

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PESTİSİTLERİN TROFİK TRANSFER SONUCU ORTAYA ÇIKAN
ETKİLERİNİN İKİ TÜRDEN OLUŞAN (*Chlorella vulgaris* ve *Daphnia magna*)
TATLI SU BESİN ZİNCİRİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ramazan TANER

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

AĞUSTOS 2021

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PESTİSİTLERİN TROFİK TRANSFER SONUCU ORTAYA ÇIKAN
ETKİLERİNİN İKİ TÜRDEN OLUŞAN (*Chlorella vulgaris* ve *Daphnia magna*)
TATLI SU BESİN ZİNCİRİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ramazan TANER
(36173611033)

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

AĞUSTOS 2021

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgmeden beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye,

Çalışmalarında laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Çevre Toksikolojisi Laboratuvarı sorumlusu hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e,

Çalışma boyunca bana laboratuvar çalışmalarında destek olan Dr. Duygu ÖZHAN TURHAN'a,

Ayrıca çalışmalarında yardımını esirgemeyen Nazan BATTALOĞLU'na

Çalışmalarında ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu çalışmalarım süresince de benden her türlü desteklerini esirgemeyen aileme,

Tezin uygulama aşamasında FYL-2019-1828 no'lu proje ile vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Doktora veya yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘‘Tروفك Transfer Sonucu Ortaya ıkan Etkilerinin İki Türden Oluşan (*Chlorella vulgaris* ve *Daphnia magna*) Tatlı Su Besin Zincirinde Değerlendirilmesi’’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dıőecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütun kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ramazan TANER



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER VE ÖNSÖZ.....	i
ONUR SÖZÜ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Biyoakümülyasyon.....	4
1.1.1 Biyokonsantrasyon.....	5
1.1.2 Biyomagnifikasyon.....	5
1.1.3 Biyotransformasyon.....	6
1.2 Test Organizmaları.....	7
1.2.1 <i>Daphnia magna</i>	7
1.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	9
1.3 Toksikite Test edilen Pestisitler.....	12
1.3.1 Glifosat Bazlı Herbisit (GBH)	12
1.3.2 Trifloksistrobin Bazlı Fungisit (TBF).....	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1 Kimyasallar ve Çözeltiler.....	17
3.2 Test Organizmaları.....	17
3.3 Test Edilen Pestisitlerin <i>D. magna</i> için LC ₅₀ Düzeylerinin Belirlenmesi.....	17
3.4 Test edilen Pestisitlerin Farklı Ortamlarda <i>D. magna</i> Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	18
3.4.1 <i>Chlorella vulgaris</i> kültürlerinin hazırlanması.....	18
3.4.2 Doğrudan toksisite testleri.....	19
3.4.3 Dolaylı toksisite testleri.....	20
3.5 <i>D. magna</i> ile İlgili Morfolojik Ölçümler.....	20
3.6 Biyokimyasal Analizler.....	21
3.6.1 Tüm vücut homojenatlarının hazırlanması.....	21
3.6.2 GST aktivitesi.....	21
3.6.3 GR aktivitesi.....	22
3.6.4 CAT aktivitesi.....	22
3.6.5 AChE aktivitesi.....	22
3.6.6 CaE aktivitesi.....	22
3.6.7 GSH _{red} düzeyi.....	23
3.6.8 Toplam protein miktarı tayini.....	23
3.7 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1 Test Edilen Pestisitlerin <i>D. magna</i> için LC ₅₀ Düzeyleri.....	25
4.2 <i>D. magna</i> Bireylerinin Pestisitlere Farklı Ortamlarda Maruz Bırakılması.....	27
4.2.1 <i>D. magna</i> neonatlarının farklı ortamlarda, pestisitlere direkt maruz bırakılması.....	28
4.2.2 <i>D. magna</i> neonatlarının farklı ortamlarda, pestisitlere dolaylı maruz bırakılması.....	30

4.2.3	<i>D. magna</i> erginlerinin biyokimyasal analizler için farklı ortamlarda, pestisitlere direkt maruz bırakılması.....	32
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	36
	KAYNAKLAR	44
	ÖZGEÇMİŞ	51



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	<i>Daphnia magna</i> 'nın sistematikteki yeri.....	9
Çizelge 1.2	<i>Chlorella vulgaris</i> 'in sistematikteki yeri.....	10
Çizelge 4.1	Test edilen pestisitlerin <i>D. magna</i> neonatlarında LC ₅₀ düzeyleri.....	25
Çizelge 4.2	GBH'ye maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite ve gelişim verileri.....	26
Çizelge 4.3	TBF'ye maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite ve gelişim verileri.....	27
Çizelge 4.4	<i>D. magna</i> neonat ve erginlerinin farklı ortamlarda pestisitlere maruz bırakma deneylerinde ortama ilave edilen <i>Chlorella</i> kültürlerinin özellikleri.....	28
Çizelge 4.5	GBH'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite	29
Çizelge 4.6	TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite.....	30
Çizelge 4.7.	GBH'ye farklı ortamlarda, dolaylı maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite	31
Çizelge 4.8.	TBF'ye farklı ortamlarda, dolaylı maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında zamana bağlı toksisite.....	32
Çizelge 4.9.	GBH'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> erginlerinde biyobelirteç düzeyleri.....	34
Çizelge 4.10	TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> erginlerinde biyobelirteç düzeyleri.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Sucul organizmalar için biyoakümülyasyon modeli.....	5
Şekil 1.2	Biyolojik yükseltgenme örneği: Ontario Gölü'ndeki poliklorlu bifenillerin (PCB'ler) gıda ağı biyomagnifikasyonu	6
Şekil 1.3	Cladocera'da (Branchiopoda'da) vücut organizasyonu.....	8
Şekil 1.4	<i>C. vulgaris'</i> in farklı organellerini temsil eden şematik yapısı	11
Şekil 1.5	<i>C. vulgaris'</i> te üreme evreleri ve yavru hücre duvarının oluşumu.....	11
Şekil 1.6	Test edilen pestisitlerin ticari formülyasyonlarda bulunan aktif maddelerin moleköl yapıları.....	12
Şekil 3.1	Pestisitlerin farklı ortamlarda <i>D. magna</i> üzerindeki etkilerinin belirlenmesi yönelik çalışmalar için maruz bırakma planı.....	19
Şekil 3.2	Toksite testleri sonunda hayatta kalan <i>D. magna</i> bireylerinde ölçölen morfolojik parametreler.....	20
Şekil 5.1	GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> bireylerinde letalite düzeyleri.....	37
Şekil 5.2	TBF'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> bireylerinde letalite düzeyleri	37
Şekil 5.3	GBH'ye 48 saat süreyle direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında boy uzunluğu	38
Şekil 5.4	GBH'ye 48 saat süreyle dolaylı maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında boy uzunluğu	39
Şekil 5.5	TBF'ye 48 saat süreyle direkt maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında boy uzunluğu.....	40
Şekil 5.6	TBF'ye 48 saat süreyle dolaylı maruz bırakılan <i>D. magna</i> neonatlarında boy uzunluğu.....	40
Şekil 5.7	GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> erginlerinde CAT aktivitesi.....	41
Şekil 5.8	GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> erginlerinde GST aktivitesi.....	42
Şekil 5.9	TBF'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> erginlerinde CAT aktivitesi.....	43

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DTNB	5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
TBF	Trifloksistrobin Bazlı Fungisit
GBH	Glifosat Bazlı Herbisit
GLY	Glifosat
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH_{red}	Redükte glutasyon
GS-SG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
LC₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
LPO	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
NADP⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
tGSH	Toplam glutasyon
USEPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PESTİSİTLERİN TROFİK TRANSFER SONUCU ORTAYA ÇIKAN ETKİLERİNİN İKİ TÜRDEN OLUŞAN (*Chlorella vulgaris* ve *Daphnia magna*) TATLI SU BESİN ZİNCİRİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Ramazan TANER

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

51+ix sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

Pestisitler uygulandıkları alanda bulunan bütün organizmaları farklı düzeylerde de olsa doğrudan etkilerken maruz kalan organizmalarda birikebilirler, biyotransforme olarak daha toksik metabolitlere dönüşebilirler ve/veya canlı etkileşimleri ve besin zinciri yoluyla canlıdan canlıya transfer olabilirler. Bu çalışmada glifosat bazlı bir herbisit (GBH) ve trifloksistrobin bazlı bir fungusite (TBF) besin zinciri yolu ile maruz kalmanın *Daphnia magna* üzerindeki etkileri, biyokimyasal ve morfolojik belirteçler kullanılarak değerlendirildi. Çalışmada tatlı su ekosistemlerinin üreticiler düzeyini temsil eden bir alg türü olan *Chlorella vulgaris* ve birincil tüketiciler düzeyini temsil eden su piresi, *Daphniamagna* test organizması olarak seçildi. Hem ortalama letal konsantrasyon (LC₅₀) belirleme çalışmalarında hem de farklı ortamların (beslenmeyen, karışım yemle beslenen ve *Chlorella* ile beslenen) pestisit toksisitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, maruz bırakılan *D. magna* bireylerinin letalite düzeyleri, boy, en ve spin uzunlukları belirlendi. Ayrıca farklı ortamlarda pestisitlere maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde glutatyon S-transferaz, glutatyon reduktaz, katalaz (CAT), karboksilesteraz, asetilkolinesteraz aktiviteleri ve redükte glutatyon düzeyi ölçüldü. GBH ve TBF'nin *D. magna* için 48 saatlik LC₅₀ değerleri sırasıyla 253.1 mg/L ve 20.7 µg/L olarak belirlendi. Farklı ortamların pestisit toksisitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiğinde çalışmalarda hem GBH ve hem de TBF için letalitenin konsantrasyon ilişkili olarak arttığı saptandı. Benzer şekilde her iki pestisit de CAT aktivitesinde artışa neden oldu. Letalitenin ve CAT aktivitesinin birlikte artması oksidatif stresle mücadele mekanizması olarak düşünülmektedir. Diğer yandan, her iki pestisit için de *Chlorella* ile beslenen gruplarda letaliteye benzer şekilde CAT aktivitesinin de daha az artış göstermesi *Chlorella* ile beslemenin oksidatif stres ve toksik etkiyi azalttığı sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Pestisit, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, besin zinciri, toksisite, biyobelirteç

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF THE EFFECTS OF PESTICIDES RESULTING FROM TROPHIC TRANSFER IN FRESHWATER FEED CHAIN CONSISTING OF TWO SPECIES (*Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*)

Ramazan TANER

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Biology

51+ix pages

2021

Supervisor: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

While pesticides directly affect all organisms in the area where they are applied, although at different levels, they can accumulate in the exposed organisms, turn into more toxic metabolites as biotransform, and/or be transferred from one organism to another through interactions and food chain. In this study, the effects of food chain exposure to a glyphosate-based herbicide (GBH) and a trifloxystrobin-based fungicide (TBF) on *Daphnia magna* were evaluated using biochemical and morphological markers. In the study, *Chlorella vulgaris*, an alga representing the producers level of freshwater ecosystems, and *Daphnia magna*, representing the primary consumers level, were selected as the test organism. Lethality, height, width, and spin lengths of exposed *D. magna* individuals were determined both in studies to determine the mean lethal concentration (LC₅₀) and in studies evaluating the effects of different environments (non-fed and mixed feed and fed with *Chlorella*) on pesticide toxicity. In addition, glutathione S-transferase, glutathione reductase, catalase (CAT), carboxylesterase, acetylcholinesterase activities, and reduced glutathione levels were measured in *D. magna* adults exposed to pesticides in different environments. 48 hour LC₅₀ values of GBH and TBF for *D. magna* were determined as 253.1 mg/L and 20.7 µg/L, respectively. When the effects of different environments on pesticide toxicity were evaluated, it was found that lethality increased in relation to concentration for both GBH and TBF in studies. Similarly, both pesticides caused an increase in CAT activity. The increase in lethality and CAT activity together is thought to be a mechanism to combat oxidative stress. On the other hand, for both pesticides, the CAT activity showed less increase in the groups fed with *Chlorella*, similar to lethality, and it can be concluded that feeding with *Chlorella* reduced the oxidative stress and toxic effect.

