

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Daphnia magna*'DA TRİBENURON METİL TOKSİSİTESİNE
FARKLI ÇEVRESEL AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİ**

ARİF ÇAKMAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2018

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Daphnia magna*'DA TRİBENURON METİL TOKSİSİTESİNE FARKLI
ÇEVRESEL AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİ**

Arif ÇAKMAK

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Bu tez 06/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER
Danışman

Doç.Dr. Petek PİNER BENLİ
Üye

Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Üye

Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI
Üye

Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Üye

Prof. Dr. Refet KARADAĞ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Daphnia magna'DA TRIBENURON METİL TOKSİSİTESİNE FARKLI ÇEVRESEL AMONYAK DERİŞİMLERİNİN ETKİSİ

Arif ÇAKMAK

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER
İkinci Danışman : Doç.Dr. Petek PİNER BENLİ
Yıl : 2018, Sayfa sayısı: 58+XIII

Jüri : Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER
Doç.Dr. Petek PİNER BENLİ
Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI
Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışmada amaç, aynı sucul ortamda bir arada bulunması olası antropojenik kaynaklı tribenuron metil herbisidi ile abiyotik faktör olan amonyağın ayrı ya da karışımlarının çevresel derişimlerinde *Daphnia magna*'da toksik etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, *D. magna* örnekleri tribenuron metil ve amonyağın iki farklı çevresel derişiminin 96 saat subakut etkisinde ve 21 gün kronik etkisinde bırakılmıştır. GPx, GST, tChE enzim aktiviteleri ile TBARS ve total protein düzeyleri spektrofotometrik yöntemler ile, mitokondriyal membran polarizasyonu fluoresan boyama yöntemi ile, sitokrom *c* ve AMPK protein derişimleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. GST ve tChE enzim aktiviteleri ile TBARS ve total protein düzeyleri hiçbir uygulama grubunda değişim göstermemiştir. Yüksek derişim amonyak ve tribenuron metilin birlikte etkisinde GPx aktivitesi, ayrı uyguladıkları gruba oranla artmıştır. Tüm gruplarda MMP depolarizasyonu olmasına karşın en belirgin etki yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil karışım grubundadır. Sitokrom *c* miktarı, düşük derişim amonyağın ayrı ve tribenuron metil ile karışım halinde verildiği grupta artmıştır. AMPK protein miktarı düşük derişim amonyağın ayrı uygulandığı grup hariç tüm gruplarda artış göstermiştir. Sonuçlarımıza göre GST ve tChE enzim aktiviteleri *D. magna*'da tribenuron metil ve amonyak etkisi için biyomarkır olarak kullanılamaz. Amonyak ve tribenuron metil farklı mekanizmalar ile *D. magna*'da enerjetik strese yol açmaktadır. AMPK ve MMP analizi bu toksikantlar için biyomarkır olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Tribenuron metil; Amonyak; *Daphnia*; Sitokrom *c*; AMPK

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS of ENVIRONMENTAL AMMONIA CONCENTRATIONS on TRIBENURON METHYL TOXICITY in *Daphnia magna*

Arif ÇAKMAK

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER
Advisor : Assoc.Prof.Dr. Petek PİNER BENLİ
Year : 2018, Number of pages: 58+XIII

Jury : Assoc.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER
Assoc.Prof.Dr. Petek PİNER BENLİ
Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI
Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

The aim of the present study is to investigate the toxicity of the herbicide tribenuron methyl as an anthropogenic agent and ammonia as an abiotic factor on *Daphnia magna* at their environmental levels. They may coexist in the same environment. For this aim, *D. magna* specimens were exposed to tribenuron methyl and two different environmental levels of ammonia in 96 hours subacute and 21 days chronic durations. GPx, GST, tChE enzyme activities and TBARS and total protein concentrations were determined spectrophotometrically. MMP was analysed by fluorescence staining. Cytochrome *c* and AMPK protein concentrations were analysed by Western blotting. GST, tChE enzyme activities and TBARS and total protein levels did not change during subacute experiments. GPx activity increased in higher ammonia and tribenuron methyl mixture group compared to single administration groups of these toxicants. MMP depolarized in all the exposure groups; while it most affected in higher ammonia and tribenuron methyl mixture group. Cytochrome *c* protein level elevated in the effect of lower ammonia and lower ammonia and tribenuron methyl mixture groups. AMPK protein level increased in all the exposed daphnids except the lower ammonia exposure group. According to our results, GST and tChE cannot be considered as a biomarker for ammonia and tribenuron methyl intoxication in *D. magna*. The most probably, ammonia and tribenuron methyl caused an energetic crisis in *D. magna* but in discrete mechanisms. MMP and AMPK might be used as a good biomarker for these toxicants.

Key Words: Tribenuron methyl; Ammonia; *Daphnia*; Cytochrome *c*; AMPK

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBEYL/2014-0003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BEYAN

“*Daphnia magna*’da Tribenuron Metil Toksisitesine Farklı Çevresel Amonyak Derişimlerinin Etkisi” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Arif ÇAKMAK

imza

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince değerli yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanlarım Sayın Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER'e, Sayın Doç.Dr. Petek PİNER BENLİ'ye, tez çalışmam için gerek analiz gerekse de yazım sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN ve Sayın Dr.Öğr.Üyesi Celal GÜVEN'e, *Daphnia magna* örneklerinin kültürü konusunda değerli yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş.Gör.Dr. Serdar SÖNMEZ'e, Biyoloji Bölümü laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI'ya, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı olanaklarından faydalanmamı sağlayan başta Müdür Sayın Prof.Dr. Hasan SOLMAZ ve Müdür Yardımcısı Sayın Dr.Öğr.Üyesi Aysel ALKAN UÇKUN olmak üzere tüm çalışanlarına, floresan *in vivo* görüntülemedeki yardımlarından ötürü başta Sayın Uzman Biyolog Seher KURU olmak üzere Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim ve Araştırma Merkezi yönetici ve çalışanlarına, çalışma materyalim olan *D. magna* örneklerinin yurtdışından temini için gereken yazışmalar konusunda yardımlarından ötürü Adıyaman Üniversitesi Rektörlük personeline ve başta Uzman Biyolog Sevgi BAŞALAN ve Uzman Biyolog Dilek KOÇ olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR	XI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler	188
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	19
3.1. Yöntem.....	20
3.2.1. Toksikite Denemeleri	20
3.2.1.1. Toksikite Denemeleri İçin <i>D. magna</i> Anaçlarının Bakımı.....	20
3.2.1.2. Subakut Toksikite Denemeleri	21
3.2.1.3. Kronik Toksikite Denemeleri	23
3.2.2. Biyokimyasal Analizler.....	24
3.2.2.1. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi	24
3.2.2.2. Glutasyon <i>S</i> -Transferaz Yöntemi	26
3.2.2.3. Total Kolinesteraz Yöntemi	27
3.2.2.4. TBARS Yöntemi.....	28
3.2.2.5. Protein Yöntemi	28
3.2.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi.....	29
3.2.2.7. Sitokrom <i>c</i> ve AMPK Protein Derişimlerinin Belirlenmesi	30
3.2.3. İstatistiksel Analizler.....	31
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	32
4.1. BULGULAR	32

4.1.1. Tribenuron Metil Herbisidi ve Amonyagın Subakut Etkisinde	
<i>D. magna</i> 'da Ölçülen Değişimler	32
4.1.1.1. Biyokimyasal Değişimler	32
4.1.1.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom <i>c</i> ve	
AMPK Protein Derişimlerindeki Değişimler.....	33
4.2 Tartışma.....	38
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	49
KİŞİSEL BİLGİLER.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Glutasyon peroksidaz yöntemi	25
Çizelge 3.2	Glutasyon <i>S</i> -transferaz yöntemi	26
Çizelge 3.3	Total kolinesteraz yöntemi	27
Çizelge 4.1	Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki <i>D. magna</i> 'da GPx, GST ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değişimle	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da sitokrom *c* protein derişiminin kontrole göre yüzde değişimi 36
- Şekil 4.2 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da AMPK protein derişiminin kontrole göre yüzde değişimi37

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1	Tribenuron metilin yapısı.....	2
Resim 1.2	Juvenil <i>D. magna</i> (4X)	5
Resim 1.3	Lipid peroksidasyonu zincir tepkimesinin başlama, ilerleme ve sonlanma basamaklar	9
Resim 4.1	Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının kronik etkisindeki <i>D. magna</i> 'da mitokondriyal membran potansiyeli değişimi analizine ait görüntüler	35
Resim 4.2	Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki <i>D. magna</i> 'da sitokrom <i>c</i> protein derişimi analizine ait jel görüntüleri	36
Resim 4.3	Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki <i>D. magna</i> 'da AMPK protein derişimi analizine ait jel görüntüleri	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

cm	: Santimetre
dak	: Dakika
L	: Litre
M	: Molar
ha	: Hektar
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
μmol ya da μM	: Mikromolar
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
μS	: Mikrosiemens
nmol	: Nanomolar
nm	: Nanometre
s	: Saniye
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
g	: Deniz seviyesinde Dünya'nın hareketi ile oluşan temel ivme
U	: Ünite
ϵ	: Ekstinksiyon katsayısı
v/v	: Hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim
%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük

Kısaltmalar

AChE	: Asetilkolinesteraz
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
AHAS	: Asetolaktat Sentetaz
AMPK	: Adenozin 5'-monofosfat kinaz
ASTM	: American Society for Testing and Materials
BChE	: Butirilkolinesteraz
CAT	: Katalaz
CaCO ₃	: Kalsiyum Karbonat
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
ChE	: Kolinesteraz
Cu	: Bakır
EC ₅₀	: Efektif Derişim %50
FBE	: Fen Bilimleri Enstitüsü
GSH	: Redükte Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HgCl ₂	: Cıva Klorür
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
LC ₅₀	: Letal Derişim %50
LOEC	: Etki Gözlenebilen En Düşük Derişim
MMP	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
MPTP	: Mitokondriyal Membran Permeabilite Değişim Poru
NMDA	: <i>N</i> -Metil <i>D</i> -Aspartat
Ni	: Nikel

PBS-T : Tris İçeren Fosfat İle Tamponlanmış Serum Fizyolojik özeltisi

PVDF : Poliviniliden Diflorür

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SOD : Süperoksit dismutaz

TBA : Tiyobarbiturik Asit

TBARS : Tiyobarbiturik Asit Reaktif Maddeleri

TiO₂ : Titanyum Dioksit

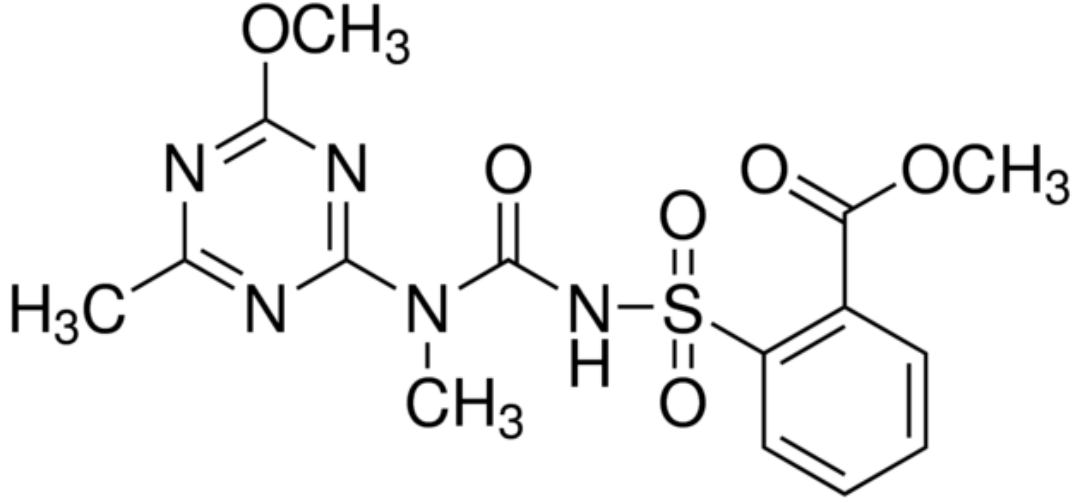
vd : ve diğeri

4X : 4 katı büyütme ya da 4 katı derişiminde

1. GİRİŞ

Su kirliliği, antropojenik kaynaklı etkenlerin katılmasıyla suyun insan gereksinimlerini ya da sucul biyotayı destekleyemeyecek derecede doğal karakteristiğinin değişmesidir. Bir diğer ifadeyle göller, nehirler, okyanuslar ve yer altı suları gibi su kütlelerinin insan aktivitesi ile doğal yapısının bozulmasıdır. Kirlilik, su kütlelerinde yaşamını sürdüren hayvansal ve bitkisel tüm organizmalarda organizmal ve populasyon düzeyinde hasar yaptığı gibi kommünite düzeyinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır [1]. Günümüzde oldukça fazla miktarda endüstriyel, evsel ya da tarımsal amaçlara hizmet eden sentetik kimyasal üretilmektedir. Bunlar çeşitli süreçler sonunda doğrudan ya da dolaylı olarak sucul ortamlara karışmaktadır [2]. Bu sentetik organik bileşikler arasında yer alan pestisitler istenmeyen bitki ve hayvan zararlılarının etkilerinden korunmak üzere kullanılan fiziksel, kimyasal ya da biyolojik ajanlardır. İnsan üretimi olmaları nedeniyle çevre ve insan için etkileri kolaylıkla tahmin edilememektedir [3].

Adıyaman İli'nde tütün ekimine getirilen yasaklardan dolayı tarım arazileri büyük oranda tahıl üretimine yönlendirilmiş ve 2011-2012 sezonunda toplam 153277 ha alana buğday, arpa ve mısırı kapsayan tahıl ekimi yapılmıştır [4]. Bu alanlarda üretim miktarını artırmak üzere hem azotlu gübreler hem de çeşitli zararlılarla mücadele için farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Bunlardan tribenuron metil (IUPAC adı: methyl 2-[[[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-methylcarbamoyl] sulfamoyl] benzoate, CAS No: 101200-48-0) ilk kez 1989 yılında ruhsatlandırılmış sülfonilüre grubu sistemik etkili bir herbisittir (Resim 1.1). Tahılda (arpa, yem mısırı, yulaf, pirinç, süpürge darısı ve buğday), yağlık tohumlu bitkilerde (kanola, keten ve ayçiçeği), soya fasulyesi ve pamukta geniş yapraklı yabancı ot mücadelesi için kullanılmaktadır. Etki mekanizması valin, lösin ve izolösin gibi aminoasitlerin sentezinde ilk basamağı katalizleyen asetolaktat sentetaz (AHAS; EC 4.1.3.18) enziminin inhibisyonudur [5].



Resim 1.1 Tribenuron metilin yapısı [6]

Molekül Ağırlığı: 395.39 g/mol

Renk: Kırık beyaz – açık kahverengi

Erime Noktası: 141°C

Çözünürlük: Suda 50 mg/L; organik solventlerde çözünürlüğü düşük

log K_{ow}: 0.78 (pH: 7.0 ve sıcaklık 25°C’de)

Buhar Basıncı: 3.9x10⁻¹⁰ mmHg (sıcaklık 25°C’de) [7]

Ülkemizde 2013 yılında 34575 kg tek başına formülasyonu ve 3293 kg diğer herbisitlerle (metsulfuron metil ya da thifensulfuron metil) karışım formülasyonu şeklinde satışı yapılmıştır [8]. Zararlılarla entegre mücadele programı kapsamında buğdayda yabancı otlarla mücadelede 1 ha alan için 200-400 L suya 2-4 g %7’lik tribenuron metil uygulanması tavsiye edilmektedir [9]. Bununla birlikte ülkemizde Ultrastar, Granstar, Glintstar ve Gromstor markalı ticari ürün etiketlerinde 10 g/ha uygulanması tavsiye edilmektedir. Avrupa Birliği verilerine göre maksimum uygulama miktarı ilkbaharda 30 g aktif madde/ha, sonbaharda 15 g aktif madde/ha’dır [10].

Uygulandığı topraktaki yarı ömrü (DT₅₀) 5-20 gün arasında değişmekle birlikte pH’ı 6.5’in üzerinde olan topraklarda DT₅₀ = 10-20 gündür. Toprak adsorpsiyonu asidik topraklarda artmaktadır. Sudaki yarı ömrü yine pH’a bağlı

olmakla birlikte pH 5’de 1 günden az, pH 7’de 3-6 gündür, pH 9’da ise stabildir [10]. Adıyaman’da buğday ekimi yapılanlar da dahil tarımsal amaçlı kullanılan toprakların pH’ı 7.5 ila 8 aralığında değişmektedir [11]. Tribenuron metili de kapsayan sülfonilüre herbisitler uçucu değildir, toprakta ve suda en önemli yıkılma yolu mikrobiyal etki ya da hidrolizdir. Özellikle alkali topraklarda hidrolizleri oldukça yavaştır ve bu tür topraklarda oldukça mobildirler [12]. Tribenuron metil fotolize oldukça dayanıklı bir bileşiktir [10]. Tüm bu verilerden yola çıkarak tribenuron metilin özellikle, Adıyaman’da tarım yapılan topraklar göz önüne alındığında, düşük uygulama oranlarına karşın çevresel sulara karışma olasılığının yüksek olduğu düşünülmektedir. 4.9 g/ha tribenuron metil uygulamasından 5 gün sonra sulama yapılan alandan toplanan yüzey yıkama suyunda 0.81 µg/L tribenuron metil bulunduğu belirlenmiştir [13]. Bu değer toksisite denemelerimizde uyguladığımız derişim olarak seçilmiştir. Yoğun kullanıldığı İsvaç’te 2002 yılında 536 yüzey su örneğinde ölçülen maksimum tribenuron metil derişiminin 0.12 µg/L olduğu bildirilmiştir [14].

Sucul ortamların besin durumu genelde bu ortamlara giren pestisitlerin etkilerinin değerlendirilmesinde dikkate alınmamaktadır [15]. Fakat sucul organizmalar tribenuron metili de kapsayan sentetik organik kirleticilerin yanında sucul ortamlara taşınan abiyotik etmenlerin etkisinde de kalmaktadırlar [16].

