hazırlamıştır. Metal

birikimi ve etkilerinin incelenmesi konusunda daha çok deniz türleri tercih edilmiştir. Biz de yaptığımız çalışmayla tatlı su midyeleri üzerindeki etkisini gözlemleyerek literatüre katkı sağlamış bulunmaktayız.

Dünyanın büyük bir kısmının suyla kaplı olması ve deniz araçlarının kullanımının fazla olması nedeniyle bakır piritiyon'un öngörülen zararlı etkileri dikkate alınarak doğal yaşama ve insan sağlığına olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve en aza indirmek için gerekli tedbirlerin yapılan araştırmalar doğrultusunda daha dikkatli olarak alınması gerekmektedir.

Bakır piritiyon gibi kimyasal etkisi yüksek olan maddelerin kullanıma ilişkin daha kapsamlı önlemler alınarak olumsuz etkilerinin en aza indirgenmesi sağlanmalıdır. Türkiye'de üç tarafı denizlerle çevrili olan, deniz araçlarını yoğun olarak kullanan ve birçok ülkenin deniz araçlarına geçiş sağlaması nedeniyle fazlasıyla suları bu kimyasallara maruz kalan bir ülke olarak bu konuda gerekli adımları atmalı, bu alanda yapılan araştırmaları arttırmalı ve gerekli merciiler bu konuda bilgilendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Almond, M. K., Trombetta, D. L. (2016). The effects of copper pyrithione, an antifouling agent, on developing zebrafish embryos. *Ecotoxicology*, 25, 389–398.
- Araujo, R., Gómez, I., and Machordom, A. (2005). The Identity and biology of *Unio mancus* Lamarck, 1819 (= *U. Elongatulus*) (Bivalvia: Unionidae) in the Iberian peninsula. *Journal of Molluscan Studies*, 71(1), 25-31.
- Arai, T., Harino, H., Ohji, M., Langston, W. J. (Editors). (2009). *Ecotoxicology of antifouling biocides*. Japan: Springer Publishing, 5-7, 24, 39, 40.
- Aytuğ, H. K. (2014). Sürdürülebilir su kullanımı açısından Avrupa Birliği çevre politikalarına Türkiye'nin uyumu. *Ekonomik ve Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 10(2), 7-8.
- Arch Chemicals. (Ağustos, 2008). *Copper Pyrithione*. Product Stewardship summary.
- Advisory Committee on Pesticides. (2005). Food and Environment Protection Act 1985, Part III. (No: 223). Copper pyrithione as a new active ingredient in Professional antifouling products. *Safety for People and The Environment*, 30(4), İx-xvii.
- Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., ve Öz, H. (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase, and glutathione transferase in rats, *Toxicology*, 36(2), 71-76.
- Arch Chemicals. (2010). Material safety data sheet (MSDS) Arch UK Biocides. 1272/2008/EC version number 5, 4-7.
- Binelli, A., Torre, D. C., Magni, S., and Parolini, M. (2014). Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution*, 196, 386-403.
- Başçınar, S. N., (2009). Bentik canlılar ve biyoindikatör tür. *Sümae Yunus Araştırma Bülteni*, 9(1), 1-8.
- Bobat, A., Hengirmen, O. M., and Zaplethal, W. (2001). Tatlısu Ekosisteminde Teknik, Ekonomik ve Ekolojik bir Zararlı: Zebra Midye. *Kırsal Çevre Yıllığı*, 112-127.
- Bao, V. W. W., Leung, K. M. Y., Qiu, J. W., and Lam, M. H. W. (2011). Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1147-1151.
- Borg, D.M., Trombetta, L.D. (2010). Toxicity and bioaccumulation of the booster biocide copper pyrithione, copper 2-pyridinethiol-1-oxide, in gill tissues of *Salvelinus fontinalis* (brook trout). *Toxicology and Industrial Health*, 26(3), 139–150.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., and Vasseur, P. (2000). Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2), 106-121.