Keywords: Pesticide, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, food chain, toxicity, biomarker

1. GİRİŞ

ABD Çevre Koruma Ajansına göre (USEPA) pestisit, herhangi bir zararlının engellenmesi, yok edilmesi, uzaklaştırılması veya azaltılması için kullanılan kimyasal veya kimyasal karışımı olarak tanımlanmaktadır (Casarett ve diğ, 2001). Çok geniş bir spektruma sahip olan pestisitler tarım alanlarındaki çeşitli zararlı organizmaların kontrolünde kullanılmakta ve bu yolla her yıl milyonlarca ton tahıl ürünü kurtarılmaktadır (Gupta, 2006). Ancak pestisitlerin çoğunluğu hedef gözetmeksizin bütün canlılar üzerinde olumsuz etkilere neden olabildiklerinden, bilim adamları bir taraftan zararlılar dışındaki fauna ve flora üzerinde olumsuz etkiye yol açmayacak özgül pestisitlerin üretilmesi için çaba harcarken diğer taraftan halihazırda kullanılan pestisitlerin ekosistem üzerine olumsuz etkilerini, hedef olmayan organizmalar için toksik etki mekanizmalarını ve zararlı etkilerin iyileştirilmesi yönünde çalışmalar yürütmektedirler (Gupta, 2006). Örneğin, DDT ve diğer organoklorlu pestisitler kullanıma sunulduklarında zararlı böceklerle mücadelede bir devrim yaşandığı düşünülmüş ancak çevrede uzun süre kalıcı oldukları ve kuşkuya yer bırakmayan bir şekilde ekotoksik olduklarının tespit edilmesi bu pestisitlerin kullanımının yasaklanmasını ve yerini, aşamalı olarak doğada daha hızlı yıkılan organofosfat (OP) ve karbamat bileşiklerin almasına yol açmıştır (Bonfanti ve diğ, 2004; Marrs ve Ballantyne, 2004). Nispeten daha yeni olan ve doğada görece daha hızlı yıkıma uğrayan yeni nesil pestisitlerin ise metabolitlerinin kalıcı olması, biyobirikimleri veya hedef olmayan organizmalar üzerine etkilerinin belirlenmesi onların da kullanımlarının sınırlandırılmasına ve yasaklanmasına neden olmuştur. Belirtilen nedenlerden kaynaklı olarak pestisitlerin ekosistem bileşenleri ve etkileşimleri üzerine direkt ve dolaylı etkilerinin hızlı ve etkili olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Tatlı su ekosistemleri birçok insan kaynaklı toksik kimyasal madde ile kirlenmektedir. İnsan kaynaklı kimyasal maddeler arasında, pestisitler en ciddi sorunlara neden olanlar arasındadır, çünkü bu maddeler organizmaları (hem tarım zararlısı hedef organizmaları hem de diğer hedef olmayanları) öldürmek için özellikle tasarlanmışlardır ve kasıtlı olarak doğal ortama salınırlar (Hanazato, 2001). Bu çalışma kapsamında test edilen pestisitlerden biri herbisit diğeri ise fungusittir. Herbisitler, tarımda uygulanan tüm

pestisitlerin %60'ından fazlasını oluşturan yaygın olarak kullanılan pestisit sınıfıdır. Herbisitler tarım alanlarında istenmeyen bitkileri öldürmek üzere tasarlandığından, karasal bitkilerin sudaki emsali makrofit ve mikroalgler üzerinde de yıkıcı etkilere neden olmaktadır (Vidal ve diğ, 2012). Fungisitler ise bitkilerde hastalıklara neden olarak tarımsal mahsule zarar veren mantarları kontrol altına almak için kullanılmaktadır. Fungisitler çoğunlukla sterol biyosentezi, enerji üretimi, amino asit sentezi veya hücre bölünmesini inhibe ederek etki gösterirler. Bu pestisitler mantar patojenlerini kontrol etmek için tasarlanırken, etki şekilleri mantarlara özgü değildir. Çünkü enerji üretimi, hücre bölünmesi süreçleri ve sülfidril grubu içeren enzimler diğer organizmalarda da büyük oranda korunmuştur. Bu sebeple, belirtilen süreçleri veya fonksiyonel grupları hedef alan mantar öldürücüler çok çeşitli organizmalar için toksik olmaktadır (Maltby ve diğ, 2009). Bununla birlikte, her iki grup pestisit de sucul ekosistem organizmalarına düşük konsantrasyonlarda bile tehlikeli olabilmektedir. Yoğun tarım faaliyetlerinin doğal su sistemlerine yakın verimli topraklarda yapıldığı göz önüne alındığında, akuatik biyota yüzey sularından gelen pestisit girdilerine, toprak yüzeyinde yağışlarla yıkanma, havadan püskürtme, kazara dökülme ve sızıntı dahil olmak üzere çeşitli yollarla maruz kalma eğilimindedir. Bu nedenle, pestisitlerin hedef dışı, sucul organizmalar üzerindeki toksisitesini anlamak önemlidir (Vidal ve diğ, 2012).

Her ne kadar suda yaşayan türler için pestisitlere maruz kalmanın baskın yolu su sisteminde doğrudan maruz kalma şeklinde olsa da, organizmalar beslenme yoluyla da toksik pestisit düzeylerine maruz kalabilirler. Sucul ekosistemlerin çoğunda, fitoplankton hem omurgasız hem de omurgalı olan birincil tüketicilerin hayatta kalması için enerji sağlayan kilit bir gruptur. Birincil tüketiciler biyosentetik reaksiyonlar, büyüme, üreme ve onarım için besinlerindeki organik ve inorganik bileşikleri asimile ederler, ancak aynı zamanda, kirleticilerin besin zincirinin daha yüksek trofik seviyelerine taşınmasına yol açarlar. Tatlı su besin zincirindeki birincil tüketicilerden olan *Daphnia* cinsi su pireleri, fitoplankton üzerindeki yüksek otlanma aktiviteleri nedeniyle, ötrofikasyonun kontrolünde önemli bileşenlerdir (da Silva ve diğ, 2016).

Bu çalışmada pestisitlerin trofik transferle etkilerinin değerlendirilmesi için, sucul ekosistemlerin ana bileşenlerinden olan mikroalglerden *Chlorella vulgaris* “üretici” olarak seçilmiştir. Mikroalglerle beslendiği için daha yüksek bir trofik seviyede bulunan, küçük boyutlu, kısa yaşam döngüsü, kolay kullanım ve yemleme özelliklerine sahip bir sucul kabuklu olan *Daphnia magna* ise birincil tüketici olarak seçilmiştir. Bu organizmalar ağır

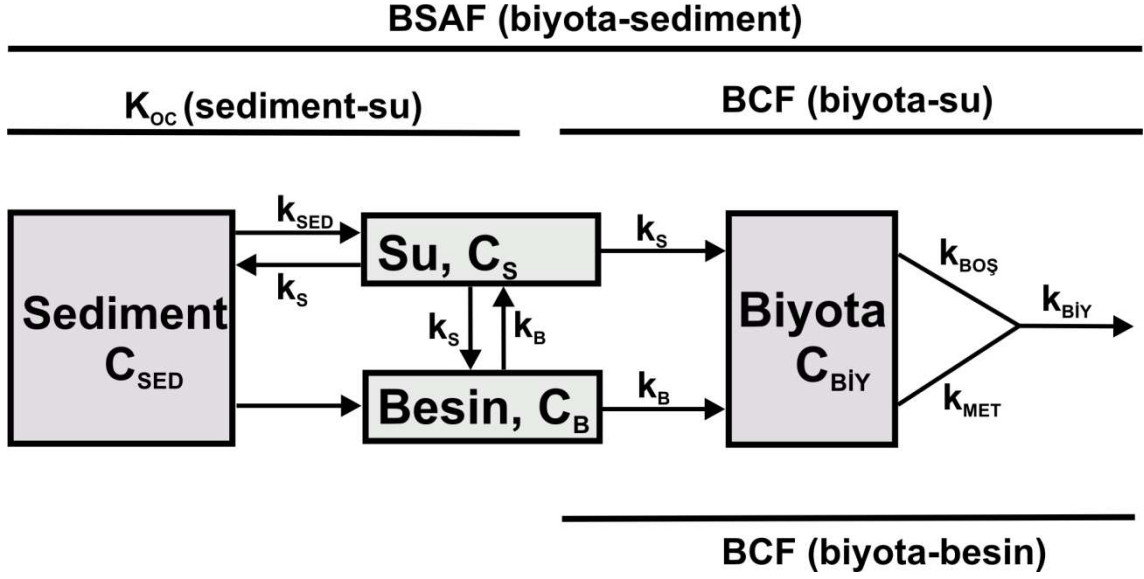
metaller, nanopartiküller gibi çok sayıda maddenin trofik düzeydeki etkilerini belirlemede kullanılmaktadır. Mikroalgler, besin zincirinin üreticileri temsil ettiklerinden, bu organizmalar üzerindeki bir etki, daha yüksek trofik seviyeleri etkileyebilir; buna göre, çevresel etkilerin öngörülmesi için temel bilgiler sağlarlar. Ek olarak, mikroalgler, tatlı su ekosistemlerinde yaygın olarak tespit edilen çok sayıda kirleticiye karşı oldukça hassastır ve bilimsel araştırmalarda kullanımları etik bir ikilem oluşturmaz (Gosset ve diğ, 2018). Diğer yandan, birincil tüketici olan *D. magna*, pestisitlerin uygulandığı tarımsal alanlarda veya bu alanların çevresindeki küçük su kütlelerinde yaşadıklarından pestisit etkilerini doğrudan maruz kalan organizmalardır. Pestisitlere karşı hassas olduğu bilinen *D. magna*, sudaki risk değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Barata ve diğ, 2004). *D. magna*, laboratuvar koşullarında kolayca kültüre edilebilir, bu nedenle toksikolojide çok kullanışlı bir model organizmadır.