Amonyak keskin kokulu, koroziv bir gazdır. Suda yüksek derecede çözünür (482 g/L) ve zayıf bir bazdır. Doğada azot fiksasyonu ya da hayvanların azotlu organik atıkları gibi doğal süreçlerin yanında belediye atık suları ve tarımsal arazilerin yıkanması yoluyla da sucul ortamlara ulaşmaktadır. Ticari olarak üretilen amonyağın yaklaşık %80’i gübre olarak kullanılır. Korozyon inhibitörü olarak, su arıtımında, ev temizlik maddesi olarak, besin ürünlerinde antimikrobiyal ajan olarak, soğutucu olarak, kauçuk endüstrisinde stabilizör olarak, katı ve sıvı yağların hidrojenasyonu sırasında hidrojen kaynağı olarak kullanılırken, farmasötik, patlayıcı ve diğer kimyasalların üretimi sırasında ara ürün olarak da oluşur. Biyota tarafından salınan organik azot, amonyağa dönüştürülebilir. İnsan ve diğer memelilerde nükleik asit ve protein sentezinin önemli bir metabolitidir ve asit-baz dengesinin sürdürülmesinde önemlidir, azot homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir [17].

Amonyak suda iki farklı formda bulunur; iyonlaşmamış amonyak (NH_3) ve iyonlaşmış amonyum (NH_4^+) şeklindedir. Amonyak toksisitesi amonyum iyonlarına göre çok daha fazladır; bu nedenle suyun pH'ının artması ile iyonlaşmamış amonyak derişiminin artışı toksisitenin de artmasına yol açar [18].

Buğdayda ekim öncesi taban gübrelmesi olarak diamonyum fosfat, amonyum nitrat ya da amonyum sülfat kullanılmakta, yağış durumuna göre gübrelmeden 2-3 ay sonra geniş yapraklı yabancı ot için herbisit uygulaması yapılmaktadır. Herbisit uygulamasından 2 hafta sonra yeniden kalsiyum amonyum nitrat, üre ya da amonyum nitrat üst gübrelmesi yapılmaktadır [19]. Bunun yanında çözünür olmayan amonyak da doğrudan toprağa uygulanabilmektedir ve bu uygulamaların tamamı sucul ortamlardaki noktasal olmayan amonyak kaynaklarıdır [20]. Bu bilgiler ışığında aynı sucul ortamda herbisit ve amonyak gibi toksik etkenlerin bir arada bulunabileceği öne sürülebilir.

Çalışmamızda kullandığımız *Daphnia magna* Straus, 1820, (Daphniidae, Anomopoda, Cladocera, Phyllopora, Crustacea) OECD tarafından sucul çevresel toksisite testlerinde standart model organizma olarak kabul edilen türlerden bir tanesidir [21]. İçme suyu kalitesinin belirlenmesinde kullanılan ilk canlılardır ve daha sonraları akuatik toksikoloji çalışmalarında çeşitli çevresel koşulların indikatörü olarak yaygın kullanılan organizmalardan biri haline gelmiştir [22]. Arktik ve ılıman göller, yüksek rakımlı göller, kısa ömürlü (ephemeral) göller, kumul tepeler arasında kalan göller gibi birçok tatlı su habitatının pelajik bölgelerinde yaşayan sucul bir türdür. Tatlı su sistemlerinde üreticiler ile üst trofik düzeyler arasında anahtar bağlantı noktalarından birini oluşturur [21]. Poliembriyonik bir tür olarak başlıca partenogenez ile çoğalır ve serbest yaşayan formlar herhangi bir larval dönemden geçmez. Koşulların uygun olduğu zamanlarda diploid dişiler, diploid yumurtalar üretir ve bu yumurtalar, yumurta kesesi denen bir yapı içerisinde dişi vücudunda taşınır. Çevresel koşulların uygun olmadığı zamanlarda partenogenetik üreme yerini gamogenetik (biseksüel) versiyona bırakır. Dişinin yumurta kesesi içerisinde erkek yumurtalar da yer alır. Biseksüel üreme sonucu “ephippia” adı verilen güçlendirilmiş kabuk ile çevrili bir yumurta oluşturulur. Anaçtaki yağ dokusundan üretildikleri için anaçta yağ biriktirmeyi değiştiren koşullar yumurta üretim sayısını da etkilemektedir.

Bir *D. magna* anacı bir seferde 15'e kadar yavru verebilir ve bu durum herhangi bir toksikantın varlığı ya da diğer çevresel koşullardan etkilenmektedir. Anacın vücut büyüklüğü ile yumurta üretme sayısı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Juvenil bireyler birkaç kez kabuk değiştirirler ve her kabuk değişimi vücut büyüklüğünde artışa yol açar [22].

Daphnia türleri kısa sürede tek bir anneden fazlaca yavru elde edilebildiği için toksikoloji çalışmalarında gözde organizmalardan biri haline gelmiştir [23] (Resim 1.2).



Resim 1.2 Juvenil *D. magna* (4X)

Akuatik toksikoloji alanındaki çalışmalarda sucul çevreye karışan çok farklı kirleticilerin biyotaya etkisini değerlendirmede “erken uyarı” parametreleri kullanılmaktadır. Bu tip erken uyarı parametrelerine “biyomarkır” adı verilmektedir. Çok farklı tanımları bulunmakla birlikte biyomarkır, organizmaların hücrelerinde, vücut sıvılarında, doku ya da organlarında ksenobiyotiklerin farklı dozlarının etkisine yanıt veren hücresel, biyokimyasal, moleküler ya da fizyolojik parametrelerdir. Kirleticinin ortamdaki varlığını ve miktarını ölçen analitik tekniklerle birlikte yapılan biyomarkır analizleri birçok çevresel kirlilik izleme programında önem kazanmıştır [24]–[26]. Biyomarkır analizleri genelde spesifik bir kimyasalın etkisini işaret

etmemekle birlikte, bilinen ya da bilinmeyen bir kirleticinin varlığını gösterebilmektedir [27].

Daphnia türlerinde en çok araştırılan biyokimyasal parametrelerden bir tanesi kolinesterazlardır (ChE). İki tip kolinesteraz tanımlanmıştır. İlki asetilkoline yüksek afinite gösteren asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve diğeri butirilkoline afinite gösteren ve non-spesifik esteraz ya da psödokolinesteraz olarak da bilinen butirilkolinesterazdır (BChE; EC 3.1.1.8). AChE sinaptik alanda asetilkolini asetat ve koline hidrolize ederek nöronal uyarımın sürekli hale gelmesini engeller. Böylece yaşamsal önemdeki duyuşsal ve nöromuskuler işlevler normal olarak yerine getirilir [26]. BChE süksinilkolin, prokain ve kokain gibi birçok eksojen substratın detoksifikasyonunu sağlar. Substrat spesifite aralığı AChE'ye göre daha geniştir. Fakat, tam fizyolojik işlevi hala anlaşılammıştır [28].

Canlıları çevreleyen ortam genellikle oksidatif koşullarla karakterize edilirken intraselüler redoks durumu indirgeyici ajanların varlıkları ile sürdürölmektedir. Böyle bir redoks homeostazı vital hücreşel işlevler için önemlidir ve bu homeostazın kaybolması durumunda, reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artış ile ilişkilendirilen lipidler, DNA ve proteinlerde oksidatif hasar meydana getirmektedir. Hücreşel redoks durumunun sürdürölmesi DNA sentezi, gen ifadenmesi, enzim aktiviteleri, vd. gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır. Bunun yanında, intraselüler içeriğın ve moleküllerin her birinin redoks durumundaki değışmeler stres olarak adlandırılan hücredeki farklı süreçlerin düzenlenmesinde yer alan intrinsik hücreşel aktivitelerde değışime neden olmaktadır [29]. ROS, ayrıca fizyolojik değışimlerinde Ca^{2+} ile birlikte önemli sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır [30].

Aerobik solunumla doğıal olarak oluşın ROS miktarına, ilaçlar, kimyasallar ve ağır metaller katkıda bulunmaktadır. Bu radikaller, hücrenin adaptasyon mekanizması kapsamında katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) ve süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) gibi enzimleri içeren antioksidant savunma ile uzaklaştırılmaktadır [31].

Glutatyon peroksidazlar, tüm organizmalarda yer alan önemli bir oksidoredüktaz enzim ailesini oluşturmaktadır. Aktif merkezlerinde sistein ya da selenosistein içerirler. Sistein içeren versiyonları prokaryotlar, mayalar ve karasal

bitkilerde yer alırken selenosistein içerenler özellikle memelilerde yer alır. En önemli substratları hidrojen peroksittir (H_2O_2); fakat, organik hidroperoksitleri de substrat olarak kullanırlar. İki tiyol grubunun oksidasyonu (tiyol grupları, en önemli intraselüler antioksidant molekül olan redükte glutatyon, GSH'dan sağlanır) sonucu iki elektronlu indirgeme ile substratlarının reaktifliklerini azaltırlar. Bu şekilde kuvvetli pro-oksidant karaktere sahip diğer ROS'ların oluşumunu engellerler. Örneğin, GPx katalizli tepkime ile H_2O_2 suya dönüştürülür. Açığa çıkan bir diğer ürün okside glutatyon (GSSG)'dur [32].

Glutatyon *S*-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen faz II biyotransformasyon enzimidir ve birçok izozim barındıran çoklu gen ailesinin ürünüdür. Substrat çeşitliliği çok geniştir ve bu durum hidrofobik substratın bağlanma bölgesinin non-spesifik doğası ile ilişkilidir. Çok farklı izoformlarının varlığı da bu substrat çeşitliliğine katkı sağlar. GST karsinojenleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve çok farklı diğer ksenobiyotikleri metabolize edebilir. Sitozolik enzimler olmakla birlikte mikrozomal ve mitokondriyal formları da bulunmaktadır. Hidroksialkenaller ve baz propenaller gibi lipid peroksidasyonu ürünlerini ve DNA hidroperoksitleri detoksifiye etmelerinden dolayı oksidatif strese karşı savunmada görev yapar. Bunların yanında elektrofilik ksenobiyotikleri ve epoksitler ve kinonlar gibi reaktif ara bileşikleri de detoksifiye eder. GST'nin en azından alfa ve teta olmak üzere iki sınıfı GPx aktivitesi gösterir. GST pi formu ise duyarlı bir tiyol (-SH) grubu aracılığıyla ROS ile doğrudan tepkimeye girip inaktif hale gelebilir. GSH ile tepkimesi enzimin yeniden aktif olmasını sağlar. Her üç GST formu da 1-kloro 2,4-dinitrobenzenin (CDNB) GSH ile konjugasyonunu sağlar ve kümen hidroperoksitine ($CuOOH$) karşı GPx aktivitesine sahiptir [30, 32, 33].

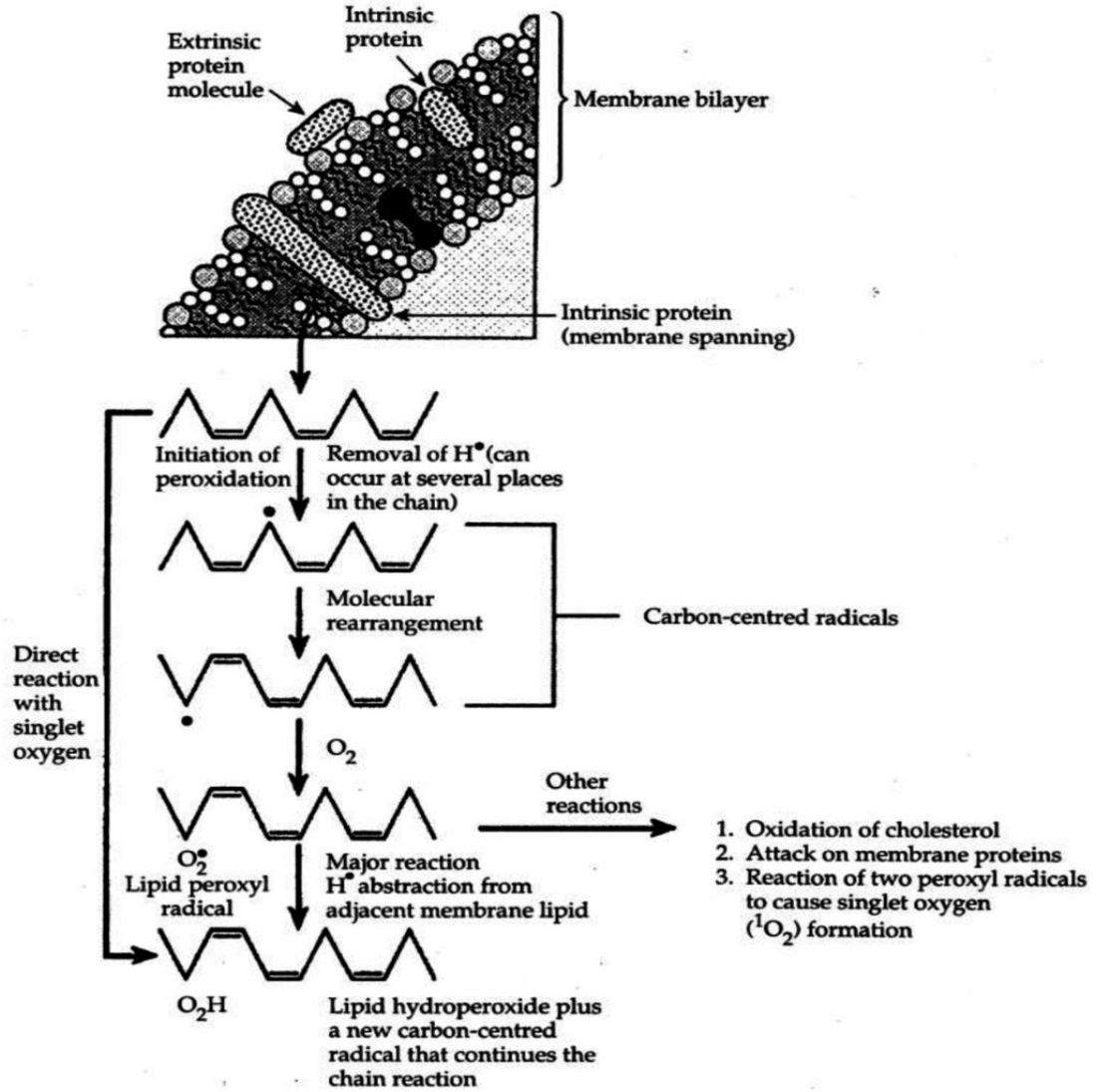
Oluşumu sağlayan prooksidant süreçler ile bu radikallerin temizlenmesini sağlayan antioksidant savunma arasında bir dengesizlikle açığa çıkan oksidatif stres sırasında ROS, proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidatif modifikasyonlarına neden olmaktadır [35]. ROS, membranda yer alan lipidlerden elektron çalarak karbon merkezli radikallerin oluşumunu başlatır. Oluşan karbon radikali molekül içi yeniden düzenleme ile konjuge dienleri oluşturur. Fakat, aerobik

koşullarda karbon radikali O_2 ile karşılaşırsa bununla birleşerek bir peroksil radikali açığa çıkartır. Peroksil radikali komşu yağ asidinden hidrojen çalarak kendisi lipid hidroperoksidine dönerken bu tepkime zincir halini alarak çok fazla sayıda peroksit molekülünün oluşturulması ile sonlanabilir. Lipid peroksitleri biyolojik olarak aktiftirler. Düşük derişimlerinde H_2O_2 gibi hücre proliferasyonunu uyarırken, yüksek derişimlerinde proliferasyonu bloke eder ve hatta daha yüksek derişimlerde apoptoz ve nekroz gibi hücre ölümü olaylarının başlamasına yol açar [36]. Poliansatüre yağ asitlerince zengin olan hücre ve organel membranlarında bulunan lipidlerin oksidatif modifikasyonları ile hücrelerin bir ve iki valanslı elektronlara geçirgenliği artmakta, membran enzimleri inhibe olmakta ve hatta lizozim gibi yapıların içeriği boşaltılarak hücrenin sindirimi başlamaktadır. Bu nedenle biyolojik membranlardaki peroksidasyonun kontrol edilememesi membran yapısını ve işlevini bozarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır [35]. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde, oksidatif stresin önemli bir indikatörü olması bakımından tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin (TBARS) analizi yaygın olarak kullanılmaktadır [37]. TBARS oluşum mekanizmasının genel şeması Resim 1.3’de görülmektedir.

Hücreler, stresin şiddetine göre yanıt mekanizmalarını aktive edebildikleri gibi tolerans limitlerinin aşılması durumunda hücre ölüm mekanizmasını da başlatabilmektedirler [38]. Apoptozis olarak da adlandırılan programlanmış hücre ölümü tüm canlılarda yüksek derecede korunmuş, spesifik biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin yer aldığı belirli süreçlerin ardışık aktivasyonları ile oldukça kompleks bir mekanizmadır. Apoptozisin başlangıç aşaması hücre redoks potansiyelindeki değişim, başlatıcı kaspazların aktivasyonu, hücrenin büzülmesi, membran lipid asimetrisinin kaybı ve kromatin yoğunlaşması ile karakterize edilir. Daha ileri aşamalarda yürütücü kaspazların ve endonükleazların aktivasyonu ile apoptotik yapıların oluşumu ve hücrenin parçalara ayrılması görülmektedir. Apoptozis ya intrinsik ya da ekstrinsik süreçlerle aktive edilmektedir [39].

Mitokondriyal süreç olarak da adlandırılan intrinsik süreç, çok farklı sitotoksik uyartılar ya da çevresel stres faktörleri tarafından başlatılabilmektedir ve birtakım proteinlerin etkileri ile bu süreç düzenlenmektedir. Bunlardan anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL, Bax ve Bak denilen apoptotik proteinleri inhibe

etmektedir. Bax ve Bak dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırarak sitokrom *c*'nin sitoplazmaya salınımına ve apoptozom kompleksi oluşumunu teşvik ederek dolaylı olarak başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olmaktadır [39]. Başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonu yürütücü kaspaz-3'ün aktivasyonu ile birlikte apoptozisin ilerlemesini sağlamaktadır [40].



Resim 1.3 Lipid peroksidasyonu zincir tepkimesinin başlama, ilerleme ve sonlanma basamakları [36].

Sitokrom *c* küçük, çözünebilir bir hem proteindir ve özellikle ferrik formunda oldukça esnek bir yapıya sahiptir. Spesifik koşullara, etkileşimlere ve hücrel

lokalizasyona bağılı olarak farklı konformasyonları stabil hale gelebilir ve bu durum yapısını, redoks özelliklerini, bağlanma afinitesini ve enzim aktivitesini etkiler. Asıl işlevi oksidatif fosforilasyonda elektron alışverişini sağlamaktır ve sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin intermembran alanında yer alır. Sitokrom *c*'nin mitokondri dışına salınımı intrinsik apoptotik süreci başlatır ve sitokrom *c* nükleus içerisine geçerek nükleozom kompleksini engeller [41]. Sitokrom *c*'nin mitokondri dışına salınımı mitokondriyal membran permeabilite değişim porunun (MPTP) oluşumu ile ilgilidir. Bu por memelilerde Ca^{2+} düzeylerine duyarlı bir şekilde meydana gelir. Memelilerden farklı olarak Crustacea'lerde Ca^{2+} ile düzenlenen işlevsel bir MPTP yapısına rastlanılmamıştır. Bu durum, apoptozdan kaçınmak için yararlı bir mekanizma olarak görülmektedir. Buna karşın, bu canlılarda apoptozun düzenlenme mekanizması yeterince aydınlatılmadığından moleküllerin apoptozdaki rolü hakkında net bir fikir öne sürmek mümkün olmamaktadır [42].