- Cui, Y. T., Teo, S. L. M., Leong, W., and Chai, C. L. L. (2014). Searching for “Environmentally-Benign” antifouling biocides. *International Journal of Molecular Science*, 15, 9255-9284.
- Casini, A. F., Ferrali, M., Pompella, A., Maellaro, E., and Comborti, M. (1986). Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice, *Am J Pathol*, 123(3), 520-531.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2015/984 of (24 June 2015) approving copper pyrrithione as an existing active substance for use in biocidal products for product-type 21. *Official Journal of The European Union*, 159/43.
- Demirel, Y. K. (2012). *Yüzey Kirliliğinin Gemi Direnci Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 9.
- Dinçel, S. A., Alparslan, N. Z., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Sarıkaya, R., Özkul, İ. A., ve Erkoç, F. (2013). Hemolymph biochemical parameters reference intervals and total hemocyte counts of narrow clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Ecological Indicators*, 24, 305-309.
- Dahllöf, I., Grunnet, K., Haller, R., Hjorth, M., Maraldo, K., and Peterson, D. G. (2005). *Analysis, fate and toxicity of zinc and copper pyrithione in the marine environment*, TemaNord (2005: 550).
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M. C., Babut, M., and Vasseur, P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39(2), 93-110.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochemical Biophys*, 82, 70-77.
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., and Betoulle, S. (2017). Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 78-85.
- Erensoy, H. (2013). Biyosidal ürün olarak antifouling boyaların durumu. *Boyatürk Dergisi*. Ağustos-Eylül sayısı, 84.
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 1541-1560.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin V., Bebianno, M. J., and Cosson, R. P. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, 15(1), 61-66.
- Gopalakrishnan, S., Huang, W. B., Wang, Q. W., Wu, M. L., Liu, J., and Wang, K. J. (2011). Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities

of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154(2), 120-128.

Hagger, J. A., Depledge, M. H., and Galloway, T. S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 811-816.

İnternet: Seyitoğlu Faruk. Probit Regresyon Analizi. Prezi's privacy settings.URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fprezi.com%2Fal_xpwb8mip%2Fprobit-regresyon-analizi%2F&date=2017-04-30, Son Erişim Tarihi: 30.04.2017.

İnternet: Marsden, J.E. Global Invasive Species Database. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.iucngisd.org%2Fgisd%2Fspecies.php%3Fsc%3D50&date=2017-04-30>, Son Erişim Tarihi: 30.04.2017.

İnternet: Sinop Valiliği. URL: <http://www.sinop.gov.tr/cografya>. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.sinop.gov.tr%2Fcografya&date=2017-04-30>, Son Erişim Tarihi: 30.04.2017.

İnternet: Sinop Coğrafyası. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fyunus.hacettepe.edu.tr%2F%7Eb9619011%2Fgenelsinop.htm&date=2017-04-30>, Son Erişim Tarihi: 30.04.2017.

İnternet: Kesikköprü Barajı ve Hidroelektrik Santrali. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Ftr.wikipedia.org%2Fwiki%2FKesikk%C3%B6pr%C3%BC_Baraj%C4%B1_ve_Hidroelektrik_Santrali&date=2017-04-30, Son Erişim Tarihi: 30.04.2017.

İnternet: Lopes-Lima , M. & Seddon, M.B.. unio mancus. The IUCN Red List of Threatened. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.iucnredlist.org%2Fdetails%2F22737%2F0&date=2017-05-31>. Son Erişim Tarihi: 31.05.2017.

İnternet: Nihat Keleş. Anti-Fouling Boyalar. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.bilgiustam.com%2Fanti-fouling-boyalar%2F&date=2017-05-27>, Son Erişim Tarihi: 27.05.2017.

Koutsaftis, A., and Aoyama, I., (2008). Toxicity of diuron and copper pyrrithione on the brine shrimp, *Artemia franciscana*: the effects of temperature and salinity. *Journal of Environmental Science and Health Part A*,43, 1581-1585.

Kurtel, H., Granger, D. N., Tso, P., Grisham, M.B. (1992). Vulnerability of intestinal interstitial fluid to oxidant stress, *Am J Physiol*, 263: G573-G578.

Keskinbalta, M. A. (2015). *Sinop İli Karasu Çayı'nda Bulunan Tatlı Su Midyelerinin (Unio pictorum, Linnaeus 1758) bazı Biyometrik ve Biyokimyasal Özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi, Sinop Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sinop, 12.

Lonza (2012). *EPA approves Lonza's copper omadine antimicrobial for use as antifouling agent on vessels larger than 25 meters*. Lonza Microbial Control. Atlanta, GA (30328).