D. magna ile yapılan toksikolojik araştırmaların çoğu, ortalama ölümcül konsantrasyonun (LC_{50}) veya ortalama etkili konsantrasyonun (EC_{50}) belirlendiği akut toksisite testlerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, toksisite hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlamak için özellikle düşük toksik madde konsantrasyonlarının neden olduğu sub-letal etkiler için, daha hassas biyobelirteçler gereklidir (Bownik, 2017). Ksenobiyotiklerin organizmalar üzerindeki sub-letal etkilerini değerlendirmek için, maruz kalan organizmalardaki bozulmuş fizyolojik süreçlerden kaynaklanan anormal biyokimyasal tepkilere biyobelirteç denmektedir. Biyobelirteç olarak da adlandırılan yanıtlar, çevresel risk değerlendirmelerinde pestisitlerin düşük, sub-letal konsantrasyonlarda etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada ölçülen biyobelirteçlerden asetilkolinesteraz (AChE) nörotoksik etki belirteci olarak; glutation S-transferaz (GST) ve karboksilesteraz (CaE) detoksifikasyon belirteci olarak; katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve redükte glutatyon (GSH_{red}) ise oksidatif stres belirteci olarak akuatik toksikoloji çalışmalarında çok sayıda omurgalı ve omurgasız test organizmasında ölçülmüştür (Gungordu ve diğ, 2016; Santos ve diğ, 2018; Vrankovic ve diğ, 2018; Xiong ve diğ, 2018).

1.1 Biyoakümülyasyon

Organik kirleticilerin, ortamdaki konsantrasyonlarına bağlı olarak, organizmaların vücutlarında yüksek konsantrasyonlarına ulaşabildikleri yaygın olarak gözlenmektedir. Organizmalar içinde yaşadıkları ve yakından temas ettikleri hava, su, toprak, sediment ile tükettikleri yiyecekleri yoluyla kirleticilere maruz kalırlar ve bazı durumlarda bu kirleticiler canlı vücudunda birikirler. Biyobirikim balıklar, memeliler, sürüngenler ve kuşlar dahil olmak üzere omurgalı ve omurgasız hayvanlarda ve bitkilerde gerçekleşebilmektedir (Mackay ve Fraser, 2000; Zenker ve diğ, 2014).

Çevresel kimyasallar, suda yaşayan organizmalarda farklı mekanizmalar yoluyla birikebilmektedir. Sudan, solungaçlar veya deri yoluyla doğrudan alım (biyokonsantrasyon), askıda kalan partiküllerin alınması (yutma) ve kontamine gıda tüketimi (biyomagnifikasyon) birikim mekanizmalarındandır (van der Oost ve diğ, 2003). Biyoakümülyasyon kirletici maddelerin organizmalar tarafından çevre ortamından alınması ve tutulmasıdır. Çoğunlukla bu terim biyokonsantrasyon ile eş anlamlı kullanılır. Organizmadaki ve dış ortamdaki kirletici düzeylerinin oranları genellikle biyoakümülyasyondan ziyade biyokonsantrasyon olarak bilinirken, bu iki terimin tam olarak birbirinden ayırt edilmesi de zordur. Bazı durumlarda kirletici maddelerin biyota tarafından alımı, hava, toprak, sediment veya su gibi ortamlardan doğrudan gerçekleşir (Şekil 1.1). Bununla birlikte, diğer durumlarda, kirleticiler öncelikle besin zincirleri veya besin ağları yoluyla birikir ve konsantrasyonların trofik düzeyde arttığı (daha yüksek tüketicilere doğru) bu süreç için “biyomagnifikasyon” terimi kullanılmaktadır (Calow, 1993). Standart ekotoksisite testlerinde saptanabilir akut veya kronik etkiler olmasa bile, biyoakümülyasyon kendi başına bir tehlike kriteri olarak görülmelidir. Çünkü bazı etkiler yalnızca sonraki kuşaklarda veya besin zincirinin daha yüksek üyelerinde belirlenebilmektedir. PCB'lerin kuşlarda yumurtaların kuluçka başarısına olumsuz etkisi biyomagnifikasyon için en iyi bilinen örneklerden biridir (van der Oost ve diğ, 2003).



Şekil 1.1: Sucul organizmalar için biyoakümülyasyon modeli. K_{OC} : sorpsiyon katsayısı; BCF: biyokonsantrasyon faktörü; BSAF: biota-sediman birikim faktörü; BMF: biyolojik büyütme faktörü. C, bir konsantrasyona ve k, bir hız sabitine karşılık gelir. SED, S, B, BİY, BOŞ ve MET alt simgeleri sırasıyla sediment, su, gıda, biyota, boşaltım ve metabolizmaya ifade etmektedir. Sindirilebilir sediment fraksiyonu, gıdanın bir parçası olarak kabul edilir (van der Oost ve diğ, 2003).

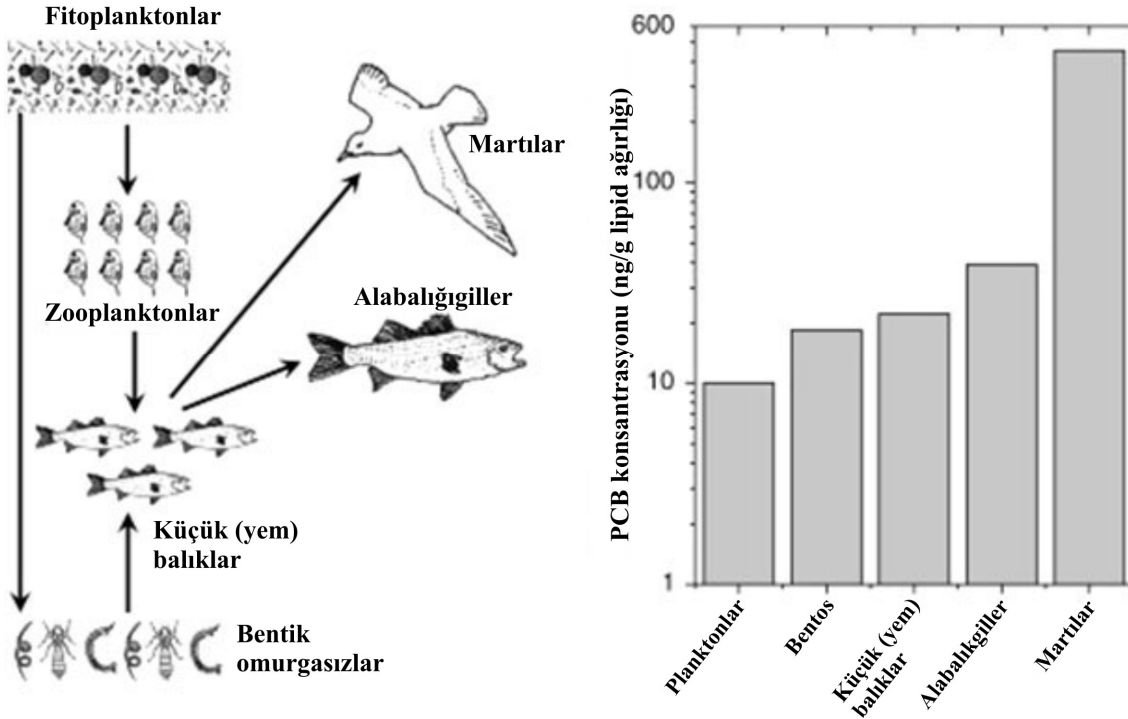
1.1.1 Biyokonsantrasyon

Biyokonsantrasyon, bir kimyasalın yalnızca sudan absorpsiyon yoluyla alınmasını içerir, solunum yüzeyi ve/veya deri yoluyla meydana gelebilir ve suda yaşayan bir organizmadaki kimyasal konsantrasyonun sudakinden daha yüksek olmasına neden olur. (Mackay ve Fraser, 2000). Biyokonsantrasyon faktörü (BCF), bir organizmadaki kimyasal konsantrasyonun, sudaki toplam kimyasal konsantrasyona veya suda serbestçe çözülmüş kimyasal konsantrasyona oranı olarak tanımlanır (Şekil 1.1) (van der Oost ve diğ, 2003).

1.1.2 Biyomagnifikasyon

Biyomagnifikasyon (biyolojik yükseltgenme, biomagnification) terimi, organizmaya ana kimyasal maruziyetin gıda yoluyla olduğu durumlarda, bir organizmadaki kirlenici konsantrasyonunun diyetindeki kirlenici konsantrasyonunu aştığı durum olarak tanımlanmıştır. Daha detaylı olarak, besin ağı biyomagnifikasyonu terimi, aynı besin ağından örneklenen organizmaların artan trofik durumu ile kirlenici konsantrasyonundaki artış olarak tanımlanmıştır (Drouillard, 2008). Trofik yükseltgenme hem pestisitler hem diğer çevresel kirleniciler için gösterilmiştir (Favari ve diğ, 2002). Yapılan bir çalışmada

ABD’de Ontario gölünde poliklorlu bifenillerin su ekosisteminde besin zinciri boyunca giderek arttığı gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Braune ve Norstrom, 1989).



Şekil 1.2: Biyolojik yükseltgenme örneği: Ontario Gölü'ndeki poliklorlu bifenillerin (PCB'ler) gıda ağı biyomagnifikasyonu (Braune ve Norstrom, 1989).

Çevreye salınan kimyasalların akıbetini, biyolojik birikimini, maruziyetini ve potansiyelini anlamak ve ölçmek için bilimsel ve ekosistemlerin korunması yönünde bir çaba vardır. Bir besin zinciri veya besin ağı boyunca trofik biyomagnifikasyon, daha düşük trofik seviyelerdeki konsantrasyonlara kıyasla daha yüksek trofik seviyelerde kimyasal konsantrasyonları, dolayısıyla maruziyeti ve potansiyel riski önemli ölçüde artırabilmektedir (Mackay ve diğ, 2016).

1.1.3 Biyotransformasyon

Bir organizmada bir kimyasal ortadan kaldırmanın iki ana yolu vardır ya ana bileşik olarak atılır ya da organizma tarafından biyolojik olarak dönüştürülür. Biyotransformasyon, lipofilik (yağda çözünür), ksenobiyotik (yabancı) veya endobiyotik (endojen) kimyasalların vücutta enzimatik reaksiyonlarla daha hidrofilik (suda çözünür) ürünlere dönüştürüldüğü süreci ifade eder (Casarett ve diğ, 2001). Biyotransformasyon, ana bileşikten daha kolay atılan daha hidrofilik bir bileşiğin oluşumuna yol açar. Biyotransformasyon, organizma için yararlı veya zararlı olabilen bir bileşiğin toksisitesini