Canlılar çevrelerindeki bozucu etkilerden korunup homeostazlarını devam ettirmek ve nesillerini sürdürmek üzere enerji deposu şeklinde bir çeşit pil görevi gören yüksek ATP:ADP oranını sağlamak zorundadırlar. Katabolik tepkimeler ADP ve inorganik fosfatı birleştirerek pilin doldurulmasını sağlarken, neredeyse tüm diğer hücrel süreçler ATP'yi ADP ve inorganik fosfata ve bazen de AMP ve pirofosfata dönüştürerek pili boşaltırlar [43]. Pilin doldurulup boşaltılması arasında denge sağlanamaz ve enerji tamamen tüketilirse hücre ölü hale geçer. Tüm ökaryotik hücreler adenosin 5'-monofosfat ile aktive olan kinaz (AMPK) adı verilen bir protein aracılığı ile pilin durumu hakkında bilgi sahibi olur ve bu protein aracılığı ile ATP/ADP ve ATP/AMP dengesini koruyucu tedbirler alır. Memelilerde AMPK hücrel AMP:ATP oranına duyarlılık gösterir ve ATP üretimini inhibe eden (örneğin hipoksiya, glikoz azalması, metabolik inhibitörlerin varlığı) ya da ATP tüketimini uyarı (örneğin motor proteinlerin, iyon pompalarının ya da kanalların, biyosentez tepkimelerinin aktivasyonu gibi) metabolik stres durumunda aktif hale geçer. Aktivasyonu için AMP'nin bağlanması ve bu bağlanma sonrası enzimin AMPK kinaz adı verilen enzim tarafından fosforilasyonu gerekir. Bu iki etki enzim aktivitesinin >1000 kat artışına neden olur. En önemli sensör AMP:ATP oranıdır. Enzim ADP:ATP oranına daha az duyarlıdır ve yüksek ATP düzeyleri aktivitenin

düşmesini sağlar. Sitokinler, çeşitli ilaçlar, bitkilerde yer alan farklı bileşikler tarafından da aktif hale gelebilir. Metabolik stres, sitokinler ya da ilaçların etkisi gibi koşullarda aktifleştikten sonra glikoz ve yağ asitlerinin alınımı ve metabolizması gibi katabolik yolları aktifleştirerek ATP üretiminde artışa yol açarken, yağ asitlerinin, glikojen ve proteinlerin sentezi gibi ATP tüketen anabolik süreçlerin durmasına neden olur. Metabolik enzimlerin hızlı fosforilasyonu ve gen ifadenmesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin ve koaktivatörlerin fosforilasyonu ile etkisini gösterir [44].

Mayıs 2014’de etrafında tahıl ekimi yapılan Eğriçay Deresi’nin Kırkgöz Pınarı mevkiinde tribenuron metil içerikli tarım ilacı şişelerine rastlanmıştır [45]. Sucul biyotaya ekolojik etkiler kolaylıkla sudaki pestisit derişimleri ile ilişkilendirilememektedir; çünkü sudaki abiyotik faktörlerin pestisitlerle etkileşimleri mekanizmayı daha karmaşık hale getirmektedir [46]. Besin zenginleşmesinin bentik predatör böcek türlerinde chlorpyrifos, dimethoate ve imidaclopridden oluşan pestisit karışımının toksik etkisini artırdığı belirlenmiştir [15]. Bu çalışmanın amacı, kontrollü laboratuvar koşullarında herbisit tribenuron metilin hedef olmayan sucul canlılara toksisitesine bir abiyotik faktör olarak amonyanın etkilerinin değerlendirilmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çalışmamızda toksik etkilerini araştırdığımız tribenuron metil herbisidinin hayvanlardaki toksik etkileri konusunda bilgiler oldukça sınırlıdır.

Tribenuron metilin farklı derişimlerinin 72 saat etkisindeki toprak solucanı *Eisenia foetida*'da ölüm ile gözlenen toksisite açığa çıkmadığı belirlenmiştir [47].

Tribenuron metil, toprak solucanı *E. foetida*'da CAT ve SOD gibi antioksidant enzim aktivitelerini 28 günlük etki süresinin yalnızca 3. gününde ve LC₅₀'nin 0.05 ve 0.1 katına denk gelen derişimlerde artırırken hiçbir etki süresi ve derişiminde lipid peroksidasyonu düzeylerini etkilememiştir [48].

40, 80 ve 120 mg/L tribenuron metil etkisindeki balık *Danio rerio*'da özellikle hiperplazi ve vakuolizasyon ile karakterize şekilde solungaçta histopatolojik değişimler meydana gelmiştir [49].

40, 80 ve 120 mg/L tribenuron metil etkisindeki balık *D. rerio*'da yumurtalık dokusunda primer oosit sayısında azalma, follikül epitelinde bütünlük kaybı, dejenere ve atretik oosit sayısında artış ile karakterize histopatolojik etkiler gözlenmiştir [50].

Çin hamsteri yumurtalık hücre hattı (CHO) ve insan göğüs kanseri hücre hattında tribenuron metilin sitotoksik derişimleri >100 µM olarak belirlenmiştir [51]. Aynı çalışmada MCF-7 hücre proliferasyonu ile belirlenen en düşük etki derişimi (LOEC) 25 µM iken, maksimum etki belirlenen derişim 50 µM'dır. Bu ölçümlere göre, tribenuron metilin düşük de olsa östrojenik aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir [51].

Tribenuron metil androjen reseptörü ile antagonistik etkileşim göstermemektedir ve Wistar sıçanlarda prostat bağlanan protein gen ifadenmesini etkilememektedir [52]. Bu sonuçlara göre tribenuron metil sıçanlarda endokrin bozucu aktivite göstermemektedir.

Hayvanlar dışında diğer canlı türlerinde de tribenuron metil toksisitesi çalışılmıştır.

Maya *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde tribenuron metil ve metsulfuron metil herbisit karışımından oluşan ticari formülasyonun 100 mg/L etkisinde total

hidroperoksit, lipid peroksidasyonu düzeyleri ile GSH miktarı ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi artarken GPx aktivitesinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir [53]. Bu sonuçlara göre yüksek derişimlerinde tribenuron metil pro-oksidadif potansiyele sahiptir.

Çalışmamızda *D. magna* üzerine toksisite potansiyelini araştırdığımız amonyağın Crustacea'yi de kapsayan farklı canlılara etkisi araştırmalara konu olmuştur.

Tatlı su karidesi *Macrobrachium amazonicum*'da solungaç dokusunda 2 mM/L total amonyak azotu etkisi ile GST aktivitesi değişmezken SOD, GR ve Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitelerinde artış meydana gelmiştir [54].

Bir balık türü olan *Boleophthalmus boddarti*'de 8 mmol NH₄Cl'nin 12 ve 48 saatlik etkisinde beyin dokusunda selenyum-bağımlı GPx ve total GPx aktivitesi kontrole oranla değişmezken, total GPx aktivitesi uygulamanın 48. saatinde 12 saatlik uygulamaya oranla artış göstermiştir. 48 saatlik uygulamada GST aktivitesi değişmezken, lipid peroksidasyonu düzeyleri azalmıştır [55]. Aynı çalışmada, solungaçlarda 48 saat sonunda lipid peroksidasyonu düzeyleri ve selenyum bağımlı GPx ve GST aktiviteleri değişmezken, 24 saatlik uygulamada total GPx aktivitesinin azalmasına bağlı olarak lipid hidroperoksit düzeyleri artmıştır.

63 mg/L amonyak etkisi altındaki karides *Fenneropenaeus merguensis*'de solungaç dokusunda Cu-Zn SOD ve GST transkriptlerinde azalma meydana gelmiştir [56]. Yazarlar yüksek düzeylerde ROS üretimine bağlı inhibisyonun oksidadif hasara yol açabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yüksek derişim amonyak etkisinde hücre iskeleti ve immun yanıtı ilişkin gen transkript sayısında da değişim olduğu ve bu süreçlerin amonyak toksisitesine direnç ile ilişkili olabileceği önerilmiştir.

5, 10, 20, 40 ve 80 mg/L amonyak etkisinde tatlı su karidesi *M. amazonicum*'da solungaç dokusunda lamellar epitel kalınlaşması, hemositik infiltrasyon, hiperplazi ve nekroz şeklinde gözlenen toksik etki meydana geldiği belirlenmiştir [57].

Bir karides türü olan *Exopalaemon carinicauda*'da hemolenf ve hepatopankreas dokusunda 34.87 mg/L amonyak etkisi ile sitozolik ve mitokondriyal MnSOD transkript sayısının arttığı belirlenmiştir [58].

D. magna'da 0.3, 0.5 ve 1.0 mg/L amonyak etkisi ile süperoksit radikallerinin süpürülmesinden sorumlu Cu-Zn SOD transkript düzeylerinin derişime bağı artış gösterdiği belirlenmiştir. Artan transkript düzeylerine karşın, enzim aktivitesi yalnızca 0.3 mg/L amonyak etkisindeki örneklerde artmıştır [59].

Amonyanın memelilerde özellikle beyin dokusu üzerine toksik etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Amonyak *N*-metil-*D*-aspartat (NMDA) reseptörleri ile etkileşerek toksik etkilerini açığa çıkarmaktadır. Amonyak etkisiyle erkek Wistar ırkı sıçanların beyin dokusunda ATP düzeylerinin azaldığı, ADP, AMP ve Pi düzeylerinin ve Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [60]. NMDA reseptör antagonisti uygulaması bu etkilerin sonlanmasına neden olmaktadır.

Erkek Wistar sıçanların non-sinaptik beyin mitokondrilerinde 12 mmol/kg amonyum asetat etkisi ile süperoksit radikali derişiminin artışına karşın H₂O₂ derişimlerinde azalma meydana gelmiştir [61]. H₂O₂ derişimindeki azalmaya bağı olarak GPx ve CAT enzim aktiviteleri değışmemiştir. H₂O₂ derişimindeki azalmanın mitokondriyal SOD olan MnSOD aktivitesinin azalması nedeniyle olduğu ve NMDA reseptör antagonisti uygulamasının amonyağın etkilerini sonlandırdığı belirlenmiştir [61].

Yarı şeffaf özelliğı nedeniyle *Daphnia spp.*, fluoresan probalar yardımıyla toksisite mekanizmasının aydınlatılmasında kullanışlı türler olarak değılendirilmektedir [62]. Tribenuron metilin mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) üzerine etkisine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Crustacea üyelerinde farklı ksenobiyotiklerin etkisinde MMP değışimine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır.

JC1 ile ölçülen MMP depolarizasyonu nedeni ile AgNO₃ nanopartiküllerinin <24 saat *D. magna* örneklerinde mitokondriyal hasara yol açtığı belirlenmiştir [63].

Streptomyces griseus toksini valinomisin ve *Bacillus cereus* toksini cereulidenin *in vivo* etkisinde *D. magna*'da sindirim kanalı hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin depolarize olduğu ve bu değışimin olasılıkla apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [62]. Benzer şekilde, *B. subtilis* ve *B. cereus* ile enfekte *D. magna* örneklerinde intestinal dokuda JC1 boyası ile belirlenen MMP depolarizasyonu belirlenmiştir [64].

Uzun süreli açlık koşullarında tatlı su karidesi *Neocaridina davidi*'de barsak dokusunda JC1 boyası ile belirlenen MMP depolarizasyonu oranında artış meydana gelmiştir [65]. Yeniden beslenme membran potansiyelinde ve mitokondriyal yapıda normalleşme sağlamıştır.

Yengeç *Neohelice granulata*'da anteryor solungaç dokusunda düşük tuzluluk ve bakır (Cu) etkisinde heksokinaz, piruvat kinaz, fosfofruktokinaz ve sitrat sentaz enzim aktiviteleri ile MMP'nin azaldığı, laktat dehidrojenaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [66].

N. heteropoda'da barsak epitel ve hepatopankreas hücrelerinde hücre ölüm tipleri histolojik ve fluoresan boyama yöntemleri ile araştırılmıştır [67]. MMP depolarizasyonuna sahip hücre sayısının azlığı, artan otofaji tepkimelerine bağlanmıştır.

Mitokondriyal membran potansiyeli değişimi üzerine amonyağın etkisi memeliler başta olmak üzere genellikle omurgalılarda araştırılmıştır.

5 mM NH₄Cl etkisindeki astrosit hücre kültüründe JC1 boyası ile belirlenen MMP depolarizasyonunda ve ROS üretiminde artış belirlenmiş ve bunun artan intraselüler Ca²⁺ düzeyleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [68].

Yine 5 mM NH₄Cl etkisinde sıçan primer astrosit hücre kültüründe JC1 boyası ile belirlenen MMP depolarizasyonuna karşın, sıçan fetüsünün serebral korteksinden elde edilen nöronal hücre kültüründe herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir [69].

Çalışmamızda tribenuron metil, amonyak ve bunların karışımlarının *D. magna*'da sitokrom *c* ve AMPK protein miktarına etkileri araştırılmıştır. Tribenuron metilin sitokrom *c* protein düzeyleri üzerine etkisi ile ilgili araştırmaya rastlanılamamıştır. Amonyak etkisinde de sitokrom *c* protein miktarı üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

Deniz yengeci *Cancer irroratus*'da kalp dokusunda sıcaklık etkisi ile AMPK aktivitesindeki artışın, ışık şok proteini 70 (Hsp70)'nin miktar ve transkript düzeylerinin artmasından ve anaerobik solunuma geçmeden önce meydana geldiği belirlenmiştir [70].

21 gün boyunca antimikrobiyal madde triclosanın üç farklı derişiminin etkisindeki tatlı su midyesi *Elliptio complanata*'da hepatopankreas dokusunda yalnızca en yüksek derişimde toplam AMPK miktarının ve fosforile AMPK miktarı ile ölçülen AMPK aktivitesinin arttığı saptanmıştır [71].

Belediye atıklarının karıştığı istasyonlara yerleştirilen *E. complanata*'da hepatopankreas dokusunda 21 gün etki süresi sonunda toplam AMPK miktarı ve AMPK transkript düzeyleri azalsa da fosforile AMPK düzeylerinde artış meydana gelmiştir [72].

Deniz yengeci *C. irroratus*'da hepatopankreas dokusunda hipoksik koşullar altında laktat derişiminin ve AMPK aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [73]. *C. irroratus* hepatopankreas hücrelerinde artan laktat derişimleri ile belirlenen anaerobik solunuma geçiş nedeniyle AMPK sentezinin arttırıldığı bildirilmiştir.

Kolinesterazlar, çevresel toksikoloji çalışmaları için yaygın kullanılan biyomarkırlar arasındadır [26]. Tribenuron metil etkisinde *D. magna*'da ChE aktivitesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Fakat, farklı pestisitlerin etkisinde *D. magna*'da ChE aktivite değişimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Karbamat insektisit carbaryl etkisindeki *D. magna*'da ChE inhibisyonunun yanında lipid ve glikojen oranlarındaki azalmanın, temiz suya aktarım ile sağlanan depurasyon sürelerinde normale döndüğü belirlenmiştir [74].

Jemec vd. [75], düşük Cd derişimlerinin AChE aktivitesini artırdığını, artan derişimlerde ise düşük derişimlere oranla aktivitedeki artışın yavaşladığını bildirmişlerdir.

Li ve Tan [76], organofosfatlı insektisit triazophos ve chlorpyrifosun *D. magna*'da ChE aktivitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hem asetiltiyokoliniyodür hem de butiriltiyokoliniyodür ile aktivite olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada, iki toksikantın hormetik etkili olarak düşük dozlarında ChE aktivitesini artırdığını, yüksek dozlarında ise azalttığını bulmuşlardır.

Farklı derişimlerinde amonyum asetat etkisindeki albino farelerin farklı beyin bölgelerinde ve izole sinaptozomlarında AChE ve BChE aktivitelerinin arttığı; fakat saf enzim aktivitesinin değişmediği belirlenmiştir [77].

Amonyum asetat verilen farelerde beyin dokusunda AChE inhibisyonu meydana gelmiştir [78]. Amonyanın nörolojik etkilerinin, AChE inhibisyonu sonucu biriken asetilkolin derişimleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmamızda kullanılan *D. magna* örnekleri Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, ABD firmasından alınarak laboratuvara getirildi. *D. magna* örnekleri havalandırılmış ve dinlendirilmiş 15 L ASTM sert suyu [79] içeren plastik kaplarda tek bir atadan en az 10 jenerasyon olacak şekilde laboratuvar koşullarına adapte edildi. Kültür ortamını oluşturmak için kullanılan suyun iletkenliği 10 μS 'den düşüktür [80]. Kültür suyunun özellikleri; sıcaklık $21\pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.60-8.00, çözülmüş oksijen >7 mg/L, toplam sertlik 130-160 mg/L CaCO_3 , alkalinite 110-120 mg/L CaCO_3 'tür. Laboratuvarın ışık yoğunluğu nominal $10.53 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ olacak şekilde ayarlandı. Laboratuvarda 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı [81]. Besin olarak 150-300 μm alabalık yemi (Çamlı Yem, İzmir), hamur mayası (Dr. Oetker Instant Kuru Maya, İzmir) ve kurutulmuş alfalfa (Naturade Alfalfa, Sepe Natural, İzmir) ile hazırlanan karışım kullanıldı. *D. magna* örnekleri haftada 3 kez 1.5 mL besin/1 L su olacak şekilde bu karışım ile beslendi [82]. Stokların kültür ortamı haftada bir kez değiştirildi ve su değişiminden hemen sonra 500 adet birey içerecek şekilde stoklar hasat edildi. Model organizma olarak kullanılan *D. magna* örnekleri için döl terimi bir anaçtan farklı zamanda dünyaya gelen bireyleri, jenerasyon terimi ise bir anaçtan doğan ve kendileri de anaç olarak hizmet eden bireyleri tanımlamak amacıyla kullanıldı.

Bu çalışmada toksikant olarak tribenuron metil (IUPAC adı: methyl 2-[[[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-methylcarbamoyl] sulfamoyl] benzoate; CAS No: 101200-48-0) herbisidinin ticari formu olan Granstar (DuPont de Nemour SAS, Cedex, Fransa) ile amonyum klorür (NH_4Cl ; IUPAC adı: ammonium chloride; CAS No: 12125-02-9, Sigma-Aldrich) uygulandı.