- Mochida, K., Ito K., Harino, H., Kakuno, A., and Fujii, K. (2006). Acute toxicity of pyrrithione antifouling biocides and joint toxicity with copper to red sea bream (*Pagrus major*) and toy shrimp (*Heptacarpus futilirostris*). *Environmental Toxicity and Chemistry*, 25(11), 3058-3064.
- Mochida, K., Ito, K., Harino, H., Tanaka, H., Onduka, T., Kakuno, A., and Fujii, K. (2009). Inhibition of acetylcholinesterase by metabolites of copper pyrrithione (CuPT) and its possible involvement in vertebral deformity of a CuPT-exposed marine teleostean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149, 624-630.
- Orman ve Su İşleri Bakanlığı Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü. (2012). *Zebra midye ile mücadelede filtrasyon ve boya denemeleri sonuç raporu*, (DSİ). AR-GE Proje No: 2011/1, 1-3.
- Okay, O. S. (2004, 24-25 Aralık). *Antifouling içeren gemi boyalarının uluslararası kurallar çerçevesinde kirletici etkilerinin incelenmesi*. Gemi Mühendisliği ve Sanayimiz Sempozyumu, İstanbul.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (1993). *OECD guidelines for testing of chemicals*, Paris.
- Özan, H. (2014, 19-23 Mart). *Antifouling boyalar ve çevreye etkileri*. Ulusal Biyosidal Kongresi, Antalya.
- Öktener, A. (2004). Sinop ve Bafra'da bazı tatlısulardaki mollusca türleri üzerine bir ön araştırma. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 17(2), 21-30.
- Romano, J. A., Rittschof, D., McClellan-Green, P. D., and Holm, E. R. (2010). Variation in toxicity of copper pyrrithione among populations and families of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 26(3), 341-347
- Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J., and Deudero, S. (2011). Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquatic Toxicology*, 101, 540-549.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı (THSK) (2015). *Bilgilendirme Broşürleri* (No: CS.AB-003-10-2015).
- THSK, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı *Biyosidal Ürünler Yönetmeliği Resmi Gazete Tarihi*:(31.12.2009) Resmi Gazete Sayısı: 27449 4.
- Turner, A., Barrett, M., and Brown, M. T. (2009). Processing of antifouling paint particles by *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*, 157(1), 215-220.
- Tunca, S. K. (2015). *Permetrin'in Tatlı Su İstakozlarında (Astacus leptodactylus Esch. 1823) Toksik Etkilerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 16-31.

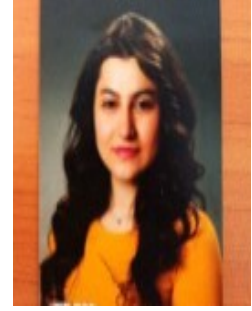
- Wang, H., Li, Y., Huang, H., Xu, X., and Wang, Y. (2011). Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin embryo test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 692-703.
- Vural, N. (2005). *Toksikoloji*, 975-482-289-1, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, 228-229.
- Van Hassel, J.H. and Farris, L. J. (2007). A review of the use of unionid mussels as biological indicators of ecosystem health 2. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*, 19-31.
- Yünlü, K. (2011, 14 Haziran). *Bor esaslı yeni nesil antifouling boyalar*. Tübitak Marmara Araştırma Merkezi Malzeme Enstitüsü. “Savunma Sanayiinde Bor’un Kullanımı” konulu çalıştay’da sunuldu. Savunma Sanayii Müsteşarlığı, Ankara.
- Qian, Y. P., Chen, L., and Xu, Y. (2013). Mini review: Molecular mechanisms of antifouling compounds. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 29(4), 381- 400.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : PAÇAL, Elif
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 09.11.1991, Konya
 Medenihali : Bekâr
 e-mail : elifpcl@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yükseklisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji ABD	Devam ediyor
Lisans	Selçuk Üniversitesi/Biyoloji	2014
Lise	Selçuklu Atatürk Lisesi	2009

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Gümüş, B. A., Paçal, E., Karasu Benli, A. Ç., Erkmen, B., Yıldırım, F., Gül, G., Batmaz, G., ve Erkoç, F. (2015). *Copper pyrithione'un Dreissena polymorpha (Zebra Midyesi) üzerindeki akut toksisitesinin araştırılması*, 2. Ulusal Biyosidal Kongresi, 9-13 Kasım 2015, Çeşme, İzmir, PS-064, s. 230.

Yıldırım, F., Karasu Benli, A. Ç., Gümüş, B. A., Erkmen, B., Gül, G., Batmaz, G., Paçal, E., ve Erkoç, F. (2015). *Biyosidal aktiviteli zinc pyrithione'un istilacı tür Dreissena polymorpha (Zebra midyesi)'ya akut toksisitesi*, 2. Ulusal Biyosidal Kongresi, 9-13 Kasım 2015, Çeşme, İzmir, PS-065, s. 231.



GAZİ GELECEKTİR..