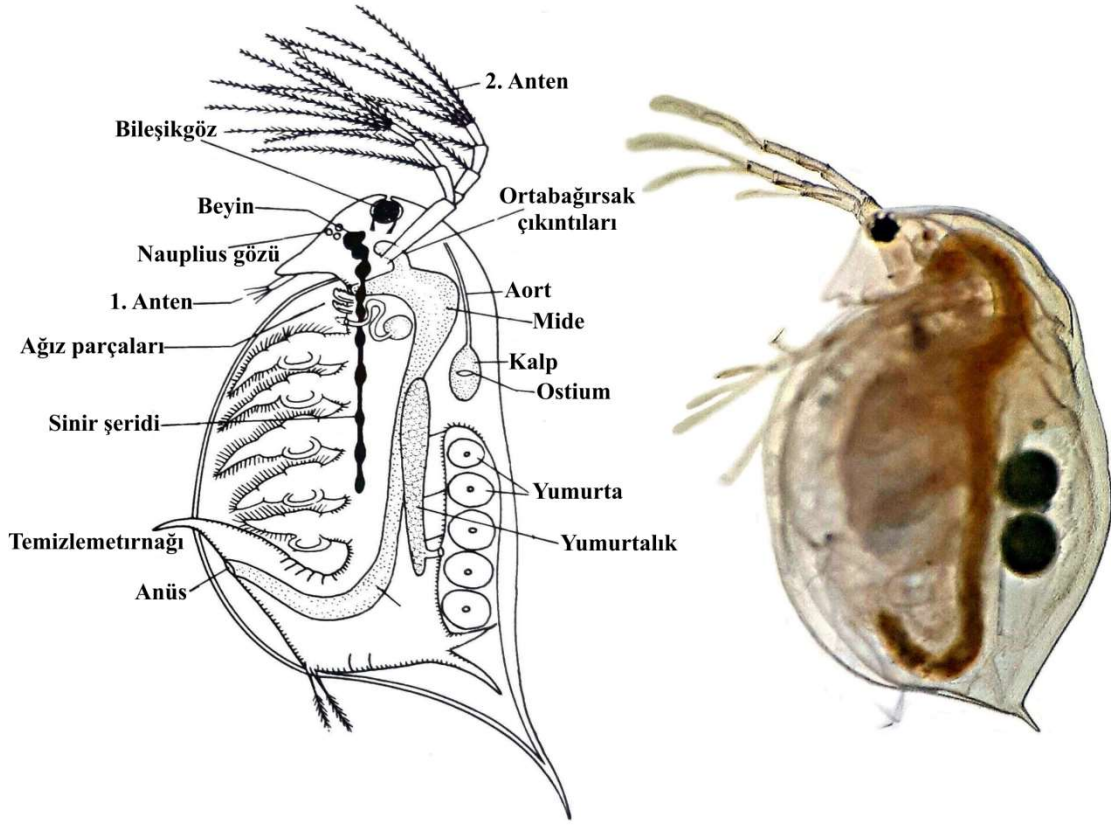
de değiştirebilir. Bir detoksikasyon reaksiyonu durumunda, vücuttan atılım genellikle yükselirken bileşiğin toksisitesi azalır. Biyoaktivasyon durumunda ise oluşan yeni bileşik, ana bileşikten daha toksik olan reaktif bir metabolite dönüştürülür. Biyotransformasyon süreci bu nedenle bir bileşiğin aktivitesinin, bu aktivitenin süresinin ve bileşiğin vücuttaki yarı ömrünün belirlenmesinde önemli olabilir (Casarett ve diğ, 2001).

1.2 Test Organizmaları

1.2.1 *Daphnia magna*

Daphnia, filopoda taksonuna bağlı planktonik krustaselerdendir (Çizelge 1.1). Filopodların içinde ise, gövdeleri karapaks (carapace, kabuk) olarak bilinen kireçlenmemiş bir kabukla çevrelenmiş olan Cladocera taksonuna bağlıdırlar. Aralarında hemolimf akan ve vücut boşluğunun bir parçası olan çift cidarlıdır. Karapaks büyük ölçüde, bir polisakkarit olan kitinden yapılır. Cladocera'nın (önden arkaya doğru) en fazla 10 çift uzantısı vardır: küçük antenler, antenler (ikinci anten, yüzmek için kullanılır); maksilla; ve mandibulalar; ardından gövdede 5 (*Daphnia*'da olduğu gibi) veya 6 uzuv gelir. Uzunlar, beslenme ve solunum için bir aparat oluştururlar. Karnın sonunda bir çift pençe bulunur. (şekil 1.3). Cladocera bireylerinin vücut uzunluğu 0.5 mm'den 6 mm'ye kadar değişir. Erkekler dişilerden daha küçük boyutları, daha büyük antenleri ve tutunmada kullanılan bir kanca ile donanmış ilk bacakları ile ayırt edilir (Ebert, 2005).

Daphnia cinsi, dünya çapında bilinen 100'den fazla tür içerir. Kaplıcalar gibi ekstrem habitatların dışında çoğu tatlı su sisteminde yaşarlar. Tüm yaş grupları iyi yüzücüdür ve çoğunlukla pelajiktir, yani açık suda bulunurlar. Yetişkinlerin boyutları 1 mm'den 5 mm'ye kadar değişir ve daha küçük türler genellikle balıkların avlandığı göletlerde veya göllerde bulunur. *Daphnia* cinsinin ekolojisi, diğer organizma grupları ile karşılaştırıldığında görece daha iyi bilinmektedir (Ebert, 2005).



Şekil 1.3: Cladocera'da (Branchiopoda'da) vücut organizasyonu, (Çizim Demirsoy, (2003)'ten alınmıştır)

Daphnia sudaki küçük, asılı parçacıkları filtre ederek beslenen bir organizmadır. Yiyecek, su akımı üreten düzleşmiş yaprak benzeri bacaklar olan filopodlardan oluşan bir filtreleme aparatı yardımıyla toplanır. Akım önden arkaya doğru akarken, *Daphnia* özel kıllar tarafından gıda oluşuna aktarılan parçacıkları toplar. Besleme aparatı, bakterilerin bile toplanabileceği kadar etkili olmasına rağmen, yiyecek genellikle planktonik alglerden oluşur. Yeşil algler en iyi gıdalar arasındadır ve laboratuvar deneylerinin çoğu, kültürlenmesi kolay olan *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* veya *Chlorella* ile yapılır. *Daphnia* genellikle 1 µm ila 50 µm arasındaki partikülleri tüketir, ancak çapı 70 µm'ye kadar olan partiküller büyük bireylerin bağırsak içeriğinde bulunabilir (Ebert, 2005).

Çizelge 1.1: *Daphnia magna*'nın sistematikteki yeri

Kategori	Takson	Otör
Regnum	Animalia	
Subkingdom	Bilateria	
İnfraregnum	Protostomia	
Süperfilum	Ecdysozoa	
Filum	Arthropoda	
Subfilum	Crustacea	Brünnich, 1772
Klasis	Branchiopoda	Latreille, 1817
Subklasis	Phyllozoa	Preuss, 1951
Takım	Diplostraca	Gerstaecker, 1866
Subordo	Cladocera	Latreille, 1829
İfraordo	Anomopoda	Stebbing, 1902
Familya	Daphniidae	Straus, 1820
Genus	<i>Daphnia</i>	O.F. Müller, 1785
Spesies	<i>Daphnia magna</i>	Straus, 1820

*: Belirtilen internet sitesinden alınmıştır (Son erişim: 14 Temmuz 2021)

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=83884#null

Daphnia kullanılarak yapılan 48 saatlik toksisite testleri ile atık suların, kimyasalların tatlı su kabukluları üzerindeki akut toksisitesi değerlendirilmektedir. Bu testlerin başlıca iki kullanımı şekli ve amacı vardır: (a) düzenleyici uygunluk testi ve endüstriyel atıkların izlenmesi (örneğin kağıt hamuru ve kağıt ve metal madenciliği sektörleri) ve (b) ticari kimyasalların ekolojik risk değerlendirmesi. Ayrıca, birçok ülkede (örneğin, Kanada, ABD, Avrupa Birliği ülkeleri) tatlı yüzey sularının çeşitli organik ve/veya inorganik kirleticilerden etkilenebileceği durumlarda çevresel izleme ve ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında yaygın olarak pelajik omurgasız test organizması olarak da kullanılmaktadır (Jonczyk ve Gilron, 2005).

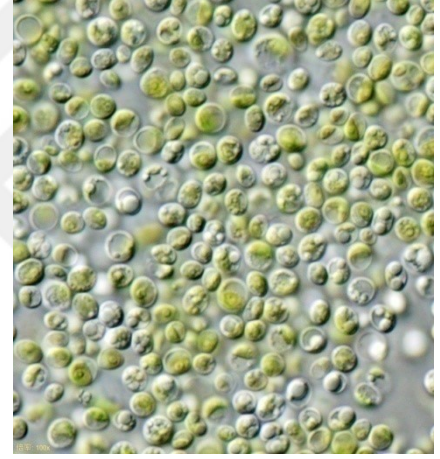
1.2.2 *Chlorella vulgaris*

Mikroalgler, yaklaşık 40.000'i zaten tanımlanmış veya analiz edilmiş olan muazzam bir biyolojik çeşitliliği temsil etmektedir. En dikkat çekici olanlardan biri, aşağıda bilimsel sınıflandırmadaki yeri verilen ve yeşil ökaryotik mikroalg olan *C. vulgaris*'tir (Şekil 1.4). İlk defa Hollandalı bir araştırmacı olan Martinus Willem Beijerinck tarafından 1890'da

tanımlanmıştır (Çizelge 1.2). *Chlorella* adı, yeşil anlamına gelen Yunanca chloros (Χλωρός) kelimesinden ve mikroskobik boyutuna atıfta bulunan Latin eki ella'dan gelir. Tatlı suda yaşayan ve 2.5 milyar yıl önce Kambriyen öncesi dönemden bu yana yeryüzünde bulunan ve o zamandan beri genetik bütünlüğü büyük oranda sabit kaldığı düşünülen tek hücreli bir mikroalgdır. Günümüzde atmosferik CO₂'nin azaltılması, tıbbi tedavi (bağışıklık düzenleyici ve anti-kanser özelliklerine sahip olduğunu düşünülmektedir), biyodizel üretimi gibi pek çok alanlarda kullanılmaktadır (Safi ve diğ, 2014).

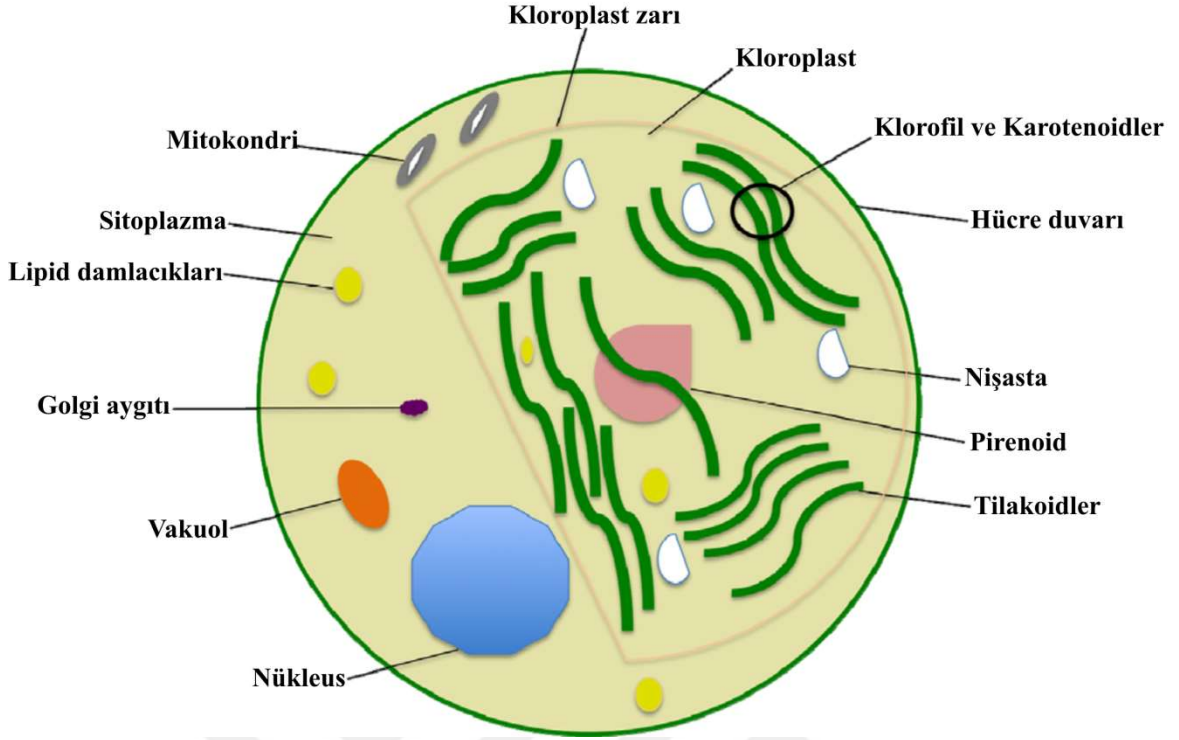
Çizelge 1.2: *Chlorella vulgaris*'in sistematikteki yeri