3.1.1. Kimyasal Maddeler

1. Kalsiyum sülfat dihidrat	CaSO ₄ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich
2. Sodyum bikarbonat	NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
3. 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)	DTNB	Sigma
4. Asetiltiyokolin iyodür	ATChI	Sigma
5. Redükte L-glutasyon	GSH	Sigma-Aldrich
6. İndirgenmiş β -nikotinamid adenin dinükleotit fosfat β -NADPH		Sigma
7. Glutasyon redüktaz	GR	Sigma
8. <i>t</i> -butil hidroperoksit	<i>t</i> -BHP	Aldrich
9. Tris baz	Tris baz	Sigma
10. Tris hidroklorür	Tris HCl	Sigma
11. di-Sodyum etilendiamin tetraasetik asit	EDTA	Sigma-Aldrich
12. 1,1',3,3'-tetramethoxypropane	TMP	Aldrich
13. Potasyum klorür	KCl	Sigma-Aldrich
14. di-Potasyum hidrojen fosfat	K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
15. Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	Sigma
16. 2-Tiyobarbitürik asit	TBA	Sigma-Aldrich
17. Trikloroasetik asit	TCA	Merck
18. Folin-Ciocalteu's fenol ayıracı		Sigma-Aldrich
19. Sodyum hidroksit	NaOH	Sigma-Aldrich
20. Sodyum lauril sülfat	SDS	Sigma
21. Bakır sülfat pentahidrat	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma
22. Etil alkol		Sigma-Aldrich
23. Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich
24. Sığır serum albumin	BSA	Sigma
25. Sodyum klorür	NaCl	Sigma-Aldrich

26. Metanol		Sigma-Aldrich
27. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide JC1		Sigma-Aldrich
28. Protein markırı		Bio-Rad
29. Lityum dodesil sülfat tamponu		
30. Sinyal artırıcı çözelti		Invitrogen
31. PVDF membran		Invitrogen
32. BCIP/NBT substrat çözeltisi		Thermo-Fisher
33. Fosfat ile tamponlanmış tuz-Tris tamponu	PBS-T	
34. 1-Kloro-2,4-dinitrobenzen	CDNB	Sigma-Aldrich
35. Tribenuron metil		DuPont
36. Amonyum klorür	NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
37. 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt HEPES-Na		Sigma-Aldrich
38. 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid HEPES		Sigma-Aldrich

3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. Analitik Terazı	A&D HR-250AZ
2. Benmari	Daihan Wise Bath
3. Buz Makinası	İzmac
4. Homojenizatör	Daihan WiseStir Wisd
5. Oksijenmetre	YSI Environmental DO100
6. Otomatik Pipet Seti	Nichiryo Nichipet EX
7. Otomatik Pipet Seti	Axygen AxyPet
8. pH Metre	YSI Environmental pH100
9. Soğutmalı Santrifüj	Hettich Universal 320R
10. Spektrofotometrik Analiz Küvetleri	ISOLAB
11. Vorteks	IKA MS1 Minishaker
12. UV-Visible Spektrofotometre	Shimadzu UV1800
13. Distile Su Cihazı	Elga Ultra Analytic

14. Distile Su Cihazı	Millipore Rios 8
15. Mikroplaka Spektrofotometre	BioTek EON
16. Mikroplaka Bottom	Greiner Polystyrene 96 Well Flat
17. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop	Carl Zeiss LSM800
18. Dikey Elektroforez Sistemi	Invitrogen Mini Gel Tank
19. Kuru Jel Transfer Cihazı	Invitrogen iBlot2
20. Orbital Çalkalayıcı	Cleaver Scientific

3.1. Yöntem

3.2.1. Toksikite Denemeleri

3.2.1.1. Toksikite denemeleri için *D. magna* anaçlarının bakımı

Kullanılan *D. magna* örnekleri arasında genetik varyasyonu minimuma indirebilmek amacıyla, tek bir anaçtan elde edilen en az 5. jenerasyon yavrular anaç olarak kullanıldı. Denemelere başlamadan önce *D. magna* örneklerinin toksisite testlerinde kullanılabilirliğini belirten 24 saatlik $K_2Cr_2O_7$ duyarlık testi yapıldı [83]. Elde edilen EC_{50} değeri (0.972 mg/L; %95 güven aralığı 0.904-1.042) OECD [80] tarafından kabul edilen aralık (0.6-2.1 mg/L) içerisinde olduğu için denemelere başlandı. İki farklı 15 L'lik ASTM sert suyu içeren plastik kaba 300'er adet <24 saatlik yavrular anaç olarak kullanılmak üzere yerleştirildi. İlk su değişimi 7. gün de yapıldı ve bu 7 gün içerisinde iki günde bir 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 10. günde su değişimi yapıldı ve su değişiminden sonra 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 8. gün <24 saatlik 1. döl yavruları ve 10. gün <24 saatlik ikinci döl yavruları toplandı ve bunlar balık yemi olarak kullanıldı [80].

<24 saat 3. döl yavruları denemelerde kullanılmak üzere her kaptaki 250 bireyi olacak şekilde 15 L ASTM sert suyu içeren kaplara ayrıldı. İlk su değişimi 7. gün yapıldı ve bu 7 gün içerisinde iki günde bir 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 10. günde su değişimi yapıldı ve su değişiminden sonra 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 8. gün <24 saatlik 1. döl yavruları ve 10. gün <24 saatlik ikinci döl yavruları

toplandı ve bunlar balık yemi olarak kullanıldı. 12 günlük canlılar subakut toksisite denemelerinde kullanıldı [84]. Deney öncesi 12 günlük canlılardan doğan <24 saat 3. döl yavrulardan her kapta 250 birey olacak şekilde 15 L ASTM sert suyu içeren kaplara diğer tekerrürde kullanılmak üzere ayrıldı. Bunlardan da benzer şekilde elde edilen yavrular kronik toksisite çalışmalarında kullanıldı. Subakut ve kronik testlerde her tekerrürde 3. döl yavruları kullanıldı.

3.2.1.2. Subakut Toksikite Denemeleri

Suda nominal 0.65 mg/L NH₃ ve 3.22 mg/L NH₃ derişimlerine ulaşabilmek üzere ASTM sert suyu içerisine konması gereken NH₄Cl miktarı US EPA [85] tarafından sağlanan tabülasyona göre hesaplandı. 3.22 mg/L NH₃ derişiminde *D. magna* örnekleri 48 saat içerisinde öldüğünden bunun yerine yarı derişimi olan 1.61 mg/L NH₃ uygulaması yapıldı. Formülasyon şu şekildedir [85]:

$$[\text{NH}_3^+] = [\text{NH}_4\text{Cl}] \cdot \frac{17}{53.5} \cdot \text{İyonizasyon katsayısı}$$

17: NH₃⁺'ün moleköl ağırlığı

53.5: NH₄Cl'nin moleköl ağırlığı

İyonizasyon katsayısı: Belirli bir sıcaklık ve belirli bir pH'da NH₃'ün NH₄'e iyonlaşma yüzdesi

Çalışmamızda deneme ortamının pH'ı 8.0 ve su sıcaklığı 20°C seçildiğinden US EPA tarafından sağlanan tabülasyona göre iyonizasyon katsayısı bu değerler esas alınarak belirlendi. Deneme ortamı, denemeler süresince pH'da meydana gelebilecek değıişimlere karşı 0.3 mM HEPES [86] ile pH 8.0'a tamponlandı. NH₄Cl asit özellikte olduğu için kültür ortamının pH'ı NaOH ile pH 8.0'a getirildi.

Toksikite denemeleri stok *D. magna* kültürü ile aynı laboratuvar koşullarında gerçekleştirildi. 12 günlük 3. döl *D. magna* örnekleri 800 mL ASTM sert suyu içeren 1000 mL'lik her cam behere 20 adet olacak şekilde rastgele dağıtıldı. Deney grupları aşağıdaki şekildedir:

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.
2. 0.81 µg/L Tribenuron metil grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.
3. 0.65 mg/L NH₃ grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 0.65 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl içeren 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.
4. 0.65 mg/L NH₃ ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışım grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 0.65 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl ve 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.
5. 1.61 mg/L NH₃ grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 1.61 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl içeren 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.
6. 1.61 mg/L NH₃ ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışım grubu: Bu gruptaki *D. magna* örnekleri, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0'a tamponlanmış 1.61 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl ve 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 800 mL ASTM sert suyu içerisinde 96 saat süre ile bekletildi.

Denemelerin başlangıcında kültür ortamının pH'ı 8.0, çözülmüş oksijen 9.07±0.16 mg/L, alkalinite 121.13±7.14 mg/L CaCO₃, sertlik 145.38±10.55 mg/L CaCO₃ ve sıcaklık 20.8±0.16°C olarak ölçüldü. Her behere 1.5 mL/L olacak şekilde besin karışımından verildi ve beherlerin üzeri şeffaf streç film ile kapatıldı. 48 saat sonunda su değişimi yapıldı. 48 saat sonunda kontrol gruplarında 48 saatlik deneme ortamının pH'ı 8.02±0.16, çözülmüş oksijen 7.28±0.64 mg/L ve sıcaklık 20.76±0.85°C olarak ölçüldü. *D. magna* örnekleri taze hazırlanmış deneme ortamına aktarıldıktan sonra ortama besin karışımından verilmedi. 96 saat sonunda örnekler filtre üzerine konularak suları süzüldü ve alttan peçete yardımıyla hafifçe dokunularak kurutma sağlandı. Her beherden toplam 20 adet *D. magna* örneği önceden tartılıp buz içerisinde bekletilen bir mikrosantrifüj tüpü içerisine zarar görmeden aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpleri yeniden tartılarak *D. magna* örneklerinin

son ağırlığı kaydedildi. Mikrosantrifüj tüplerindeki örnekler ileri analizlere kadar -80°C’de bekletildi. Her deneme grubu iki tekerrürlü yürütüldü ve her deneme grubu, her tekerrürde dört kez tekrar edildi. Toplamda her deneme grubu 8 kez tekrar edilmiş oldu.

3.2.1.3. Kronik Toksikite Denemeleri

Kronik toksisite denemeleri, stok kültür ile aynı laboratuvar koşullarında gerçekleştirildi. <24 saat *D. magna* örnekleri 50 mL 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış ASTM sert suyu içeren 100 mL’lik cam beherlere yerleştirildi. Her grubun her tekrarında bir behere bir adet <24 saat *D. magna* örneği yerleştirildi. Deney grupları aşağıdaki şekildedir:

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.
2. 0.81 µg/L Tribenuron metil grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.
3. 0.65 mg/L NH₃ grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 0.65 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl içeren 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.
4. 0.65 mg/L NH₃ ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışım grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 0.65 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl ve 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.
5. 1.61 mg/L NH₃ grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 1.61 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl içeren 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.
6. 1.61 mg/L NH₃ ve 0.81 µg/L tribenuron metil karışım grubu: Bu gruptaki *D. magna* örneği, 0.3 mM HEPES ile pH 8.0’a tamponlanmış 1.61 mg/L NH₃ olacak şekilde NH₄Cl ve 0.81 µg/L tribenuron metil içeren 50 mL ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süre ile bekletildi.

Deneme grupları hazırlandıktan sonra içerisine 0.75 mL/L besin verildi. Beherlerin üzeri şeffaf streç film ile kapatıldı. Deneme gruplarında deneme süresi boyunca 3 günde bir su değişimi yapıldı. Her su değişiminden sonra 0.75 mL/L besin verildi. Su değişiminden önce ASTM sert suyunun pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlandı, çözülmüş oksijen 9.04 ± 0.15 mg/L, sıcaklık $20.16 \pm 0.32^\circ\text{C}$, alkalinite 120.34 ± 7.65 mg/L CaCO_3 ve sertlik 138.58 ± 8.57 mg/L CaCO_3 olarak ölçüldü. Her su değişiminden sonra üç günlük kontrol grubu sularında, pH 7.97 ± 0.3 , çözülmüş oksijen 7.07 ± 0.82 mg/L ve sıcaklık $20.21 \pm 0.53^\circ\text{C}$ olarak ölçüldü. 21. gün sonunda her gruptan örnekler JC1 boyaması için mikropilaya kuyucuklarına ayrıldı ve bu örnekler analizlere kadar -80°C 'de saklandı. Her deneme grubu iki tekerrürlü yürütüldü ve her deneme grubu her tekerrürde dört kez tekrar edildi. Böylece toplamda her deneme grubu için 8 tekrar yapıldı.

3.2.2. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizlere başlamadan önce, her beherdeki 20 *D. magna* örneği havuzlandı ve ağırlığının 4 katı olacak şekilde (w/v) 100 mM KCl, 1 mM EDTA içeren pH 7.4 100 mM potasyum fosfat tamponu ile buz içerisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat $10000 \times g$ 'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve elde edilen supernatant GPx, GST, tChE enzim aktiviteleri ile TBARS ve protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı.

3.2.2.1. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

Glutatyon peroksidaz, GSH'nin H_2O_2 ve organik hidroperoksitler ile GSSG'ye yükseltgenmesini kataliz eder. *t*-butil hidroperoksit bulunan ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'nin NADP^+ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür [87].

Ayrıçlar

1. 1 M Tris Tamponu (pH 8.0)

2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. 7 mM *t*-butil hidroperoksit

Yöntem

Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçebilmek için ayıraçlar spektrofotometrik ölçüm küvetine aşağıdaki şekilde konuldu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Glutatyon peroksidaz yöntemi

Çözeltiler	Örnek (µL)
Saf su	635
Tris tamponu	100
GSH	25
GR	100
β-NADPH	100
Supernatant	25
37°C'de 10 dakika inkübe edildi.	
<i>t</i> -butil hidroperoksit	10

Kör için örnek yerine saf su kullanıldı. Oluşan tepkime sonucu absorbans değerlerindeki değişim 340 nm dalga boyunda 0. dakika ve 2. dakikalarda ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{GPx aktivitesi } (\mu\text{mol/dak/mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{\epsilon \times V_0}$$

ΔABS = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman (dak)

V_t = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

$$\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{GPx spesifik aktivitesi } (\mu\text{mol/dak/mg protein}) = \frac{\text{GPx aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

3.2.2.2. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Glutasyon S-transferaz, GSH'nin elektrofilik bileşikler ile tepkimesini katalizler. Substrat olarak kullanılan CDNB'nin GSH ile konjugasyonu tepkimesi 340 nm dalga boyunda ölçülür [88].

Ayırıcılar

1. 0.1 M Potasyum fosfat tamponu (pH 6.5)
2. 10 mM GSH
3. 60 mM CDNB

Yöntem

GST aktivitesini ölçmek için ayırıcılar kör ve örnek içeren küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Glutasyon S-transferaz yöntemi

Çözeltiler	Kör (μL)	Örnek (μL)
Potasyum fosfat tamponu	868	828
GSH	66	66
Supernatant	-	40
Saf su	40	-
Çalkalandı.		
CDNB	66	66

Oluşan tepkime sonucu absorbanans değerlerindeki değişim 340 nm dalga boyunda 0. dakika ve 5. dakikalarda ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{GST aktivitesi } (\mu\text{mol/dak/mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{Vt}{\epsilon \times V\text{ö}}$$

ΔABS = Zamana bağlı absorbanans değişimi

Vt = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

t = Zaman (dak)

ϵ = 0.0096 M⁻¹cm⁻¹

GST spesifik aktivitesi ($\mu\text{mol/dak/mg protein}$) = $\frac{GST \text{ aktivitesi}}{Protein \text{ miktarı}}$

3.2.2.3. Total Kolinesteraz Yöntemi

Kolinesterazlar, asetilkolin, butirilkolin ve propiyonilkolin gibi bileşiklerin kolin ve içeriğine göre asetat gibi bileşiklere parçalanması tepkimesini katalizler. Substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin ile tepkimesinden sonra ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile DTNB'nin tepkimesi sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 405 nm'de ölçülür [89].

Ayırıcılar

1. 10 mM Sodyum bikarbonat
2. 10 mM DTNB
3. 0.1 M Potasyum fosfat tamponu (pH 7.2)
4. 0.075 M Asetiltiyokoliniyodür

Yöntem

Toplam kolinesteraz enzim aktivitesini ölçebilmek için ayırıcılar kör ve örneklerin bulunduğu iki farklı küvete aşağıdaki şekilde konulur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.3 Total kolinesteraz yöntemi

Çözeltiler	Kör (μL)	Örnek (μL)
Tepkime Çözeltisi	125	125
Asetiltiyokoliniyodür	100	100
Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.		
Supernatant	-	100
Potasyum Tamponu	100	-

Oluşan tepkimede açığa çıkan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin absorbanı 405 nm dalga boyunda 0. dakika ve 5. dakikalarda ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{tChE aktivitesi}(\mu\text{mol/dak/mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{Vt}{\square \times V\ddot{o}}$$

ΔABS = Zamana bağılı olarak absorban değışimi

t = Zaman (dak)

Vt = Toplam hacim

Vö = Örnek hacmi

\square = $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$\text{tChE spesifik aktivitesi} (\mu\text{mol/dak/mg protein}) = \frac{\text{tChE aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

3.2.2.4. TBARS Yöntemi

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri, aerobik koşullarda TBA ile 100°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleksin absorbanı spektrofotometrede 535 nm'de ölçülür [90].

Ayırçlar

1. %0.65 TBA

2. %10 TCA

Yöntem

25 μL supernatanta 25 μL %10'luk TCA eklendi, vortekslendikten sonra 500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 37.5 μL supernatanta 37.5 μL %0.65'lik TBA eklendi ve vortekslendi. 100°C'lik benmaride 10 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler oda sıcaklığına getirildi ve üzerine 12.5 μL saf su eklendi ve çalkalandı. Bu tepkime sonunda örneklerin absorban değeri 535 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorban değeri 1,1',3,3' tetrametoksipropan yardımı ile hazırlanan standart grafiğe göre derişim değeri dönüşürüldü.

3.2.2.5. Protein Yöntemi

D. magna örneklerinde protein miktarı GPx, tChE, GST spesifik enzim aktiviteleri ile TBARS miktarını hesaplamak amacıyla analiz edildi. Alkali koşullar altında +2 değerlikli Cu, peptid bağları ile kompleks kurarken +1 değerlikli Cu haline dönüşür. Monovalan Cu iyonu ile tirozin, triptofan ve sisteinin radikal gruplarının Folin ayırıcı ile tepkimesinde molibden/tungsten mavisine indirgenen kararsız bir bileşik meydana gelir. Oluşan rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür [91].

Ayırıcılar

- a) %2 Na₂CO₃
- b) %1 CuSO₄ x 5H₂O
- c) %2 Na-K tartarat

Tüm bu çözeltiler karıştırılarak Cu ayırıcı hazırlanır.

1. %1'lik SDS
2. 1 M NaOH
3. 2N Folin ayırıcı

Kullanılacağı zaman eşit hacimde karıştırılır.

A. Lowry ayırıcı (Günlük hazırlanır): 3 mL Cu ayırıcı, 1 mL SDS, 1 mL NaOH karıştırılır.

B. Folin-Ciolcalteu's ayırıcı: 100 µL Folin-Ciolcalteu's 900 µL saf su ile karıştırılır.

Yöntem

10 µL supernatant üzerine 45 µL Lowry ayırıcı eklendi, vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Süre sonunda örnekler 45 µL Folin-Ciolcalteu's ayırıcı eklendi, vortekslendi ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. 750 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değeri ölçüldü. Aynı işlem örnek yerine 10 µL saf su kullanılarak kör için uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri BSA yardımıyla hazırlanan standart grafiğe göre derişim değerlerine dönüştürüldü.

3.2.2.6. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

Sağlıklı mitokondriler yüksek elektrokimyasal potansiyele sahiptirler. JC1 boyası membrandan geçerek fluoresans yapan kırmızı agregatlar oluşturur. Düşük elektrokimyasal potansiyele sahip mitokondrilerde boyanın birikimi engellenir ve boya yeşil fluoresans yapan monomerler halinde kalır. Daha önceden JC1 boyaması için ayrılan her bir mikropilaka içerisindeki *D. magna* örneği, plaka içerisinde 6 µM JC1 boyası ile 90 dak. karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda her bir örnek JC1 yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkandı. Fluoresans yapan örnekler Carl Zeiss marka konfokal lazer taramalı mikroskobu yardımı ile görüntülendi [62].

3.2.2.7. Sitokrom c ve AMPK Protein Derişimlerinin Belirlenmesi

Dört farklı tekrerrü oluşturan her beherden 20 *D. magna* örneği tek bir tüpte havuzlandı ve toplam 80 örneğin havuzlanması ile elde edilen tek bir tüpteki *D. magna* örneği RIPA lizi tamponu ile parçalandı. Elde edilen çözeltinin öncelikle total protein derişimi modifiye Lowry yöntemi [91] ile belirlendi. Örnekler, 3:1 v/v oranında 4X lityum dodesil sülfat tamponu ile karıştırıldı ve 100°C'de 10 dak. boyunca bekletilerek proteinleri denatüre edildi. 50 µg protein içerecek şekilde örnekler, 500 mL yürütme tamponu içeren dikey elektroforez sistemine yerleştirilen %10'luk akrilamid jelindeki kuyucuklara yüklendi. Jelin bir kuyucuğuna 5 µL markır yüklemesi yapıldı. Yükleme devamında proteinler elektroforez tankındaki jelde 80 volt altında yaklaşık bir saat yürütüldü. Tamamı eksi yükle yüklenmiş olan proteinler, molekül büyüklüklerine göre ayrıldı. Jel elektroforezinde yürütülen proteinler, aktarım cihazı yardımıyla PVDF membrana 10 dak. sürede aktarıldı. Membran ve antikor kullanılarak proteinin tanımlanması işlemine geçildi. Protein bantlarının daha net ve belirgin görünmesi için membran, sinyal artırıcı çözelti içeren kaba yerleştirildi ve 15 dak. süre ile orbital karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında çalkalandı. Süre sonunda membran, üç kez saf su ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmaları en aza indirmek için membran, %5 BSA çözeltisinde 1 saat bekletilerek doyurma işlemi yapıldı. Proteinlerin tanımlanması için birincil antikor (sitokrom c, AMPK) protokolüne göre %5 BSA çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltildi. Membran,

birincil antikor çözeltisi ile +4°C’de bir gece orbital çalkayıcı yardımı ile soğuk odada inkübe edildi. Daha sonra membranlar, ikincil antikorların uygulanması için PBS-T çözeltisi ile 5’er dak süreyle üç kez yıkandı. İkincil antikorlar (anti-rabbit) protokolüne göre %5 BSA çözeltisinde 1/3000 oranında seyreltildi. Membranlar, bu çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat orbital çalkayıcı yardımıyla inkübe edildi. Daha sonra, 5’er dak olmak üzere üç kez PBS-T tamponu ile yıkandı. Membranlar BCIP/NBT çözeltisi ile karıştırıldı. Görüntü oluşunca membranlar saf su ile yıkandı ve fotoğraf makinesi ile görüntüleme yapıldı. Bant koyuluğu ImageJ versiyon 1.46r analiz programı ile ölçülerek kontrole göre yüzde değişim grafikleri hazırlandı (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal analizlerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 paket istatistik programında (SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.) yapıldı. Verilerin normalitesi Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) testine tabi tutuldu. Bu test ile gruplar arasında fark görülmüşse öncelikle veri setlerinin Levene testi ile homojenitesi araştırıldı. Homojenlik gösteren veri setleri için gruplar arasındaki istatistiksel ayırım Duncan *post-hoc* testi ile, homojenlik göstermeyen veri setleri için gruplar arasındaki ayırım Tamhane’s T2 *post-hoc* testi ile analiz edildi [92]. Veriler aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde sunuldu ($P<0.05$).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA**4.1. Bulgular**

Bu çalışmada çevresel sularda aynı anda bulunması olası olan tribenuron metil herbisidi ile amonyağın önceki çalışmalarla belirlenen çevresel derişimlerinin, *D. magna*'da subakut etkisinde GPx, tChE, GST enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve total protein düzeyleri ile sitokrom *c* ve AMPK protein miktarlarına ve kronik etkisinde mitokondriyal membran potansiyeline etkileri araştırılmıştır.

4.1.1. Tribenuron Metil Herbisidi ve Amonyagın Subakut Etkisinde *D. magna*'da Ölçülen Değişimler**4.1.1.1. Biyokimyasal Değişimler**

D. magna'da tribenuron metil herbisidi ile amonyağın iki farklı çevresel derişiminin ayrı ve karışım halinde subakut etkisinde GPx, GST, tChE enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu düzeyleri ile total protein miktarındaki derişimler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Etkisi denenen toksikantlar GST ve tChE spesifik enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu düzeyleri ile total protein miktarlarında herhangi bir derişime neden olmamıştır ($P>0.05$; Çizelge 4.1). Yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil karışım grubunda GPx aktivitesinde kontrole göre herhangi bir derişim meydana gelmezken, bu toksikantların ayrı uygulandığı gruplara oranla aktivitede artış ölçülmüştür. Artış oranı tribenuron metil grubuna göre %33.33 ve yüksek derişim amonyak grubuna göre %40'dır.

4.1.1.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom *c* ve AMPK Protein Derişimlerindeki Değişimler

Tribenuron metil herbisidi ile amonyağın iki farklı çevresel derişiminin ayrı ve karışım halinde kronik etkisi, *D. magna*'da mitokondriyal membran potansiyeli depolarizasyonuna neden oldu. En az depolarizasyon tribenuron metil uygulanan *D. magna* örneklerinde gözlenirken, en belirgin etki tribenuron metil ve yüksek derişim amonyağın birlikte uygulandığı grupta meydana geldi (Resim 4.1).

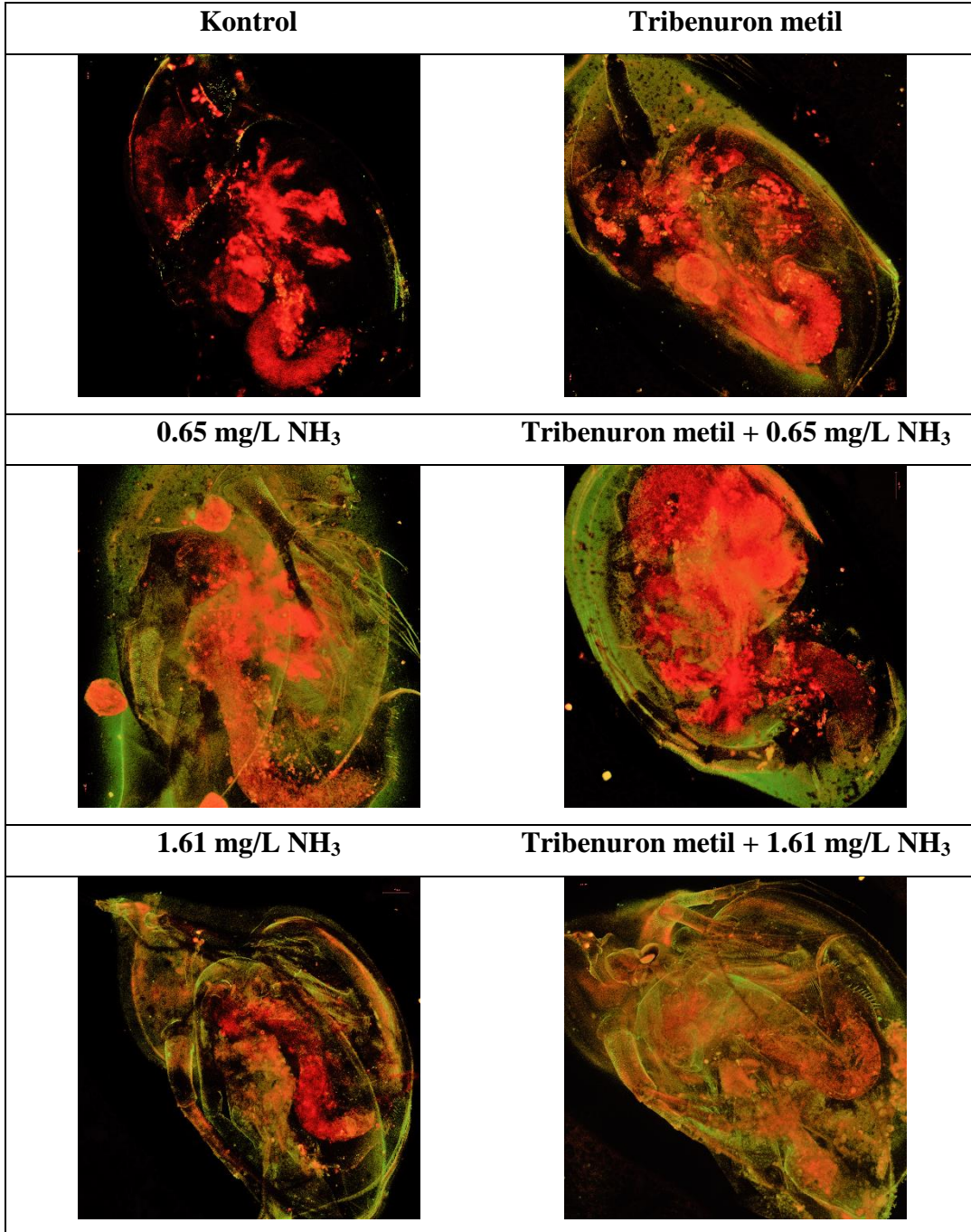
Tribenuron metilin çevresel derişimi ve iki farklı çevresel amonyak derişimi ile bunların karışımının subakut etkisinde *D. magna*'da sitokrom *c* ve AMPK protein derişiminin değişimi Resim 4.2 ve Resim 4.3 ile Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tribenuron metilin çevresel derişimlerinde sitokrom *c* protein miktarında %26.30 oranında azalma meydana gelmiştir. Düşük derişim amonyak ve bunun tribenuron metil ile karışımının etkisinde sitokrom *c* derişimlerinde artış meydana gelmiştir.

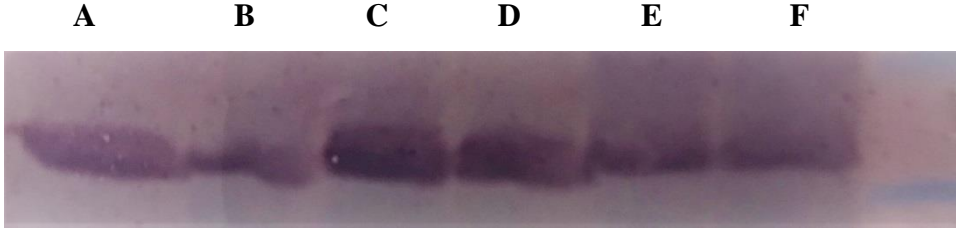
Çizelge 4.1 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da GPx, GST ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değişimler

	GPx ($\mu\text{mol/dak/mg}$ protein)	GST ($\mu\text{mol/dak/mg}$ protein)	tChE (nmol/dak/mg protein)	TBARS (nmol/mg protein)	Total Protein (mg/mL)
Kontrol	0.024 \pm 0.004 ^{ab}	0.198 \pm 0.021	1.360 \pm 0.065	6.894 \pm 2.295	1.816 \pm 0.246
0.81 $\mu\text{g/L}$ Tribenuron metil	0.021 \pm 0.005 ^a	0.192 \pm 0.040	1.383 \pm 0.241	9.199 \pm 3.692	1.875 \pm 0.376
0.65 mg/L Amonyak	0.020 \pm 0.002 ^a	0.163 \pm 0.013	1.214 \pm 0.078	4.091 \pm 0.198	2.006 \pm 0.053
0.65 mg/L Amonyak + 0.81 $\mu\text{g/L}$ Tribenuron metil	0.024 \pm 0.006 ^{ab}	0.169 \pm 0.019	1.323 \pm 0.116	5.778 \pm 2.326	1.907 \pm 0.241
1.61 mg/L Amonyak	0.020 \pm 0.003 ^a	0.173 \pm 0.014	1.307 \pm 0.124	6.589 \pm 2.410	2.018 \pm 0.218
1.61 mg/L Amonyak + 0.81 $\mu\text{g/L}$ Tribenuron metil	0.028 \pm 0.005 ^b	0.159 \pm 0.032	1.172 \pm 0.041	5.781 \pm 1.267	1.998 \pm 0.091

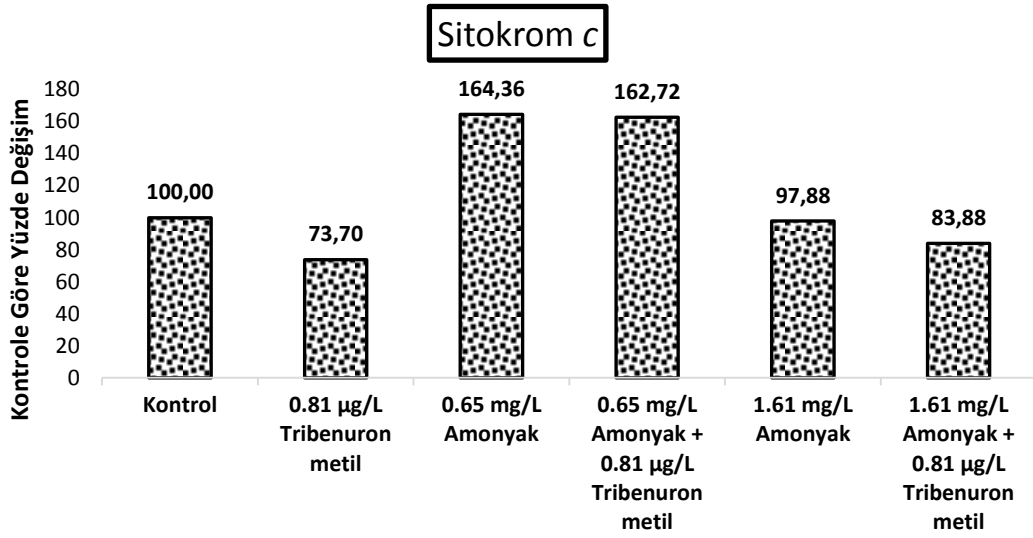
Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($P<0.05$; $N=4$).



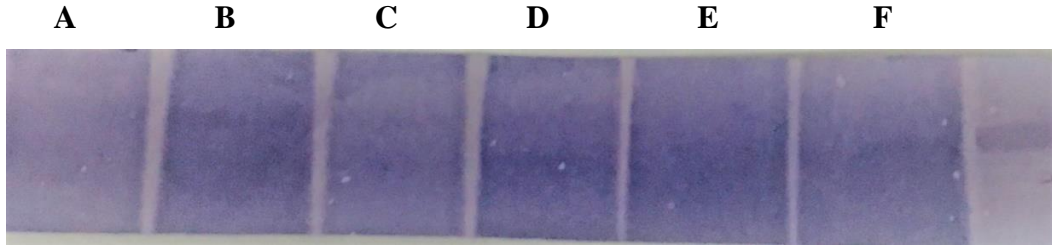
Resim 4.1 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının kronik etkisindeki *D. magna*'da mitokondriyal membran potansiyeli değişimi analizine ait görüntüler (— 200 μ m).



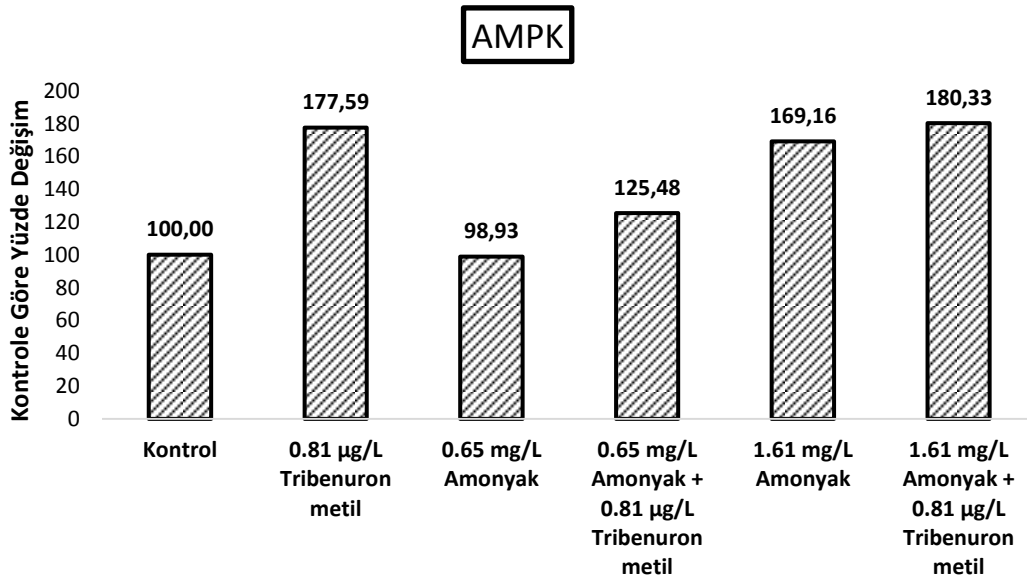
Resim 4.2 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da sitokrom *c* protein derişimi analizine ait jel görüntüleri (A: Kontrol; B: 0.81 µg/L Tribenuron metil; C: 0.65 mg/L NH₃; D: 0.65 mg/L NH₃ + 0.81 µg/L Tribenuron metil; E: 1.61 mg/L NH₃; F: 1.61 mg/L NH₃ + 0.81 µg/L Tribenuron metil)



Şekil 4.1 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da sitokrom *c* protein derişiminin kontrole göre yüzde derişimi



Resim 4.3 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da AMPK protein derişimi analizine ait jel görüntüleri (A: Kontrol; B: 0.81 µg/L Tribenuron metil; C: 0.65 mg/L NH₃; D: 0.65 mg/L NH₃ + 0.81 µg/L Tribenuron metil; E: 1.61 mg/L NH₃; F: 1.61 mg/L NH₃ + 0.81 µg/L Tribenuron metil)



Şekil 4.2 Tribenuron metil herbisidi ile iki farklı amonyak derişimi ve bunların karışımının subakut etkisindeki *D. magna*'da AMPK protein derişiminin kontrole göre yüzde derişimi

Tribenuron metilin çevresel derişiminde AMPK protein miktarı %77.59 oranında artarken düşük derişim amonyak etkisinde herhangi bir derişim meydana gelmemiştir (Resim 4.3). Aksine 1.61 mg/L amonyak derişiminin etkisinde AMPK protein miktarı %69.16 oranında artmıştır. Tribenuron metil ile amonyağın karışımı gruplarında AMPK protein miktarında derişime bağlı artış meydana gelmiştir (Şekil 4.2).