Kategori	Takson	Otör
Regnum	Plantae	
Subregnum	Viridiplantae	
İnfraregnum	Chlorophyta	
Division	Chlorophyta	
Subdivision	Chlorophytina	
Klasis	Trebouxiophyceae	
Takım	Chlorellales	
Familya	Oocystaceae	
Genus	<i>Chlorella</i>	Beijerinck, 1890
Spesies	<i>Chlorella vulgaris</i>	Beijerinck, 1890



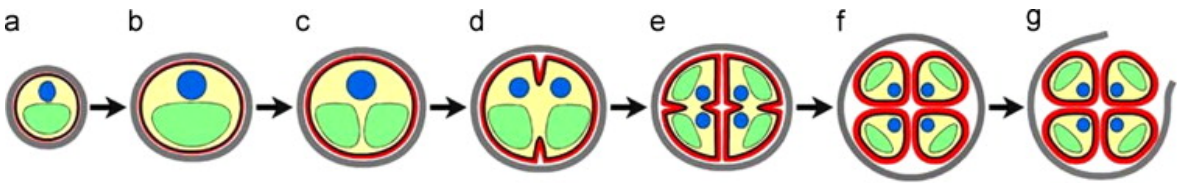
*: Belirtilen internet sitesinden alınmıştır (Son erişim: 14 Temmuz 2021)

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=5815#null



Şekil 1.4: *C. vulgaris*' in farklı organellerini temsil eden şematik yapısı (Safi ve diğ, 2014).

Chlorella hücreleri genellikle küresel veya elipsoidaldir ve hücre boyutu 2 ila 15 μm çapında olabilir. Tatlı su, deniz suyu, toprak gibi çeşitli habitatlarda yaygın olarak görülürler ve hatta likenler ve protozoalarla simbiyotiktirler. *Chlorella* yaşam döngüsünde eşeyli üreme yoktur ve aseksüel otospor üretimi ile ürerler. Olgunlaştığında, otosporlar aynı zamanda ana hücre duvarının rüptürüyle serbest bırakılırlar. Tek bir ana hücreden türetilen otospor sayısı 2 ila 16 arasında büyük ölçüde değişebilmektedir (Liu ve Chen, 2014).



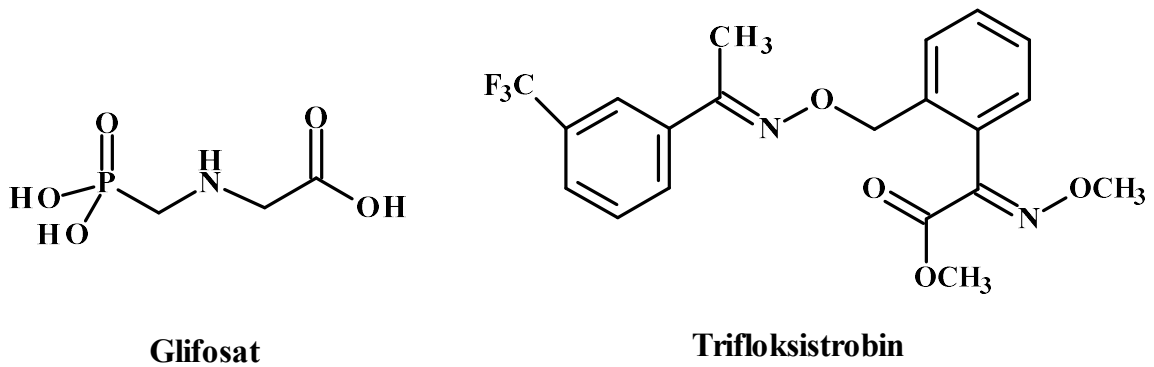
Şekil 1.5: *C. vulgaris*'te üreme evreleri ve yavru hücre duvarının oluşumu: (a) erken hücre büyüme evresi; (b) geç hücre büyüme evresi; (c) kloroplast bölünme evresi; (d) erken protoplast bölünme evresi; (e) geç protoplast bölünme evresi; (f) yavru hücrelerin olgunlaşma evresi ve (g) kuluçka evresi (Safi ve diğ, 2014)

1.3 Toksisitesi Test Edilen Pestisitler

1.3.1 Glifosat bazlı herbisit (GBH, Syngenta)

Glifosat (GLY), dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir herbisittir. 1995 ile 2014 yılları arasında üretimi 12 kat artarak 826 milyon kg'a çıkmıştır (Benbrook, 2019). GLY'nin ana hedefi, bitkilerdeki aromatik amino asit sentez yollarındaki anahtar enzim olan 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfat sentazı inhibe etmektir. GLY veya GLY içeren ürünler üzerinde yapılan toksisite çalışmalarının sayısı da ticari formülasyonların bileşimindeki farklılıklar ve test türlerinin yanıtlarındaki değişkenlik nedeniyle artmaya devam etmektedir (Iummato ve diğ, 2018; Lajmanovich ve diğ, 2011; Samanta ve diğ, 2014).

GLY, çeşitli adjuvanlarla formüle edilmiş 750'den fazla GBH'nin aktif bileşenidir (Şekil 1.6) (Guyton ve diğ, 2015; Li ve diğ, 2005). Dünya Sağlık Örgütü veritabanı, GLY'nin suçlu organizmalar için düşük toksisiteye neden olduğunu göstermektedir (Hong ve diğ, 2018). Ancak, çalışmalar, farklı katkı maddeleri içeren GBH'lerin farklı toksisite düzeylerine neden olabileceğini bildirmiştir (Edge ve diğ, 2014; Mann ve Bidwell, 1999). Ticari GBH'lerin solunum, protein ve nükleik asit sentezi dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal süreçleri bozabildiği ve genotoksisiteye neden olabildiği bilinmektedir (Gill ve diğ, 2018; Yannicari ve diğ, 2012). Birçok çalışma ticari GBH'lerin omurgasızlar, balıklar ve amfibiler dahil olmak üzere çeşitli hedef olmayan suçlu organizmalar üzerinde olumsuz etkilere neden olduğunu göstermiştir (Bonfanti ve diğ, 2018; Carvalho ve diğ, 2019; Edginton ve diğ, 2004; Gungordu, 2013; Gungordu ve diğ, 2016; Hansen ve Roslev, 2016; Lajmanovich ve diğ, 2013; Moore ve diğ, 2012; Pereira ve diğ, 2018; Relyea ve Jones, 2009; Silveira ve diğ, 2019; Wagner ve diğ, 2013).



Şekil 1.6: Test edilen pestisitlerin ticari formülasyonlarda bulunan aktif maddelerin molekül yapıları

1.3.2 Trifloksistrobin bazlı fungusit (TBF, Flint, Bayer)

Özel fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı, strobilurinler Amerika Birleşik Devletleri ve Büyük Britanya'da tarımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Flint®, Bayer Crop Science ürün portföyündeki strobilurin gruplarının ilk fungusitidir (Junges ve diğ., 2012). Bu formülasyon, aktif bileşen olarak trifloksistrobin içerir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) Pestisit bilgi sayfasına göre, trifloksistrobinin çoğu toprak ve su ortamında hızlı bir şekilde (saatler veya günler) bozunmaktadır. Asit metabolitinin serbest formu olan CGA-321113, hareketli ve daha fazla parçalanabilen ancak ana bileşikten daha yavaş bir hızda parçalanan kalıcı metabolittir. Bununla birlikte, birincil metaboliti [(E, E) -trifloksistrobin asit] suda çözünür; bu nedenle suda yaşayan organizmalar bu ürünlere maruz kalma riski altındadır. Günümüzde bazı araştırmacılar, trifloksistrobinin topraktan/havadan suya ve su ekosistemlerine çok yüksek bir hareketlilik/yayılma eğiliminde olduğunu düşünmektedirler. CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) göre trifloksistrobinin insanlar, kuşlar, memeliler, arılar ve diğer faydalı böcekler ve solucanlar için düşük akut ve kronik toksisite gösterse bile hedef olmayan sucul türler için oldukça toksik olarak sınıflandırılmıştır. Örneğin, Avustralya Pestisitler ve Veteriner İlaç Kurumu (APVMA), *Oncorhynchus mykiss* alabalığı için trifloksistrobinin 96 saatlik LC₅₀ düzeyinin 15 ile 78 µg/L arasında ve *Mysidopsis bahia* için ortalama etkili konsantrasyonun (EC₅₀) 9 ile 34 µg/L arasında değiştiğini rapor etmiştir. Ayrıca Belden ve ark. (2010) 40 µg/L trifloksistrobin konsantrasyonunun *Bufo cognatus* iribaşları üzerindeki toksik etkilere neden olduğu ve trifloksistrobinin av hareketlerini azaltarak yılan balığı-kurbağa yavrusu etkileşimini olumsuz etkileyeceğini bulmuştur (Junges ve diğ., 2012). Trifloksistrobinin, *Chlorella* da üç genin transkript sayısını azalttığını gösterildiği bir çalışmada, araştırmacılar sucul organizmalarda trifloksistrobinin toksik ve öldürücü dozlarını değerlendiren bir dizi çalışma olsa da, potansiyel etkiler ve etki mekanizmaları ile ilgili bilgilerin hala eksik olduğu sonucuna varmışlardır (Shen ve diğ., 2014).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Fitoplankton ve zooplankton, sucul ekosistemlerde sırasıyla birincil üreticiler ve birincil tüketicilerdir. Bunlar arasında “mikroalg-*D. magna*” besin zinciri, önemli bir birincil sucul besin zinciridir (Liu ve diğ, 2020). Önceki birçok çalışma, alglerin organik kirleticiler için güçlü adsorpsiyon ve zenginleştirme yeteneklerine sahip olduğunu doğrulamıştır (Peng ve diğ, 2014). Kirleticiler mikroalgler tarafından adsorbe edilebilir, mikroalg fazında tutulabilir ve ikincil organizmalara transfer olabilirler. Bu durum, ikincil organizmalarda kirletici maddelerin biyo-bulunurluklarında (bioavailability) değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle, sucul gıda zincirinin temelini oluşturan birincil üreticiler olarak mikroalgler kirleticilerin toksisitesini değerlendirmede vazgeçilmezdir. *Daphnia* ise küçük boyutu, kısa yaşam döngüsü ile daha yüksek bir trofik seviyede bulunan bir test organizmasıdır. *D. magna*, üreticileri ve üst düzey tüketicileri birbirine bağlayan ve su ekosistemleri için standart bir biyoindikatör tür olarak yaygın şekilde kullanılan önemli bir tatlı su zooplanktonudur (Zhang ve diğ, 2020).