4.2 Tartışma

Model organizma *D. magna* kullanarak yaptığımız bu çalışmada, çevresel sularda aynı anda bulunma olasılığı olan amonyak ve tribenuron metil herbisidinin her ikisinin de toksik olduğunu ve bunların karışımlarının trofik zincir için önemli bir bileşen olan *D. magna*'nın yaşam kalitesini azaltan önemli etkenlerden biri olduğunu ortaya çıkardık. Subakut çalışmamızda, çevresel sularda 3.22 mg/L [45] gibi daha yüksek derişimlerinde ölçtüğümüz amonyak, tüm örneklerin ilk 48 saat içerisinde ölmesine neden oldu. Bu nedenle etkisi denenen en yüksek derişim olarak çevrede ölçtüğümüz en yüksek derişimin yarısı olan 1.61 mg/L derişimini uyguladık. Amonyagin *D. magna*'da 48 saatlik LC₅₀ değeri 2.94 (%95 güven aralığı: 2.70-3.22) mg/L'dir [93]. Bu LC₅₀ değeri, sıcaklık 19.5-20.5°C ve pH 8.4-8.6 aralığı değerlere sahip kültür suyuna göre elde edilmiştir. Aslında bu değer, kültür ortamının pH'ı ve sıcaklığına göre değışim göstermektedir. Örneğın, sıcaklık 19.4-20.2 ve pH 8.11-8.58 aralığında amonyağın *D. magna*'da LC₅₀ değeri 4.07 (%95 güven aralığı: 4.07-4.07) mg/L'dir [94]. Üstelik her iki çalışmada da juvenil (<24 saat) örnekler kullanılmıştır. Subakut toksisite denemelerimizde başlangıç sıcaklık değeri 20.8±0.16°C ve pH 8.0, 48 saat sonunda sıcaklık 20.76±0.85°C ve pH 8.02±0.16'ydı. Biyokimyasal analizler için gereken protein miktarlarını elde edebilmek üzere 12 günlük canlıları kullandık [84]. 0.5-5 günlük *D. similoides* örneklerinde 24 ve 48 saatlik LC₅₀ değerleri ile ölçülen amonyak toksisitesi süreye bağılı azalırken, 7 günlük örneklerde toksisite Gauss eğrisi oluşturacak şekilde artmıştır [95]. Çözünmüş oksijen düzeylerinin 8.0 mg/L olduğu koşullarda 0.30 ve 0.48 mg/L amonyak derişimleri *D. similis*'de 14 gün süre ile ölüm meydana getirmezken, 2.0 mg/L çözünmüş oksijen derişimlerinde ölüm oranını artırmaktadır [96]. Çalışmamızda da 21 günlük kronik etkide su değışimleri sonrası çözünmüş oksijen değeri 7.07±0.82'ydı. *D. similis*'e oranla daha uzun süre ve daha yüksek amonyak derişimlerinde *D. magna* örneklerinde ölüm görülmemesi çözünmüş oksijen düzeylerinin amonyak toksisitesine karşı koruyucu etki yapmasına bağlanabilir [96].

Tribenuron metil, toprak solucanı *E. foetida*'da CAT ve SOD gibi antioksidant enzim aktivitelerini 28 günlük etki süresinin yalnızca 3. gününde ve

LC₅₀'nin 0.05 ve 0.1 katına denk gelen derişimlerde artırırken, hiçbir etki süresi ve derişiminde lipid peroksidasyonu düzeylerini değiştirmemiştir [48]. Çalışmamızda tribenuron metil, çevresel derişiminin subakut etkisinde *D. magna*'da GPx ve GST aktivitelerini ve lipid peroksidasyonu düzeylerini etkilememiştir. Tribenuron metil herbisidinin bitkilerde etki mekanizması valin, lösin ve izolösin gibi aminoasitlerin sentezinde ilk basamağı katalizleyen AHAS enziminin inhibisyonudur [5]. Hayvanlardaki etki mekanizması hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. 40, 80 ve 120 mg/L tribenuron metil etkisindeki balık *D. rerio*'da özellikle hiperplazi ve vakuolizasyon ile karakterize şekilde solungaçta histopatolojik değişimler meydana gelmiştir [49]. 40, 80 ve 120 mg/L tribenuron metil etkisindeki balık *D. rerio*'da yumurtalık dokusunda primer oosit sayısında azalma, follikül epitelinde bütünlük kaybı, dejenere ve atretik oosit sayısında artış ile karakterize histopatolojik etkiler gözlenmiştir [50]. Maya *S. cerevisiae* hücrelerinde tribenuron metil ve metsulfuron metil herbisit karışımından oluşan ticari formülasyonun 100 mg/L etkisinde total hidroperoksit, lipid peroksidasyonu düzeyleri ile GSH miktarı ve GR enzim aktivitesi artarken GPx aktivitesinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir [53]. Artan GR aktivitesi, GSH'ı substrat olarak kullanan GPx aktivitesinin korunmasına yardımcı olabilir. Bu çalışmaların dikkat çeken noktası çevresel derişimlerine oranla oldukça yüksek derişimlerinde tribenuron metil uygulanmış olmasıdır. Çalışmamız sonuçlarına göre çevresel derişimlerinde tribenuron metil *D. magna*'da antioksidant enzim ve lipid peroksidasyonu analizleri ile belirlenebilecek pro-oksidatif potansiyele sahip değildir.

Suda iyonlaşmamış amonyak ve iyonlaşmış amonyum formlarında bulunan amonyağın toksisitesi, özellikle iyonlaşmamış amonyak formu ile ilişkilidir [18]. Amonyaaın oksidatif etkisi farklı canlı türlerinde araştırılmıştır ve GST enzim aktivitesinin, amonyak etkisi için geçerli bir biyomarkır olamayacağı değerlendirilmiştir. 2 mM/L total amonyak azotu etkisindeki karides *M. amazonicum*'da solungaç dokusunda GST aktivitesi değişmezken SOD, GR ve Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitelerinde artış meydana gelmiştir [54]. GR, GPx aktivitesi ile artan GSSG'yi, GSH'a indirger ve aktivitesindeki artış, olasılıkla artan GPx aktivitesi ile ilişkilidir. 8 mmol NH₄Cl'nin 12 ve 48 saatlik etkisinde balık

Boleophthalmus boddarti'de beyin dokusunda selenyum-bağımlı GPx ve total GPx aktivitesi kontrole oranla değişmezken, total GPx aktivitesi, uygulamanın 48. saatinde 12 saatlik uygulamaya oranla artış göstermiştir. GST aktivitesi değişmezken lipid peroksidasyonu düzeyleri 48 saatlik uygulamada azalmıştır [55]. Aynı çalışmada, solungaçlarda 48 saat sonunda lipid peroksidasyonu düzeyleri ve selenyum bağımlı GPx ve GST aktiviteleri değişmezken, 24 saatlik uygulamada total GPx aktivitesinin azalmasına bağlı olarak lipid hidroperoksit düzeyleri artmıştır. Çalışmamızda tribenuron metil ve iki farklı amonyak derişiminin etkisindeki *D. magna*'da kontrole oranla tüm etki gruplarında GPx aktivitesi değişmezken, yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil karışım grubunda aktivite, yüksek derişim amonyak ve tribenuron metilin ayrı verildiği gruplara göre artış göstermiştir. Oksidatif strese karşı koymak üzere ilk savunma hattında yer alan GPx, H₂O₂ ve organik peroksitlerin GSH ile tepkimesi sonucu GSSG oluşumunu sağlayan enzimdir [31]. Bu nedenle, yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil karışım grubunda ayrı uygulama gruplarına oranla pro-oksidatif etkiden söz edilebilir.

D. pulex, kairomon adı verilen ve predatör varlığını gösteren eksojen bileşikler ile farklı bileşiklerin varlığına tepki olarak "boyun dişi" adı verilen karapaks çıkıntısı geliştirir ve karapaks kalınlığını artırır. Bu tip ksenobiyotiklerin varlığında NMDA reseptör antagonistinin uygulanması boyun dişi oluşumunu ve karapaks kalınlığındaki artışı engellemektedir [97]. Aynı çalışmada, *D. pulex*'de NMDA reseptörleri ile ilişkili genlerin varlığı da belirlenmiştir. Erkek Wistar ırkı sıçanların beyin dokusunda amonyak etkisiyle ATP düzeylerinin azaldığı, ADP, AMP ve Pi düzeylerinin ve Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [60]. Tüm bu etkiler NMDA reseptör antagonisti uygulaması ile sonlanmıştır. Yazarlar, NMDA reseptörlerinin aktivasyonunun ATP tüketim oranında artışa yol açtığını önermişlerdir. Reseptörün aktivasyonu hücre içerisine Ca²⁺ ve Na⁺ girişini artırır ve Na⁺ homeostazını sağlamak üzere Na⁺-K⁺ ATPaz yoğun şekilde ATP harcar [60]. Uzun süren NMDA reseptör uyarımı sonrası hücre içerisinde Ca²⁺ birikimi, reseptör ilişkili toksisitenin açığa çıkmasında en önemli mekanizmadır [98]. Yüksek intraselüler Ca²⁺ düzeyleri mitokondrilerde hasar oluşturabilir [99], [100] ve endoplazmik retikulum gibi intraselüler depolardan salınma ya da hücre içine net

Ca²⁺ girişi gibi etkenler ROS üretimini ve hücre ölümünü tetikleyebilir [99], [101]. Oluşan ROS içerisinde süperoksit radikallerinin en önemli kaynağı mitokondrilerdir [102]. Süperoksit radikali oluşumunu MMP depolarizasyonu takip etmektedir ve sitokrom *c* salınımı sonrası apoptoz meydana gelmektedir [103].

Erkek Wistar ırkı sıçanların beyin dokusunda NMDA tipi glutamat reseptörlerinin blokajı, amonyağın neden olduğu süperoksit radikali oluşumunu, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidant savunmanın ilk hattını oluşturan enzimlerin inhibisyonunu, GSH azalmasını ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin artışı engellemiştir [104]. 12 mmol/kg amonyum asetat enjekte edilen erkek Wistar sıçanlarının non-sinaptik beyin mitokondrilerinde süperoksit radikali derişiminin artışına karşın H₂O₂ derişimlerinde azalma meydana gelmiştir [61]. Bu nedenle GPx ve CAT aktiviteleri değişmemiştir. H₂O₂ derişimindeki azalmanın mitokondriyal SOD olan MnSOD aktivitesinin azalması nedeniyle olduğu ve NMDA reseptör antagonisti uygulamasının amonyağın etkilerini sonlandırdığı belirlenmiştir [61]. 34.87 mg/L amonyak etkisindeki karides *E. carinicauda*'da hemolenf ve hepatopankreasda sitozolik ve mitokondriyal MnSOD transkript sayısının arttığı belirlenmiştir [58]. 0.3, 0.5 ve 1.0 mg/L amonyak etkisindeki *D. magna*'da süperoksit radikallerinin süpürülmesinden sorumlu Cu-Zn SOD transkript düzeyleri derişime bağlı artış gösterirken, enzim aktivitesi yalnızca 0.3 mg/L amonyak etkisindeki örneklerde artmıştır [59]. Aksine, yüksek derişim amonyak etkisinde karides *F. merguensis*'de solungaç dokusunda Cu-Zn SOD ve GST transkript sayısının azaldığı belirlenmiştir [56]. Çalışmamızda 0.65 ve 1.61 mg/L düzeylerinde amonyak derişimlerinin etkisini denedik ve yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil etkisi karışım grubu dışında GPx aktivitesinin değişmediğini belirledik. Olasılıkla, amonyak etkisinde artan SOD aktivitesine bağlı olarak meydana gelen H₂O₂'yi uzaklaştırmak üzere bazal GPx aktivitesi yeterli gelmiş; yalnızca en yüksek amonyak derişimi ile tribenuron metilin karışımı uygulanan grupta daha yüksek H₂O₂ derişimlerine ulaşılması, GPx aktivitesinde artışa yol açmış olabilir.

Yalnızca yüksek derişim amonyak ve tribenuron metil karışım grubunda GPx aktivitesinin artışı, tribenuron metilin additif etkisi ile artan Ca²⁺ yüküne bağlı ROS düzeylerinde yükselmeye bağlayabiliriz. *D. magna*'nın da yer aldığı Crustacea

grubunun mitokondrileri yüksek Ca^{2+} yüküne dayanıklıdır. Ekstrem anoksik koşullara dayanıklı *Artemia franciscana* embriyolarının izole mitokondrilerinde aşırı Ca^{2+} yüklemesine karşın sitokrom *c* salınımının gerçekleşmediği; buna karşın, $HgCl_2$ etkisinde mitokondriyal membran şişmesi ve sitokrom *c* salınımı meydana geldiği belirlenmiştir [105]. Bu canlılarda aşırı Ca^{2+} yüklemesi, memeli mitokondrilerinin aksine büzülme ile sonuçlanmamakta, önceden var olan Ca^{2+} da atılmamaktadır. Bu özellikleri nedeni ile bu canlıların aşırı anoksik koşullara dayanabildiği önerilmektedir. *D. pulex*'de de Ca^{2+} yükleme kapasitesinin oldukça yüksek olduğu ve Ca^{2+} saturasyonu sonrası herhangi bir MPTP yapısının oluşmadığı belirlenmiştir [106]. *D. magna* da kısa süreli anoksiyaya ve şiddetli hipoksik koşullara dayanıklı bir türdür [22].

Mitokondriyal membran depolarizasyonu, hücre ölümünü belirlemek için yaygın kullanılan markırlardan bir tanesidir [65, 105, 106] ve hücre ya da dokuların fizyolojik durumları hakkında bilgi vericidir [67]. Organofosfatlı bir insektisit olan malathionun düşük derişimlerinin etkisinde balık *Ctenopharyngodon idellus* epidermis hücre hattında, MMP depolarizasyonu yanında artan ROS ve intraselüler Ca^{2+} ile azalan ATP düzeylerine eşlik eden apoptoz gelişimi bildirilmiştir [109]. 5 mM NH_4Cl etkisindeki astrosit hücre kültüründe JC1 boyası ile belirlenen MMP depolarizasyonu ve ROS üretiminde artış meydana geldiği ve bunun artan intraselüler Ca^{2+} düzeyleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [68]. Çalışmamızda tüm etki gruplarında MMP depolarizasyonu görülmüştür. En belirgin etki yüksek derişim amonyak gruplarında olmakla birlikte tribenuron metil, yüksek derişim amonyanın depolarize edici etkisini artmıştır. Bu karışım grubunda ayrı uygulamalara oranla artan GPx aktivitesi, H_2O_2 ve diğer organik peroksitlerin, dolayısıyla ROS miktarındaki artışı göstermektedir. Düşük tuzluluk koşullarında ve Cu etkisinde yengeç *N. granulata*'da anterior solungaç dokusunda heksokinaz, piruvat kinaz, fosfofruktokinaz ve sitrat sentaz enzim aktiviteleri ile MMP'nin azaldığı, laktat dehidrojenaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [66]. Enzim aktivitelerindeki ve MMP'deki düşüş nedeniyle ATP üretiminin aerobikten anaerobiğe kaydığı ve ATP üretiminin bu nedenle azaldığı önerilmiştir. Amonyum iyonu, K^+ ile aynı hidrasyon çapına sahiptir; bu nedenle, Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi ile amonyak etkisinde NMDA

reseptörleri aracılığı ile Na^+ atılırken, K^+ yerine NH_4^+ hücre içinde birikir [110]. Amonyum iyon birikimi hücre içi metabolik ara maddeler olan indirgeyici ekivalanların sitozolde birikimine ve mitokondriye ulaşmasına engel olur ve enerji üreten tepkimelerde sıkıntı baş gösterir [111].