Alevlenmeyi geciktirici özellikleri ve termal kararlılıkları nedeniyle polibromlu difenil eterler (PBDE'ler) poliüretan plastiklerde, tekstillerde ve ev aletlerinde alevlenmeyi geciktirici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Liu ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, kalıcı bir organik kirletici olan 2,2',4,4'-tetrabromodifenil eter (BDE-47)'in *D. magna* üzerinde bariz beslenme inhibisyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir. BDE-47'nin *Chlorella pyrenoidosa* ve *D. magna* arasındaki akuatik besin zincirinde çevresel tehlike aktarımı ile sonuçlanan bariz bir biyomagnifikasyona neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, maruz kalma deneyi sırasında hiçbir metabolit bulunamamıştır ve özellikle besin zincirlerinde BDE-47'nin trofik transferinin içsel mekanizmalarını araştırmak için daha fazla çalışma yapılması önerilmiştir.

TiO₂ nanoparçacıkların su ekosisteminde, beslenme maruziyeti yoluyla besin zincirindeki çeşitli trofik seviyelerde biyomagnifiye olabildiği düşüncesinden hareketle yapılan bir çalışmada, TiO₂'nin iki kristal fazı olan anataz ve rutil NP'lerin (tekli ve ikili bir karışım) trofik transfer potansiyeli, alg-*Daphnia* sistemi kullanılarak göl suyu ortamında değerlendirilmiştir. *Clorella sp.* ve *Ceriodaphnia dubia*, tatlı su ekosisteminin alg-*Daphnia* besin zincirini temsil için test organizmaları olarak kullanılmıştır. Algal diyetle verilen TiO₂ NP'lerin yalnızca 300 ve 1200 µM konsantrasyonlarında önemli letaliteye neden olmuştur. Tek tek NP'lerle karşılaştırıldığında ikili karışım *C. dubia* üzerinde daha az

ölüme neden olmuştur. Bu da NP'lerin karışım halinde antagonistik etkisini göstermektedir. Tekli NP uygulamaları diyet yoluyla sudaki besin zincirinde trofik transfer potansiyellerini doğrulamıştır. Buna karşılık, ikili karışımda, *C. dubia* Ti birikimindeki azalma için neden olarak, biyoakümüülasyonunu önemli ölçüde azaltan antagonistik etki olduğu ileri sürülmüştür (Iswarya ve diğ, 2018).

4-tert-Oktilfenol (OF)'un *C. vulgaris*'te biyokonsantrasyonu ve alg kültürü üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, alglerde OF birikim düzeyi 24 saat sonra yaklaşık 113 mg/kg olarak belirlenmiştir. OF alım ve eliminasyon hızı belirlendikten sonra *C. vulgaris*'te OF'nin hesaplanan biyokonsantrasyon faktörü 4.0×10^4 L/kg olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca, *D. magna*'da OF'nin biyolojik birikimi, hem sulu hem de diyet (*C. vulgaris*) maruziyetleri dikkate alınarak araştırılmıştır. *D. magna*'daki OF birikimi, diyete (%37) göre ağırlıklı olarak su (%63) yoluyla meydana gelmiştir. Bu da *C.vulgaris-D.magna* trofik ilişkisinde OF biyomagnifikasyonunun olası olmadığını sonucuna vardırmıştır (Achar ve diğ, 2020).

Biyolojik olarak sentezlenmiş Ag NP'lerin ve Ag⁺ iyonları ve kaplama maddesi gibi öncülerinin tatlı su besin zincirinin farklı trofik seviyelerindeki organizmalar üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada fitoplankton (*C. vulgaris*), zooplankton (*D. magna*) ve balık (*Danio rerio*) olmak üzere üç organizma kullanılmıştır. Bu üç sucul organizma için Ag NP'lerin kaplama maddeleri toksik etki göstermemiş ve Ag⁺ iyonları Ag NP'lere kıyasla daha toksik olduğu belirlenmiştir. Daha ileri araştırmalar, Ag NP'lerin yüksek stabilitesi nedeniyle Ag⁺ iyonlarının Ag NP'lerden test ortamına salınımının önemli olmadığını, dolayısıyla toksisitenin esas olarak üç trofik seviyenin tümünde Ag NP'lerin parçacıklarından kaynaklandığını ortaya koymuştur. Çalışmada, Ag NP'lere maruz kalmaya en duyarlı organizmanın *D. magna* (ikinci trofik seviye) olduğu tespit edilmiştir (Khoshnamvand ve diğ, 2020).

Steroid östrojenler, balıklarda endokrin bozucu etkilerden sorumlu anahtar kimyasallar olarak tanımlanmıştır ve su ortamında öncelikli kirleticiler olarak kabul edilmektedir. Bir steroid östrojen olan östronun *D. magna*'da biyobirikiminin değerlendirildiği bir çalışmada biyobirikimin gerçekleştiği ispatlanmıştır. Sulu ortam yoluyla doğrudan alımın maruz kalmanın ilk 16 saati içinde meydana geldiği belirlenmiştir. Sonuçlar, besin kaynağı *C. vulgaris* yoluyla *D. magna*'ya transferin biyokonsantrasyondan daha az gerçekleştiğini göstermiştir. Östronun *D. magna*'da *C. vulgaris* yoluyla biyomagnifikasyonu, su ortamından gelen biyo-konsantrasyondan dokuz

kat daha azdır. Bu, son derece hidrofobik kimyasallar dışında, biyokonsantrasyon yoluyla alımla karşılaştırıldığında biyomagnifikasyonun daha az önemli olduğunu belirten bir çalışmadır (Gomes ve diğ, 2004).

Tetrabromobisfenol-A (TBBPA) yaygın olarak kullanılan bromlu alev geciktiricidir. 6 tatlı su yeşil mikroalgi tarafından TBBPA'nın biyotransformasyonu ve biyotransformasyon ürünlerinin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, 10 günlük inkübasyonun ardından TBBPA'nın *Scenedesmus quadricauda* ve *Coelastrum sphaericum* tarafından neredeyse tamamen uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Kütle spektrometrisi ile belirlenen beş metabolit (TBBPA sülfat, TBBPA glukozit, sülfatlanmış TBBPA glukozit, TBBPA monometil eter ve tribromobisfenol-A) TBBPA'nın biyotransformasyonunda yer alan mekanizmaların sülfatlama, glukosilasyon, O-metilasyon ve debrominasyon olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, mikroalglerin sucul ortamlarda TBBPA'nın kaderinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Peng ve diğ, 2014).

Diğer bir çalışmada su sistemleri için önemli bir kirletici olduğu düşünülen mikroplastiklerin tatlı su ekosistemi bileşenlerinden *D. magna*'nın morfolojisi, yaşam döngüsü ve moleküler düzeyde etkilerini incelenmiştir. Yetişkin *Daphnia* için ne morfolojik (vücut uzunluğu, en ve spine uzunluğu) ve üreme parametrelerinde ne de mortalitede artış gözlenmiştir. Juvenil *Daphnia* analizlerinde ise morfolojik özelliklerde anlamlı değişiklikler belirlenmiştir (Imhof ve diğ, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışmada test edilen Glifosat Bazlı Herbisit (Touchdown Premium, Syngenta) ve Trifloksistrobin Bazlı Fungusitin (Flint, Bayer) teknik formülasyonları yerel tarım marketlerinden alındı. GBH'deki aktif madde miktarı 441 g/L glifosatın izopropilamin tuzudur. TBH için ise ticari formülasyonda % 50 oranında aktif madde trifloksistrobin bulunmaktadır. Biyokimyasal analizlerde kullanılan; 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 5,5-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), p-nitrofenil asetat (PNPA), asetiltiyokolin iyodit (ACTI), redükte glutatyon (GSH), bovin serum albümini (BSA) ve Bradford reaktifi Sigma'dan (ABD) satın alındı. Okside glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş -nikotinamid adenozin difosfat (NADPH) MP Biomedicals (ABD) 'den satın alınmıştır.

3.2 Test Organizmaları

Daphnia magna: Bir tatlı su eklembecaklısı olan *D. magna* laboratuvarımızda koloni olarak sürekli kültürü yapılan ve yaşatılan bir türdür. Koloni pH 7.4-7.8; sıcaklık 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$); iletkenlik 620 (± 30) $\mu\text{S}/\text{cm}$ olan ortam koşullarında, 14:10 saat aydınlık karanlık fotoperiyodunda 25 L kapasiteli cam tanklarda yetiştirilmektedir. Organizmalar günde iki kez karışım yem (soya unu-sipurulina-maya) beslenmekte olup, bu organizmanın barındırılmasında Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) standartları (2004) uygulandı.

Chlorella vulgaris: Tek hücreli bir klorofittir. Çeşitli ortamlara kolay adapte olabilen kozmopolit bir yeşil alg türüdür (Alvarez-Diaz ve diğ, 2017). Bu çalışmada sucul ortamda, seçilen pestisitlerin trofik transfer sonucu etkilerinin değerlendirilmesi için bu alg türü seçilmiştir. Çalışmalar için bu türün seçimindeki temel etmenler jenerasyon süresinin kısalığı, hücre boyutu büyüklüğü (yaklaşık 2-8 μm), kolay kültüre edilmesi ve karanlık ortamda da üremeye devam edebilmesidir.

3.3 Test Edilen Pestisitlerin *D. magna* için LC₅₀ Düzeylerinin Belirlenmesi

D. magna ile ilgili letalite belirleme çalışmalarında 24 saatlik yavru bireyler (neonat) kullanıldı. Bunun için bir gün önceden seçilen normal gelişim gösteren erişkinler küçük hacimli kaplara alınarak neonatlar elde edildi. *D. magna* neonatları ile yürütülen tüm

çalışmalarda pH 7.4'e ayarlanmış su ortamı kullanıldı. Bu nedenle neonatların, bu suya adaptasyonu amacıyla erişkin bireyler bu suya alınmak sureti ile üremeleri sağlandı ve yeni doğanların deneysel koşullar ile aynı fizikokimyasal özelliğe sahip ortamda bulunması sağlandı. *D. magna* testleri için kullanılan nanokozm ortamı (NCM) ise, bazı değişiklikler yapılarak hazırlandı. NCM için, Taub#36 çözeltisi ve 5 mM HEPES tamponu (0.004 mg/L sodyum selenit içeren) 50:50 oranında karıştırıldı ve karışımın pH'sı 0.1 M NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Testte kullanılan neonatların eldesi için, teste başlamadan 24 saat önce yetişkin bireyler NCM ortamına alındı ve 24 saatin sonunda elde edilen ≤ 24 saatlik neonatlar toplanarak testte kullanıldı. Testler için, OECD (2004) tarafından tanımlanan kılavuzda belirtildiği gibi neonat (yeni doğan) *D. magna* bireyleri kullanıldı. *D. magna* toksisite testlerinde polietilen propilen test küvetleri kullanıldı. Kontrol ve her pestisit için her bir konsantrasyonu için 5 tekrarlı test düzeneği oluşturuldu. Her küvete 20 mL pestisit çözeltisi eklendi ve ortamların pH'ları 7.4'e ayarlandı. Her küvete 7 adet neonat konuldu. Çözeltilere maruz bırakılan neonatların, 24. ve 48. saatlerde hareketleri kontrol edildi. Temasla uyarıldığı halde 15 saniye süreyle hareket etmeyen bireyler ölü olarak değerlendirildi.

Test edilen pestisitlerin *D. magna* neonatları için 48 saatlik letal konsantrasyonları belirlendikten sonra, GBH ve TBF'nin farklı ortamlarda toksik etkilerini değerlendirmek için *D. magna* bireyleri pestisitlerine seçilen konsantrasyonlarına (LC_{50} , $LC_{50}/2$ ve $LC_{50}/4$) maruz bırakıldı.