JC1 boyası kullanılarak omurgasızlarda MMP değişiminin varlığını gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır. Valinomycin ve cereulide gibi çeşitli toksinlerin etkisinde *D. magna*'da JC1 ile ölçülen MMP'de depolarizasyon bildirilmiştir [62]. <24 saat *D. magna* örneklerinde JC1 ile ölçülen MMP depolarizasyonu nedeni ile AgNO_3 nanopartiküllerinin mitokondriyal hasara yol açtığı belirlenmiştir [63]. Çalışmamızda etkilerini araştırdığımız tribenuron metil herbisidi sülfonilüre grubuna dahildir. Mitokondri üzerine etkilerine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Sülfonilüre grubu herbisitler metsulfuron metil ve chlorimuron etil karışımı ticari formülasyon Almix etkisinde, balık *Oreochromis niloticus*'da mide ve barsakları kapsayan gastrointestinal dokuların histopatolojik incelenmesinde mitokondriyal dejenerasyon görülmüştür [112]. Balık *Anabas testudineus*'da Almix etkisinde solungaç ve karaciğer dokularında meydana gelen mitokondriyal dejenerasyonun elektron taşıma zincirinin inhibisyonu sonucu meydana gelebileceği bildirilmiştir [113]. Fenilüre grubu herbisit olan linuron etkisinde sıçan karaciğer mitokondrilerinde kompleks I aktivitesinin inhibe olduğu, derişime bağlı olarak MMP depolarizasyonunda artış ve fosforilasyon oranlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir [114]. Kompleks I inhibitörleri iki grupta incelenir: ROS-üreticileri ve ROS üretimi inhibitörleri [115]. Eğer etkileşiyorsa, uyguladığımız derişimi de dikkate alarak tribenuron metilin olasılıkla ROS üretim inhibitörü olarak davrandığını söyleyebiliriz. Buna karşın, tribenuron metil etkisinde *D. magna*'da gözlenen MMP depolarizasyonunun mekanizması olasılıkla aşağıda açıklandığı üzere AMPK protein derişimlerinde artış ile kendisini gösteren enerji üretim tepkimeleri ile girişim vermesindedir. Bu konuda ayrıntılı mekanistik çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu memelilerde mitokondriden sitokrom *c* salınımından sorumlu, önemli bir mekanizmadır [116] ve memelilerde sitokrom *c* salınımı hücrelerin mitokondriyal apoptozu için önemli bir

başlatıcı faktördür [117]. Çalışmamızda, 0.65 mg/L amonyanın tek başına ve tribenuron metil ile karışımı gruplarında sitokrom *c* miktarında artış meydana gelmiştir. Hiperammonemik farelerin beyin dokusunda sitokrom *c* oksidaz aktivitesinin yanında sitozolik NADH/NAD⁺ oranında artma; aksine mitokondriyal oranda ve ATP miktarında azalma meydana gelmiştir [118]. Amonyak, sitozolik malat dehidrojenaz ve aspartat aminotransferaz aktivitelerini inhibe ederek, indirgeyici ekivalanların sitozolde birikmesine ve mitokondrielerde azalmasına neden olmaktadır. Bu şekilde substrat eksikliği en sonunda sitokrom *c* oksidaz aktivitesini ve ATP üretimini azaltmaktadır [118], [119]. İndirgeyici ekivalan eksikliğinde elektron azalması elektrokimyasal gradientin kurulamamasına ve MMP depolarizasyonuna, dolaylı olarak ROS üretiminde azalmaya neden olabilir [118, 119, 120]. Bu nedenlerle, bu gruplarda artan sitokrom *c* derişimi olasılıkla başka bir mekanizma ile ilişkilidir. Sitokrom *c* proteini nükleer DNA tarafından kodlanır ve apositokrom *c* oluşumundan sonra buna hem grubunun bağlanması ve dış mitokondri zarından geçmesi için NADH'a gereksinim duyar [120]. Her ne kadar 0.65 mg/L amonyak ve tribenuron metil karışım grubu için bu açıklama yeterli gibi görünse de, değişmeyen AMPK protein miktarından dolayı 0.65 mg/L amonyak etkisindeki grupta artan sitokrom *c* derişimlerine karşın değişmeyen AMPK düzeyleri nedeniyle önerimiz yetersiz kalmaktadır. 0.65 mg/L amonyak etkisindeki grupta AMPK miktarında değişim olmaması, AMPK aktivitesinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Bu çalışma, bildiğimiz kadarıyla, *Daphnia spp.*'de AMPK protein derişimlerinin ölçüldüğü ilk çalışma niteliğindedir ve total AMPK miktarına karşın AMPK aktivitesinin ölçülebileceği ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Aşağıda da örneklendiği üzere total AMPK protein miktarında azalma ya da değişim olmaksızın fosforile AMPK miktarı artarak enerji stresine yanıt verebilmektedir [72].

Yüksek kadmiyum (Cd) derişiminin etkisi altındaki yengeç *Sinopotamon henanense*'de hepatopankreas dokusunda MMP depolarizasyonu ve sitokrom *c* azalması meydana gelmiştir [121]. Sitozole atılan sitokrom *c* yeniden absorbe edilerek ya da yeniden sentezlenerek, mitokondrieler hasardan korunmaya çalışırlar. Artan strese bağlı olarak sitokrom *c* absorpsiyonu durur ve daha fazla mitokondri hasar görür [121]. Çalışmamızda tribenuron metil etkisinde sitokrom *c* düzeylerinde

azalma meydana gelmiştir. O'Toole vd. 24 aylık erkek Fischer 344 sıçanlarının böbrek dokusunda, 6 aylık sıçanlara oranla gram böbrek başına mitokondri sayısının, oksijen tüketim oranının ve sitokrom *c* miktarının azaldığını belirlemişlerdir [122]. Sitokrom *c* miktarındaki azalma oksidatif fosforilasyonun azalmasının başlıca nedenidir [122]. Tribenuron metil etkisindeki *D. magna* örneklerinde MMP depolarizasyonu, bu nedenle, sitokrom *c* miktarındaki azalma ile de ilişkili olabilir; fakat ileri çalışmalar ile bu durumun doğrulanması gereklidir.

Adenozin 5'-monofosfat (AMP) ile indüklenen protein kinaz, genel yapısı evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş ve farklı hayvan taksonlarında birçok karakteristiği benzer olan bir proteindir [123]. Farklı Crustacea üyelerinde varlığı tanımlanmıştır [124]. Hipoksiya etkisi altındaki nehir karidesi *M. nipponense*'de kas dokusunda süreye bağlı olarak, hem transkript hem de protein düzeyinde AMPK oranında artış meydana geldiği belirlenmiştir [124]. Yazarlar hipoksik koşullar altında enerji homeostazını sürdürebilmek üzere AMPK'nın aktif hale geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda düşük derişim amonyak grubu hariç tüm etki gruplarında AMPK protein miktarında artış meydana gelmiştir. Etki gruplarında gözlenen MMP depolarizasyonu ve AMPK miktar artışı nedeniyle, çevresel derişimlerinde tribenuron metil ve amonyak karışımı, olasılıkla mitokondrilerde enerji üretimi ile girişim vermekte ve etki altındaki *D. magna* örneklerinde enerji stresi meydana getirmektedir. Antimikrobiyal madde triclosan'ın üç farklı derişiminin 21 gün etkisindeki tatlı su midyesi *E. complanata*'da hepatopankreas dokusunda yalnızca en yüksek derişimde toplam AMPK miktarının ve fosforile AMPK miktarı ile ölçülen AMPK aktivitesinin arttığı saptanmıştır [71]. Yazarlar, triclosan etkisi ile mitokondrilerde enerji üretiminin baskılanabileceğini ve bunun da AMPK aktivasyonuna yol açacağını bildirmişlerdir. Belediye atıklarının karıştığı istasyonlara yerleştirilen *E. complanata*'da hepatopankreas dokusunda 21 gün etki sonunda toplam AMPK miktarı ve AMPK transkript düzeyleri azalsa da fosforile AMPK düzeylerinde artış meydana gelmiştir [72]. Yazarlar kontamine sularda yaşayan hayvanlarda enerjetik stresi belirlemek üzere AMPK'nın yararlı bir biyomarkır olabileceğini bildirmişlerdir. Deniz yengeci *C. irroratus*'da hepatopankreas dokusunda hipoksik koşullar altında laktat derişiminin ve AMPK

aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [73]. *C. irroratus* hepatopankreas hücrelerinde artan laktat derişimleri ile belirlenen anaerobik solunuma geçiş ile nedeniyle AMPK sentezinin artırıldığı bildirilmiştir.

Sülfonilüre herbisit metsulfuron metilin 400, 800 ve 1200 mg/L gibi oldukça yüksek derişimlerinde balık *Rhamdia quelen*'de beyin dokusunda AChE aktivitesinin arttığı, kas dokusunda ise azaldığı belirlenmiştir [125]. Oldukça yüksek derişimlerinde AChE aktivitesinin etkilenmesinden dolayı, bu herbisidin balıklar için güvenli olduğu bildirilmiştir. 2 µg/L metsulfuron metilin 30 gün etkisinde balık *Leporinus obtusidens*'de AChE ve CAT aktivitelerinin değişmediği, lipid peroksidasyonu düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir [126]. Kas dokusunda ise lipid peroksidasyonu ve CAT aktivitesi değişmezken AChE aktivitesi artmıştır. 5.8 µg/L metsulfuron metilin 90 gün etkisinde balık *L. obtusidens*'de kas ve beyin AChE aktivitesinin inhibe olduğu ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir [127]. Buradan anlaşılacağı üzere sülfonilüre herbisitlerin ChE aktivitesi üzerine etkisi dokuya, derişime ve süreye bağlıdır. Çalışmamızda, 0.81 µg/L tribenuron metilin 4 günlük etkisinde *D. magna*'da tChE aktivitesi değişmemiştir. Bu nedenle, *D. magna*'da tribenuron metil etkisi için tChE aktivite ölçümü yararlı bir biyomarkır değildir.

Amonyak etkisinde memelilerde ChE aktivite artışı bilinen bir durumdur. Örneğin, amonyum asetat enjekte edilen albino farelerin beyin dokusunda hem BChE hem de AChE aktivitesinde artış meydana gelmiştir [128]. 25 ve 250 µM amonyum asetat etkisinde albino farelerin farklı beyin bölgelerinde ve 1, 5 ve 10 mM amonyum asetat etkisindeki izole sinaptozomlarında AChE ve BChE aktivitelerinin arttığı; fakat saf enzim üzerine herhangi bir etkinin olmadığı belirlenmiştir [77]. Bu bulguların aksine, 12 mM/kg amonyum asetat verilen farelerde beyin dokusunda ChE inhibisyonu saptanmıştır [78]. Yazarlar, amonyum iyonlarının asetilkolin sentezini azalttığını ve amonyağın asetilkolin düzeylerinde düşmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda aynı tür farelere uygulanan amonyum asetat derişimleri arasında fark vardır. Çalışmamızda, amonyak varlığına tChE aktivitesinin tepkisizliği, olasılıkla artan intraselüler Ca^{2+} ve dolaylı olarak artan asetilkolin salınımına karşı amonyağın asetilkolin sentezini azaltıcı etkisi nedeniyledir. Kerevit

Procambarus clarkii'de bacak motor nöron preparatlarında intraselüler Ca^{2+} düzeylerindeki artışın asetilkolin salınımını stimule ettiği saptanmıştır [129]. Amonyak etkisinde olasılıkla NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile artan Ca^{2+} iyon derişimi nedeniyle, her ne kadar çalışmamızda subakut etkide Ca^{2+} -indüklü asetilkolin salınımının indüksiyonu ve dolayısıyla ROS düzeylerinde artış beklesek de MMP depolarizasyonu tüm bu etkilerden önce meydana gelmiştir. *D. magna*'da MMP analizi tribenuron metil ve amonyak etkisinin belirlenmesinde antioksidant ve tChE enzim aktivitelerine göre önemli bir biyomarkır olarak değerlendirilebilir.

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Tribenuron metil çevresel derişiminde antioksidant ve kolinesteraz enzim aktivitelerinde herhangi bir değişime yol açmamıştır. Bu derişiminde *D. magna* için pro-oksidatif ve nörotoksik özellikte değildir.
2. Tribenuron metil yüksek derişim amonyak-indüklü toksisitenin artmasına neden olmaktadır. Artan toksisite olasılıkla ROS üretimindeki artış nedeniyledir.
3. Tribenuron metil olasılıkla aerobik metabolizma ile girişim vererek ATP üretimini engellemekte ve MMP depolarizasyonuna neden olmaktadır. Fakat, ileri mekanistik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.
4. AMPK protein düzeyi ve MMP değişimi tribenuron metil ve amonyak etkisinin belirlenmesi için biyomarkır olarak değerlendirilebilir.
5. 0.65 mg/L amonyak etkisindeki tüm grupta artan sitokrom *c* miktarı NADH eksikliği nedeniyle sitokrom *c*'nin sitozolde birikimine bağlanabilir. Olasılıkla, amonyak etkisi ile NADH üretiminin aksaması nedeniyle bu grupta ROS üretimi azalmış ve MMP depolarizasyonu meydana gelmiştir. Bu grupta AMPK miktarı değişmemesine karşın AMPK aktivitesinin ileri çalışmalara ile belirlenmesi gereklidir.
6. Amonyak etkisinde olası intraselüler Ca^{2+} derişimindeki artış ve dolaylı olarak artan asetilkolin salınımına bağlı tChE aktivite indüksiyonu, amonyağın asetilkolin sentezini azaltıcı etkisi ile dengelenmiş olabilir.

KAYNAKLAR

- [1] A. Agrawal, R. S. Pandey ve B. Sharma, "Water pollution with special reference to pesticide contamination in India," *J. Water Resour. Prot.*, vol. 2, no. 5, pp. 432-448, 2010.
- [2] K. E. Murray, S. M. Thomas ve A. A. Bodour, "Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment," *Environ. Pol.*, vol. 158, no. 12, pp. 3462-3471, 2010.
- [3] V. I. Lushchak, "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 1, pp. 13-30, 2011.
- [4] F. Çetin ve E. Karadeniz, "Tahıl Raporu 2012," T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Diyarbakır, 2013.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency, "Tribenuron methyl Summary Document Registration Review: Initial Docket," 2011.
- [6] Sigma-Aldrich, "Tribenuron methyl," *Tribenuron-methyl*. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/46013?lang=en®ion=TR&gclid=EA1aIQobChMI-P3Bnr663AIVE6WaCh2RowZpEAAAYASAAEgL6RPD_BwE. [Erişim tarihi: 25-Temmuz-2018].
- [7] National Center for Biotechnology Information, "Tribenuron-methyl," *PubChem Compound Database; CID=153909*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/153909>. [Erişim tarihi: 24-Temmuz-2018].
- [8] Tarım ve Orman Bakanlığı, "2001-2013 Yılları Bitki Koruma Ürünleri ve Hammaddelerinin İstatistikî Bilgileri," Ankara, Turkey, 2013.
- [9] A. Atlamaz ve A. Y. Gökçe, "Buğday Entegre Mücadele Teknik Talimatı," Ankara, Turkey, 2011.
- [10] European Food Safety Authority, "Scientific Report on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance: Tribenuron," *EFSA Sci. Rep.*, vol. 15, pp. 1-52, 2004.
- [11] G. Büyük, "Adıyaman Ekimi Yapılan Toprak Özellikleri," Adıyaman, 2013.
- [12] D. Degenhardt, A. J. Cessna, R. Raina, D. J. Pennock ve A. Farenhorst, "Trace level determination of selected sulfonylurea herbicides in wetland sediment by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry," *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, vol. 45, no. 1, pp. 11-24, 2010.
- [13] J. A. Elliott ve A. J. Cessna, "Transport of two sulfonylurea herbicides in runoff from border dyke irrigation," *J. Soil Water Conserv.*, vol. 65, no. 5, pp. 298-303, 2010.
- [14] J. Kreuger ve S. Adielsson, "Monitoring of sulfonylurea herbicides in stream water draining intensively cultivated areas in southern Sweden during a 9-year period (1998-2006)," Technical Report, Uppsala, Sweden, 2008.
- [15] A. C. Alexander, A. T. Luis, J. M. Culp, D. J. Baird ve A. J. Cessna, "Can nutrients mask community responses to insecticide mixtures?," *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 7, pp. 1085-1100, 2013.
- [16] J. D. Allan, "Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream

- ecosystems,” *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, vol. 35, pp. 257-284, 2004.
- [17] U.S. Environmental Protection Agency, “Toxicological Review of Ammonia,” Washington, DC, 2013.
- [18] U.S. Environmental Protection Agency, “Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria For Ammonia – Freshwater 2013.” U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology, p. 242, Washington, USA, 2013.
- [19] M. İnan, “Azot Gübreleme Yöntemleri,” Adıyaman, 2013.
- [20] Canadian Council of Ministers of the Environment, “Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Ammonia,” *Can. Environ. Qual. Guidel.*, 2010.
- [21] H. J. Kim, P. Koedrith ve Y. R. Seo, “Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 12261-12287, 2015.
- [22] N. N. Smirnov, *Physiology of the Cladocera*. London: Academic Press, 2013.
- [23] C. M. Flaherty ve S. I. Dodson, “Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction,” *Chemosphere*, vol. 61, no. 2, pp. 200-207, 2005.
- [24] P. K. S. Lam ve J. S. Gray, “The use of biomarkers in environmental monitoring programmes,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 46, no. 2, pp. 182-186, 2003.
- [25] M. G. Lionetto, R. Caricato, M. E. Giordano, M. F. Pascariello, L. Marinosci ve T. Schettino, “Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 46, no. 3, pp. 324-330, 2003.
- [26] R. Van der Oost, J. Beyer ve N. P. E. Vermeulen, “Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 13, no. 2, pp. 57-149, 2003.
- [27] A. Sarkar, D. Ray, A. N. Shrivastava ve S. Sarker, “Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring,” *Ecotoxicology*, vol. 15, no. 4, pp. 333-340, 2006.
- [28] M. Pohanka, “Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology,” *Biomed. Pap.*, vol. 155, no. 3, pp. 219-229, 2011.
- [29] O. Oktyabrsky ve G. Smirnova, “Redox regulation of cellular functions,” *Biochem.*, vol. 72, no. 2, pp. 132-145, 2007.
- [30] A. Görlach, K. Bertram, S. Hudecova ve O. Krizanova, “Calcium and ROS: A mutual interplay,” *Redox Biol.*, vol. 6, pp. 260-271, 2015.
- [31] N. H. P. Cnubben, I. M. C. M. Rietjens, H. Wortelboer, J. Van Zanden ve P. J. Van Bladeren, “The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 10, no. 4, pp. 141-152, 2001.
- [32] F. Ursini ve M. Maiorino, “Glutathione Peroxidases,” *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier Inc., pp. 224-228, 2004.
- [33] J. D. Hayes, J. U. Flanagan ve I. R. Jowsey, “Glutathione transferases,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, pp. 51-88, 2005.
- [34] R. Rinaldi, E. Eliasson, S. Swedmark ve R. Morgenstern, “Reactive

- intermediates and the dynamics of glutathione transferases,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 10, pp. 1053-1058, 2002.
- [35] V. B. Djordjević, “Free radicals in cell biology,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 237, pp. 57-89, 2004.
- [36] R. J. Schaur, W. Siems, N. Bresgen ve P. M. Eckl, “4-hydroxy-nonenal-a bioactive lipid peroxidation product,” *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 2247-2337, 2015.
- [37] G. Spiteller, “Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 122, no. 7, pp. 617-657, 2001.
- [38] D. Kültz, “Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 67, pp. 225–257, 2005.
- [39] R. Franco, R. Sánchez-Olea, E. M. Reyes-Reyes ve M. I. Panayiotidis, “Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois,” *Mut. Res.*, vol. 674, no. 1-2, pp. 3-22, 2009.
- [40] Q. Yuan, R. M. Ray ve L. R. Johnson, “Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome c,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 282, no. 6, pp. C1290-C1297, 2002.
- [41] D. Alvarez-Paggi L. Hannibal, M. A. Castro, S. Oviedo-Rouco, V. Demicheli, V. Tortora, F. Tomasina, R. Radi ve D. H. Murgida, “Multifunctional cytochrome c: Learning new tricks from an old dog,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 21, pp. 13382-13460, 2017.
- [42] M. A. Menze, G. Fortner, S. Nag ve S. C. Hand, “Mechanisms of apoptosis in Crustacea: What conditions induce versus suppress cell death?,” *Apoptosis*, vol. 15, no. 3, pp. 293-312, 2010.
- [43] J. Boyle, “Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D. ve Cox, M.,” *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 2005.
- [44] D. G. Hardie, “AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 774-785, 2007.
- [45] D. Koç, “Adıyaman Eğriçay’ının bentik diyatomeleleri ve bazı limnolojik parametrelerinin araştırılması,” Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, 2018.
- [46] O. Ieromina, W. J. G. M. Peijnenburg, G. R. De Snoo ve M. G. Vijver, “Population responses of *Daphnia magna*, *Chydorus sphaericus* and *Asellus aquaticus* in pesticide contaminated ditches around bulb fields,” *Environ. Pollut.*, vol. 192, pp. 196-203, 2014.
- [47] M. Iordache ve I. Borza, “Study of the acute toxicity of some pesticides on earthworms *Eisenia foetida* (Savigny, 1826),” *Res. J. Agric. Sci.*, vol. 43, no. 4, pp. 95–100, 2011.
- [48] J. Chen, M. Saleem, C. Wang, W. Liang ve Q. Zhang, “Individual and combined effects of herbicide tribenuron-methyl and fungicide tebuconazole on soil earthworm *Eisenia fetida*,” *Sci. Rep.*, vol. 8, article no. 2967, 2018.
- [49] B. Öztürk, E. Şaş, M. Alsan, S. Güneş, C. Akbulut ve N. Yön, “Histological effects of tribenuron methyl on gill tissue of zebrafish (*Danio rerio*),” in *XXIV International Symposium on Morphological Sciences*, İstanbul, Turkey, p.

- S143, 2015.
- [50] B. Öztürk, E. Şaş, M. Alsaran, S. Güneş, C. Akbulut ve N. Yön, "Histological effects of tribenuron methyl on ovary tissue of zebrafish (*Danio rerio*)," in *XXIV International Symposium on Morphological Sciences*, İstanbul, Turkey, pp. S143–S144, 2015.
- [51] H. Raun Andersen, A. M. Vinggaard, T. Høj Rasmussen, I. M. Gjermansen ve E. Cecilie Bonefeld-Jørgensen, "Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 179, no. 1, pp. 1-12, 2002.
- [52] M. Birkhøj, C. Nellemann, K. Jarfelt, H. Jacobsen, H. R. Andersen, M. Dalgaard ve A. M. Vinggaard, "The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 201, no. 1, pp. 10-20, 2004.
- [53] D. Braconi, G. Bernardini, M. Fiorani, C. Azzolini, B. Marzocchi, F. Proietti, G. Collodel ve A. Santucci, "Oxidative damage induced by herbicides is mediated by thiol oxidation and hydroperoxides production," *Free Radic. Res.*, vol. 44, no. 8, pp. 891-906, 2010.
- [54] M. R. Pinto, M. N. Lucena, R. O. Faleiros, E. A. Almeida, J. C. McNamara ve F. A. Leone, "Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 170, pp. 13-23, 2016.
- [55] B. Ching, S. F. Chew, W. P. Wong ve Y. K. Ip, "Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 95, no. 3, pp. 203-212, 2009.
- [56] W. Wang, S. Yang, C. Wang, L. Shi, H. Guo ve S. Chan, "Gill transcriptomes reveal involvement of cytoskeleton remodeling and immune defense in ammonia stress response in the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 71, pp. 319-328, 2017.
- [57] F. M. Dutra, M. Rönnau, D. Sponchiado, S. C. Forneck, C. A. Freire ve E. L. C. Ballester, "Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite," *Aquat. Toxicol.*, vol. 187, pp. 115-123, 2017.
- [58] H. Ren, J. Li, J. Li, P. Liu, Z. Liang ve J. Wu, "Transcript profiles of mitochondrial and cytoplasmic manganese superoxide dismutases in *Exopalaemon carinicauda* under ammonia stress," *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, vol. 33, no. 3, pp. 714-724, 2015.
- [59] K. Lyu, X. Zhu, Q. Wang, Y. Chen ve Z. Yang, "Copper/zinc superoxide dismutase from the Cladoceran *Daphnia magna*: molecular cloning and expression in response to different acute environmental stressors," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 15, pp. 8887-8893, 2013.
- [60] E. Kosenko, Y. Kaminsky, E. Grau, M. D. Miñana, G. Marcaida, S. Grisolia ve V. Felipo, "Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺, K⁺- ATPase," *J. Neurochem.*, vol. 63, no. 6, pp. 2172-2178, 1994.
- [61] E. Kosenko, N. Venediktova, Y. Kaminsky, C. Montoliu ve V. Felipo, "Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication *in vivo*,"

- Brain Res.*, vol. 981, no. 1-2, pp. 193-200, 2003.
- [62] V. V. Teplova, Z. I. Andreeva-Kovalevskaya, E. V. Sineva ve A. S. Solonin, "Quick assessment of cytotoxins effect on *Daphnia magna* using *in vivo* fluorescence microscopy," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, no. 6, 1345-1348, 2010.
- [63] M. C. Stensberg, R. Madangopal, G. Yale, Q. Wei, H. Ochoa-Acuña, A. Wei, E. S. McLamore, J. Rickus, D. M. Porterfield ve M. S. Sepúlveda, "Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 8, pp. 833-842, 2014.
- [64] E. V. Sineva, Z. I., Andreeva-Kovalevskaya, A. M. Shadrin, Y. L. Gerasimov, V. I. Ternovsky, V. V. Teplova, T. V. Yurkova ve A. S. Solonin, "Expression of *Bacillus cereus* hemolysin II in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 299, no. 1, pp. 110-119, 2009.
- [65] A. Włodarczyk, L. Sonakowska, K. Kamińska, A. Marchewka, G. Wilczek, P. Wilczek, S. Student ve M. Rost-Roszkowska, "The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca)," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, pp. e0173563, 2017.
- [66] M. M. H. Lauer, C. B. De Oliveira, N. L. I. Yano ve A. Bianchini, "Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 156, no. 3-4, pp. 140-147, 2012.
- [67] L. Sonakowska, A. Włodarczyk, G. Wilczek, P. Wilczek, S. Student ve M. M. Rost-Roszkowska, "Cell death in the epithelia of the intestine and hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca)," *PLoS One*, vol. 11, no. 2, pp. e0147582, 2016.
- [68] K. V Rama Rao, A. R. Jayakumar ve D. M. Norenberg, "Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition," *Metab. Brain Dis.*, vol. 18, no. 2, pp. 113-127, 2003.
- [69] G. Bai, K. V Rama Rao, C. R. Murthy, K. S. Panickar, A. R. Jayakumar ve M. D. Norenberg, "Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes," *J. Neurosci. Res.*, vol. 66, no. 5, pp. 981-991, 2001.
- [70] M. Frederich, M. R. O'Rourke, N. B. Furey ve J. A. Jost, "AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress," *J. Exp. Biol.*, vol. 212, no. Pt 5, pp. 722-730, 2009.
- [71] C. G. Goodchild, M. Frederich ve S. I. Zeeman, "Is altered behavior linked to cellular energy regulation in a freshwater mussel (*Elliptio complanata*) exposed to triclosan?," *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 179, pp. 150-157, 2016.
- [72] C. G. Goodchild, M. Frederich ve S. I. Zeeman, "AMP-activated protein kinase is a biomarker of energetic status in freshwater mussels exposed to municipal effluents," *Sci. Total Environ.*, vol. 512-513, pp. 201-209, 2015.
- [73] I. Pinz, D. Perry ve M. Frederich, "AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress,"

- Bull.*, vol. 44, pp. 31-32, 2005.
- [74] J. Jeon, A. Kretschmann, B. I. Escher ve J. Hollender, "Characterization of acetylcholinesterase inhibition and energy allocation in *Daphnia magna* exposed to carbaryl," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 98, pp. 28-35, 2013.
- [75] A. Jemec, D. Drobne, T. Tišler, P. Trebše, M. Roš ve K. Sepčić, "The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 144, no. 4, pp. 303-309, 2007.
- [76] S. Li ve Y. Tan, "Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos," *J. Environ. Sci.*, vol. 23, no. 5, pp. 852-859, 2011.
- [77] R. Rukmini Devi ve C. Murty, "Ammonia-induced alterations in the activities of synaptosomal cholinesterases of rat brain under *in vitro* and *in vivo* conditions," *Neurosci. Lett.*, vol. 159, pp. 131-134, 1993.
- [78] E. Kosenko, Y. Kaminsky, M. D. Miñana, S. Grisolia ve V. Felipo, "High ammonia levels decrease brain acetylcholinesterase activity both *in vivo* and *in vitro*," *Mol. Chem. Neuropathol.*, vol. 22, no. 3, pp. 177-184, 1994.
- [79] ASTM International, "Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians," West Conshohocken, PA, USA, E 729 – 96, 2002.
- [80] OECD/OCDE, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*. OECD Library, 2004.
- [81] US Environmental Protection Agency, "US EPA: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms," *Environ. Prot.*, 2002.
- [82] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation ve W. E. Federation, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," *Stand. Methods*, 1999.
- [83] S. Başalan, "Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin *Daphnia magna*'da pro-oksidatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması," Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman, 2018.
- [84] T. Haap, R. Triebkorn, and H. R. Köhler, "Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction," *Chemosphere*, vol. 73, no. 3, pp. 353-359, 2008.
- [85] US Environmental Protection Agency, "Aqueous ammonia equilibrium - tabulation of percent un-ionized ammonia," vol. EPA-600/3-79-091, p. 428, Duluth, MN, USA, 1979.
- [86] T. Källqvist ve A. Svenson, "Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta," *Water Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 477-484, 2003.
- [87] E. Beutler, *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd ed. New York: Grune and Starton, 1984.
- [88] W. H. Habig, M. J. Pabst ve W. B. Jakoby, "Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974.
- [89] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres ve R. M. Featherstone, "A new and

- rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88-95, 1961.
- [90] E. D. Wills, “Mechanism of lipoperoxide formation in animal tissues,” *Biochem. J.*, vol. 99, no. 3, pp. 667-676, 1966.
- [91] C. M. Stoscheck, “Quantitation of protein,” *Methods Enzymol.*, vol. 182, pp. 50-68, 1990.
- [92] K. Smbloğlu ve V. Smbloğlu, *Biyoistatistik*, 17th ed. Ankara: Hatiboğlu Yayıncılık, 2016.
- [93] F. M. Gersich ve D. L. Hopkins, “Site- specific acute and chronic toxicity of ammonia to *Daphnia magna* Straus,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 5, no. 5, pp. 443-447, 1986.
- [94] K. Reinbold ve S. Pescitelli, “Effects of Exposure to Ammonia on Sensitive Life Stages of Aquatic Organisms,” Illionis Natural History Survey, Aquatic Ecology Technical Report, 1982.
- [95] F. Xiang, W. Yang, Y. Chen ve Z. Yang, “Acute toxicity of nitrite and ammonia to *Daphnia similoides* of different developmental stages: Using the modified gaussian model to describe,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 84, no. 6, pp. 708-711, 2010.
- [96] K. Lyu, H. Cao, R. Chen, Q. Wang ve Z. Yang, “Combined effects of hypoxia and ammonia to *Daphnia similis* estimated with life-history traits,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 5379-5387, 2013.
- [97] H. Miyakawa, M. Sato, J. K. Colbourne ve T. Iguchi, “Ionotropic glutamate receptors mediate inducible defense in the water flea *Daphnia pulex*,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. e0121324, 2015.
- [98] S. M. Rothman ve J. W. Olney, “Excitotoxicity and NMDA receptor,” *TINS*, vol. 10, no. 7, pp. 299–302, 1987.
- [99] W. Paschen, “Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved?,” in *Brain Res. Bull.*, vol. 53, no. 4, pp. 409–413, 2000.
- [100] D. Milatovic, R. C. Gupta ve M. Aschner, “Anticholinesterase toxicity and oxidative stress,” *Sci. World J.*, vol. 6, pp. 295-310, 2006.
- [101] S. C. Bondy ve C. P. LeBel, “The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 633-642, 1993.
- [102] M. D. Brand, C. Affourtit, T. C. Esteves, K. Green, A. J. Lambert, S. Miwa, J. L. Pakay ve N. Parker “Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 37, no. 6, pp. 755-767, 2004.
- [103] H. M. Shen, C. F. Yang, W. X. Ding, J. Liu ve C. N. Ong, “Superoxide radical-initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated HepG2 cells: Mitochondria serve as the main target,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 30, no. 1, pp. 9-21, 2001.
- [104] E. Kosenko, Y. Kaminski, O. Lopata, N. Muravyov ve V. Felipo, “Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no. 11-12, pp. 1369-1374, 1999.
- [105] M. A. Menze, K. Hutchinson, S. M. Laborde ve S. C. Hand, “Mitochondrial

- permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 289, no. 1, R68-R76, 2005.
- [106] C. Konrad, “Investigation of the Ca²⁺-inducible mitochondrial permeability transition pore and Bongkrekate sensitivity in distantly related animal species,” Doktora Tezi, Semmelweis University, 2014.
- [107] E. Sancho, M. J. Villarroel, E. Andreu ve M. D. Ferrando, “Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole,” *Chemosphere*, vol. 74, no. 9, pp. 1171-1178, 2009.
- [108] L. D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott ve D. B. Zorov, “Mitochondrial membrane potential,” *Anal. Biochem.*, vol. 552, pp. 50-59, 2018.
- [109] X. Y. Chen, J. Z. Shao, L. X. Xiang ve X. M. Liu, “Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line,” *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 142, no. 1-2, pp. 36-45, 2006.
- [110] L. M. Harder, J. Bunkenborg ve J. S. Andersen, “Inducing autophagy a comparative phosphoproteomic study of the cellular response to ammonia and rapamycin,” *Autophagy*, vol. 10, no. 2, pp. 339-355, 2014.
- [111] L. Hertz ve G. Kala, “Energy metabolism in brain cells: Effects of elevated ammonia concentrations,” *Metabolic Brain Dis.*, vol. 22, no. 3-4, pp. 199-218, 2007.
- [112] P. Samanta, S. Pal, A. Ku. Mukherjee, T. Senapati, D. Kole ve A. R. Ghosh, “Gastrointestinal pathology in freshwater fish, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) under Almix exposure,” *J. Environ. Anal. Toxicol.*, vol. 6, no. 5, p. 399, 2016.
- [113] P. Samanta, N. Bandyopadhyay, S. Pal, A. K. Mukherjee ve A. R. Ghosh, “Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1%+chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 122, pp. 360-367, 2015.
- [114] A. Jurado, M. Fernandes, R. Videira, F. Peixoto ve J. Vicente, “Herbicides: The Face and the Reverse of the Coin. An *in vitro* Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms,” in *Herbicides and Environment*, A. Kortekamp, Ed. London: InTech Open, p. 44, 2011.
- [115] R. Fato, C. Bergamini, M. Bortolus, A. L. Maniero, S. Leoni, T. Ohnishi ve G. Lenaz, “Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production of reactive oxygen species,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1787, no. 5, pp. 384-92, 2009.
- [116] E. Gottlieb, S. M. Armour, M. H. Harris ve C. B. Thompson, “Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis,” *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 6, pp. 709-717, 2003.
- [117] V. P. Skulachev, “Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades,” *FEBS Lett.*, vol. 423, no. 3, pp. 275-280, 1998.
- [118] K. V. Rama Rao, Y. R. Mawal ve I. A. Qureshi, “Progressive decrease of

- cerebral cytochrome C oxidase activity in sparse-fur mice: Role of acetyl-L-carnitine in restoring the ammonia-induced cerebral energy depletion,” *Neurosci. Lett.*, vol. 224, no. 2, pp. 83-86, 1997.
- [119] B. Hindfelt, F. Plum ve T. E. Duffy, “Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts,” *J. Clin. Invest.*, vol. 59, no. 3, pp. 386-396, 1977.
- [120] D. W. Nicholson ve W. Neupert, “Import of cytochrome c into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome c.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 12, pp. 4340-4344, 1989.
- [121] D. Liu, J. Yang, Y. Li, M. Zhang ve L. Wang, “Cd-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, pp. e68770, 2013.
- [122] J. F. O’Toole, H. V. Patel, C. J. Naples, H. Fujioka ve C. L. Hoppel, “Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria,” *Biochem. J.*, vol. 427, no. 1, pp. 105-112, 2010.
- [123] P. M. Craig, C. D. Moyes ve C. M. R. LeMoine, “Sensing and responding to energetic stress: Evolution of the AMPK network,” *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 224, pp. 156-169, 2018.
- [124] S. Sun, Z. Gu, H. Fu, J. Zhu, X. Ge ve X. Wu, “Hypoxia induces changes in AMP-activated protein kinase activity and energy metabolism in muscle tissue of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*,” *Front. Physiol.*, vol. 9, no. 751, pp. 1-13, 2018.
- [125] D. Dos Santos Miron, M. Crestani, M. Rosa Shettinger, V. Maria Morsch, B. Baldisserotto, M. Angel Tierno, G. Moraes ve V. L. Vieira, “Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae),” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 61, no. 3, pp. 398-403, 2005.
- [126] B. S. Moraes, V. L. Loro, L. Glusczak, A. Pretto, C. Menezes, E. Marchezan ve S. de Oliveira Machado, “Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*),” *Chemosphere*, vol. 68, no. 8, pp. 1597-1601, 2007.
- [127] A. Pretto, V. L. Loro, C. Menezes, B. S. Moraes, G. B. Reimche, R. Zanella ve L. A. de Ávila, “Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, no. 3, pp. 336-341, 2011.
- [128] B. Sadasivudu, C. R. K. Murthy, G. N. Rao ve M. Swamy, “Studies on acetylcholinesterase and gamma- glutamyltranspeptidase in mouse brain in ammonia toxicity,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 127-134, 1983.
- [129] R. L. Cooper, J. L. Winslow, C. K. Govind ve H. L. Atwood, “Synaptic structural complexity as a factor enhancing probability of calcium-mediated transmitter release,” *J. Neurophysiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 2451-2466, 1996.

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Arif ÇAKMAK
Doğum Yeri : Gölbaşı - Adıyaman
Doğum Tarihi : 25.03.1973
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : arifcakmak02@gmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyoloji	Adıyaman	
Lisans	Biyoloji	Cumhuriyet	1995
Lise		Adıyaman Lisesi	1990

Yayımlar