3.4 Test edilen Pestisitlerin Farklı Ortamlarda *D. magna* Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi













3.4.1 *Chlorella vulgaris* kültürlerinin hazırlanması

Tris-Asetat-Fosfat (TAP) kültür ortamında (Gorman ve Levine, 1965) kültive edilen ve haftalık olarak pasajları yapılan alg kültürü çalışmalar için kullanıldı. Hazırlanan TAP kültür ortamı pH 7.4 olarak ayarlandıktan sonra saklama şişelerinde otoklavize edildi ve buzdolabında saklandı ve gerektiğinde oda sıcaklığına getirilen besiyeri 250 mL'lik erlenlere yaklaşık 150 mL olarak steril koşullarda konulduktan sonra sünger tampon ile korundu. Stok alg kültürü ortamından yaklaşık $4-5 \times 10^4$ hücre/mL olacak şekilde pasaj yapıldı. Ortam steril pipete bağlanan hava hortumu ile havalandırılarak beyaz gün ışığı floresans lamba altında yaklaşık 2500 lümen ışık ortamında 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyodunda kültive edildi. Testlerde kullanılan kültür ortamındaki hücre sayısı ve

hücre özellikleri LUNA-II™ Otomatik Hücre Sayıcı (Logos BioSystems) kullanılarak belirlendi.

3.4.2 Doğrudan toksisite testleri

Tek organizmalı toksisite testlerinden farklı olarak pestisitlerin farklı ortamlarda (beslenmeyen, 2 mg/mL karışım yemle (%25 soya unu, %25 spirulina ve %50 maya) beslenen ve *Chlorella* ile beslenen (10^5 hücre/mL) *D. magna* üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik toksisite testleri Şekil 3.1’de belirtilen plana göre yapıldı. Buna göre, her iki test organizması (*Chlorella* ve *Daphina*) aynı test ortamında test edilen her bir pestisit için $LC_{50}/4$, $LC_{50}/2$ ve LC_{50} konsantrasyonlarına birlikte maruz bırakıldı. Ayrıca *D. magna* bütün ortamlarda bulunurken bir gruba *Chlorella* yerine ticari karışım yem (2mg/L) verilirken, diğer bir grup da beslenmemiştir (ne besin karışımı ne de *Chlorella* eklendi). Böylece konsantrasyonlar haricinde maruz bırakılan ortamlar da üç farklı şekilde düzenlendi. Her bir test için 24 ve 48 saatin sonunda *D. magna* için ölüm düzeyleri kaydedildi.

	Beslenmeyen	Karışım yemle beslenen	<i>Chlorella</i> ile beslenen
Kontrol			
$LC_{50}/4$			
$LC_{50}/2$			
LC_{50}			

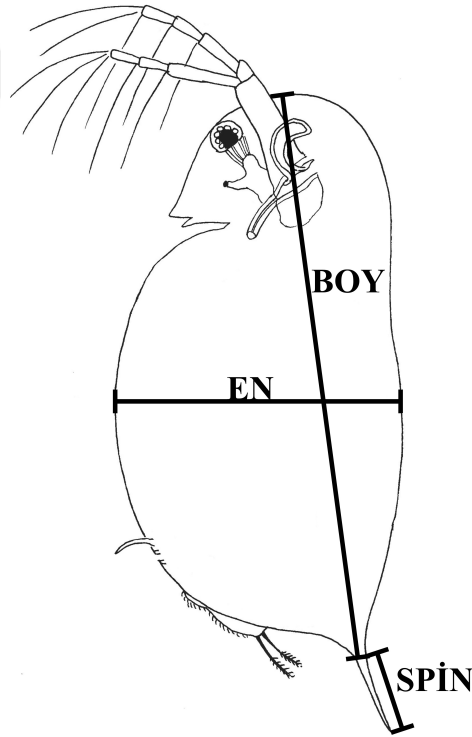
Şekil 3.1: Pestisitlerin farklı ortamlarda *D. magna* üzerindeki etkilerinin belirlenmesi yönelik çalışmalar için maruz bırakma planı

3.4.3 Dolaylı toksisite testleri

Bu testlerde, doğrudan toksisite testlerine benzer şekilde Şekil 3.1’de olduğu gibi maruz bırakma ortamları hazırlandı. Farklı olarak, ortama *D. magna* eklenmeksizin 24 saat ortam bekletildi ve sürenin sonunda ortamlar 15000 xg’de 10 dk santrifüj edildi. Böylece *Chlorella* bulunan ortamlarda hücreler ve diğer guruplarda ise ortamdaki partiküller çöktürüldü. Santrifüj sonrası pellet 1 mL NCM ile sulandırılıp karıştırıldı. İçinde 20 mL NCM çözeltisi ve 7 şer *D. magna* bireyi bulunan ortamlara eklendi. Doğrudan toksisite testlerine benze şekilde 24 ve 48 saatin sonunda *D. magna* için ölüm düzeyleri kaydedildi.

3.5 *D. magna* ile İlgili Morfolojik Ölçümler

Hem test edilen pestisitlerin letal konsantrasyonlarını belirleme çalışmalarında hem de farklı ortamların-besin zinciri yoluyla toksisite testlerinin sonunda hayatta kalan *D. magna* bireylerinin en, boy ve spin boyutları (Şekil 3.2) bir stereo mikroskop kullanılarak Euromex Image Focus 4.0 yazılımı ile belirlendi.



Şekil 3.2: Toksisite testleri sonunda hayatta kalan *D. magna* bireylerinde ölçülen morfolojik parametreler

3.6 Biyokimyasal Analizler

Yukarıda belirtilen “Pestisitlerin Farklı Ortamlarda *D. magna* Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi” çalışmalarında doğrudan toksisite testlerinin benzeri bir test de maruz kalan organizmalarda biyokimyasal değişiklikleri belirlemek için yapılmıştır. Biyokimyasal analizler için yapılan testte farklı olarak, biyobelirteç düzeylerinin belirlenebilmesi için *D. magna* neonatları yerine erginleri çalışmada test organizması olarak kullanıldı. *D. magna* erginleri pestisit konsantrasyonlarına Şekil 3.1’de olduğu gibi, 30 ml’lik çözeltilerde polikarbonat kaplarda maruz bırakıldı. Her bir grup için 5 ayrı kapta, 25’er neonat (toplamda her grup için 125) olacak şekilde deney düzeneği oluşturuldu. Çözeltilere maruz bırakılan neonatlar 24. ve 48., saatlerde kontrol edilerek, gözlemlere bağlı olarak ortamdaki ölü neonatlar günlük olarak uzaklaştırıldıktan sonra, 48 saatin sonunda kalan neonatlar mikrosantrifüj tüplerine aktararak biyokimyasal çalışmalarının yapılacağı güne değin -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi. Bütün enzim aktiviteleri, toplam protein miktarı ve diğer biyokimyasal parametrelerin (CAT hariç) ölçüm işlemleri, santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin, mikropleyt okuyucu sistem (Versamax, Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak yapıldı.

3.6.1 Tüm vücut homojenizatlarının hazırlanması

Homojenizasyona başlanırken, derin dondurucudan alınan ve mikrosantrifüj tüpleri içerisinde bulunan neonatların buz üzerinde çözünmesi sağlandı ve tartım yapıldı. Homojenizasyon, toplam neonat ağırlıklarının 5 katı hacimde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde: 0.15 M KCl; 1 mM EDTA; 0.05 mM DTT bulunmaktadır) ile bir buz kabında yapıldı. Neonat örnekleri mikrosantrifüj tüplerinde, buz kabı içinde, bir el-tipi homojenizatör kullanılarak, 30 saniye süreyle parçalandı. Elde edilen homojenat mikrosantrifüj tüplerine aktararak, homojenatlar 4 °C’de 16,000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj edildi (Allegra 64R, Beckman, ABD). Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak, elde edilen post-mitokondrial fraksiyonda bekletilmeksizin biyokimyasal ölçümler yapıldı. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz üzerinde tutuldu.

3.6.2 GST aktivitesi

GST aktivitesi ölçümünde substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Çalışmada Habig ve diğ. (1974)’nin geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar

yapılarak kullanıldı. Buna göre, 10 µl süpernatant alınarak, içerisinde potasyum fosfat tamponu (0.1 M, 100 µl pH 6.5), redükte glutatyon (2 mM, 100 µl GSH) ve CDNB (20 mM, 10 µl) bulunan ortamda reaksiyon başlatıldı ve 344 nm dalga boyunda 2 dakika süreyle absorbans okuması yapıldı. GSH reaksiyonda kofaktör olarak kullanıldı.

3.6.3 GR aktivitesi

GR aktivitesi Stephensen ve diğ. (2000) tarafından kullanılan yöntemle saptandı. Reaksiyon çözeltisi 0.1 mM, 150 µl 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 12 mM, 20 µl NADPH ve 20 µl örnek içerecek şekilde hazırlandı. 20 µl, 3.25 mM GSSG'nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon oda sıcaklığında 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorbans değerlerine göre GR aktivitesi hesaplandı (reaksiyon ürünü; 2-nitro-5-thiobenzoat anyonu için $\epsilon=14,151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.4 CAT aktivitesi

CAT aktivitesi Aebi (1974) tarafından kullanılan yöntemle saptandı bir spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Enzim aktivitesi, 240 nm dalga boyunda substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) tüketimine bağlı olarak saptandı. Bu amaçla 1 ml'lik kuvarz küvete, 20 µl örnek ve 480 µl 12.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) pipetlendi. 25°C'de 1 dakika süreyle absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.6.5 AChE aktivitesi

AChE aktivitesi ölçümünde Ellman ve diğ. (1961) tarafından geliştirilen yöntemin, Özmen ve diğ. (1998) tarafından modifiye edilmiş şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde asetiltiokolin iodid substrat olarak kullanıldı. Neonatlardan elde edilen süpernatant toplam reaksiyon karışımında 10 µl olacak şekilde mikroplyet çukurlarına pipetlendi. Süpernatantın üzerine son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ve 0.136 mM DTNB olacak şekilde, trizma tamponu içerisinde (0.1 M, pH 8.0) hazırlanmış karışımdan 200 µl ilave edildi. 25 °C'de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi kaydedildi.

3.6.6 CaE aktivitesi

CaE aktivitesi belirlenirken, Santhoshkumar ve Shivanandappa (1999) tarafından belirtilen spektrofotometrik yöntem mikroplyet okuyucu sisteme uyarlanarak kullanıldı.

Enzim aktivitesi ölçümünde *p*-nitrofenolasetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı. Buna göre mikropleyt kuyucuklarına 5 µl örnek pipetlendikten sonra ortama 250 µl, 0.05 M trizma 7.4 eklendi. 3 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 5 µl PNPA (karışımdaki konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde) eklenerek reaksiyon başlatıldı. 405 nm dalga boyunda 2 dakika boyunca absorbans okuması yapıldı.

3.6.7 GSH_{red} düzeyi

Redükte glutasyon düzeyi (GSH_{red}), DTNB kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. Parihar ve diğ. (1997)'nin yöntemi modifiye edilerek, 96 çukurlu mikropleytlere uyarlandı. Buna göre, 5 µl örnek, mikropleyt çukurlarına pipetlenecektir. Örneklerin üzerine 0.5 mM DTNB içeren 120 µl fosfat tamponuna (0.1 M, pH 6.8) ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, 412 nm'de absorbans düzeyleri ölçüldü. Örneklerdeki GSH_{red} düzeyi oluşturulan bir standart GSH (0.195-12.5 mM GSH) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı.

3.6.8 Toplam protein miktarı tayini

Neonat homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda toplam protein miktarları Bradford (1976) yöntemine göre, mikropleyt okuyucu sistemi kullanılarak belirlendi. Süpernatant örnekleri 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikropleyt kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µl Bradford çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen değerler BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, örnekteki toplam protein miktarları saptandı. Tüm örneklerden elde edilen toplam protein değerleri, elde edilen enzim aktivite değerleri ile birlikte, spesifik enzim aktivitesi değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

3.7 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi için GraphPad Prism 5 programı kullanıldı. *D. magna* neonatlarında, 48 saatlik ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değerlerinin saptanması için probit regresyon analizi yöntemi uygulandı (Finney, 1971). Hem morfolojik parametreler hem de biyokimyasal biyobelirteçlerin istatistiksel analizi için, veriler başlangıçta sırasıyla Bartlett ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile varyansların

homojenliği ve normallik dağılımları açısından test edildi. Parametrik olmayan veriler Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi ve ardından Dunn oklu karşılaştırma testi kullanıldı. Parametrik veriler, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi.



4. BULGULAR

4.1 Test Edilen Pestisitlerin *D. magna* için LC₅₀ Düzeyleri

Toksisitesi test edilen ticari pestisitlerden Glifosat Bazlı Herbisit (GBH, Roundup) 8.67-500 mg/L aralığında 10 ayrı konsantrasyonuna, 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* neonatları için elde edilen ölüm düzeylerinden hareketle LC₅₀ düzeyi 253.1 mg/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Toksisitesi test edilen diğer ticari Trifloksistrobin Bazlı Fungusit (TBF, mg/L) 9.43-100 µg/L aralığında 10 ayrı konsantrasyona, 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* neonatları için elde edilen ölüm düzeylerinden hareketle LC₅₀ düzeyi 20.71 mg/L olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1: Test edilen pestisitlerin *D. magna* neonatlarında LC₅₀ düzeyleri

Pestisit	Kons.	Kons. sayısı	n	LC ₅₀ (mg/L)	
				24 h	48 h
Glifosat Bazlı Herbisit (GBH , mg/L)	8.67-500	11	35	350.9 (295.9-435.0)	253.1 (212.9-287.9)
Trifloksistrobin Bazlı Fungusit (TBF, µg/L)	9.43-100	10	35	38.22 (34.87-41.96)	20.71 (18.25-22.95)

Çalışmada, test edilen pestisitlerin her bir konsantrasyonuna maruz bırakıldıktan sonra sağ kalan bireylerin boy, en ve spin ölçümleri alındı (Çizelge 4.2, 4.3). GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında boy ve spin açısından büyüme geriliği tespit edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: GBH'ye maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite ve gelişim verileri

Kons. (mg/L)	Ölüm (%)		Boy (mm)	En (mm)	Spine (mm)		
	24 s	48 s					
Baş.	-	-	1.158 ± 0.018	0.591 ± 0.011	0.411	0.007	
Kontrol	0	17	1.288 ± 0.021	0.706 ± 0.017	0.474 ± 0.010		
8.67	6	17	1.140 ± 0.018	***	0.662 ± 0.023	0.418 ± 0.016	
13.01	9	20	1.165 ± 0.022	**	0.652 ± 0.020	0.460 ± 0.024	
19.51	9	26	1.122 ± 0.019	***	0.677 ± 0.013	0.419 ± 0.011	
29.26	6	20	1.079 ± 0.013	***	0.685 ± 0.011	0.354 ± 0.012	***
43.9	0	14	1.106 ± 0.019	***	0.669 ± 0.014	0.346 ± 0.011	***
65.84	0	3	1.131 ± 0.024	***	0.686 ± 0.010	0.357 ± 0.008	***
98.77	9	17	1.128 ± 0.019	***	0.679 ± 0.011	0.358 ± 0.012	***
148.15	20	31	1.174 ± 0.021	*	0.672 ± 0.016	0.389 ± 0.011	***
222.22	26	46	1.099 ± 0.030	***	0.682 ± 0.010	0.367 ± 0.010	***
333.33	46	74	1.153 ± 0.033		0.700 ± 0.014	0.337 ± 0.014	***
500	74	100	-	-	-	-	

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

Test edilen diğer bir ticari pestisit olan Trifloksistrobin Bazlı Fungisit (TBF, Flint) letalitesinin değerlendirilmesine yönelik testlerden yola çıkılarak 24 ve 48 saatlik LC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.1). GBH'de olduğu gibi TBF için de her bir konsantrasyon için sağ kalan bireylerin boy, en ve spin ölçümleri alındı (Çizelge 4.3). GBH'den farklı olarak TBF'ye maruz bırakılan neonatlarda konsantrasyon ilişkili olmayan boy ve en geriliği tespit edildi ($p < 0.05$).

Çizelge 4.3: TBF'ye maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite ve gelişim verileri

Kons. (µg/L)	Ölüm (%)		Boy (mm)	En (mm)	Spine (mm)
	24 s	48 s			
Baş.	-	-	1.158 ± 0.018	0.591 ± 0.011	0.411 0.007
Kontrol	0	6	1.252 ± 0.026	0.713 ± 0.017	0.485 ± 0.011
9.43	0	9	1.281 ± 0.033	0.743 ± 0.023	0.494 ± 0.017
12.26	3	11	1.180 ± 0.023	0.645 ± 0.016 *	0.455 ± 0.011
15.94	3	34	1.140 ± 0.023 *	0.640 ± 0.018 *	0.433 ± 0.014
20.72	14	63	1.177 ± 0.035	0.688 ± 0.023	0.490 ± 0.017
26.93	20	63	1.131 ± 0.022 *	0.613 ± 0.019 **	0.443 ± 0.019
35.01	37	89	1.190 ± 0.156	0.618 ± 0.065	0.433 ± 0.028
45.52	71	100	-	-	-
59.17	77	100	-	-	-
76.92	97	100	-	-	-
100	94	100	-	-	-

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.2 *D. magna* Bireylerinin Pestisitlere Farklı Ortamlarda Maruz Bırakılması

Pestisitlerin letal düzeylerinin belirlenmesine yönelik çalışmalardan elde edilen verilerden hareketle, pestisitlere trofik transfer yoluyla maruz kalmanın etkilerini değerlendirmeye yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla, *Daphnia* suyu ortamında *C. vulgaris* ve *D. magna* bireyleri, Şekil 3.1'de belirtilen plana göre pestisitlere maruz bırakıldı.

Öncelikle, maruz bırakma öncesi ortama verilen stok solüsyonda bulunan *Chlorella* hücre sayısı ve özellikleri belirlendi ve “*Chlorella* ile beslenen” gruplarda maruz bırakma ortamındaki *Chlorella* düzeyinin 10^5 birey/mL olması sağlandı (Çizelge 4.4). Buna göre üç farklı çalışma için kültür ortamının yaşayan ve ölü *Chlorella* bireylerinin yüzdesi sırasıyla %70-30, %68-32 ve %62-38 olarak belirlendi.

Çizelge 4.4:*D. magna* neonat ve erginlerinin farklı ortamlarda pestisitlere maruz bırakma deneylerinde ortama ilave edilen *Chlorella* kültürlerinin özellikleri

Parametre	Farklı ortamlarda pestisitlere maruz bırakma deneyleri		
	Direkt	Dolaylı	Biyobelirteç
Toplam hücre kons. ($\times 10^5$ birey/mL)	62.4 \pm 10.9	94.0 \pm 21.3	92.7 \pm 25.9
Yaşayan hücre kons. ($\times 10^5$ birey/mL)	43.8 \pm 7.7	63.9 \pm 13.5	57.7 \pm 14.0
Ölü hücre kons. ($\times 10^5$ birey/mL)	18.5 \pm 3.7	30.1 \pm 8.0	35.1 \pm 12.7
Canlılık (%)	70.3 \pm 2.6	68.5 \pm 2.4	62.8 \pm 3.6
Ortalama hücre boyutu (μ m)	6.9 \pm 0.3	7.2 \pm 0.3	7.2 \pm 0.2
Toplam hücre sayısı	1378 \pm 241	2077 \pm 472	2049 \pm 572
Yaşayan hücre sayısı	968 \pm 170	1412 \pm 299	1274 \pm 311
Ölü hücre sayısı	410 \pm 81	665 \pm 177	775 \pm 281

4.2.1 *D. magna* neonatlarının farklı ortamlarda, pestisitlere direkt maruz bırakılması

Elde edilen veriler, kontrol grupları ile kıyaslandığında direkt GBH uygulamalarının letaliteyi konsantrasyon ilişkili olarak artırdığını göstermektedir. Beslenmeyen gruplarda LC_{50} ve $LC_{50}/2$ konsantrasyonları için letalite düzeyleri %80 ve %9, karışım yemle beslenen gruplar için %71 ve %31, *Chlorella* ile beslenen gruplarda ise %17 ve %6 olarak belirlenmiştir. Buna göre en az ölüm, *Chlorella* ile beslenen gruplarda belirlenmiştir. Ayrıca hem kontrol grubunda hem de $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/2$ konsantrasyonlarında *Chlorella* ile besleme neonat boylarında artışa neden olmuştur ($p < 0.05$). Kontrol grubunda olmasa da $LC_{50}/4$ ve $LC_{50}/2$ konsantrasyonlarında ortama karışım yem ilavesi de neonat boylarında artışa yol açmıştır ($p < 0.05$)

Çizelge 4.5: GBH'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite

Kons. (µg/L)	Grup	Ölüm (%)		Boy (mm) ^a	En (mm) ^a	Spin (mm) ^a
		24 s	48 s			
Baş.	-	-	-	1.124 ± 0.020	0.616 ± 0.013	0.392 ± 0.009
Kontrol	Beslenmeyen	0	0	1.097 ± 0.015	0.698 ± 0.012	0.419 ± 0.010
-	Karışım yemle beslenen	0	0	1.108 ± 0.023	0.700 ± 0.017	0.442 ± 0.018
-	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.342 ± 0.020 ^x	0.726 ± 0.015	0.468 ± 0.013 ^x
63.3	Beslenmeyen	0	6	1.255 ± 0.018 ^x	0.646 ± 0.011	0.395 ± 0.010
	Karışım yemle beslenen	0	11	1.247 ± 0.021 ^{x,y}	0.657 ± 0.013	0.431 ± 0.016
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.195 ± 0.031 ^{x,z}	0.672 ± 0.013	0.428 ± 0.011
126.6	Beslenmeyen	0	9	1.183 ± 0.019	0.641 ± 0.016	0.442 ± 0.009
	Karışım yemle beslenen	0	31	1.241 ± 0.024 ^{x,y}	0.664 ± 0.017	0.468 ± 0.013 ^x
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	6	1.290 ± 0.016 ^x	0.747 ± 0.035	0.429 ± 0.010
253.1	Beslenmeyen	6	80	1.017 ± 0.096	0.681 ± 0.041	0.424 ± 0.019
	Karışım yemle beslenen	6	71	1.102 ± 0.024	0.663 ± 0.022	0.420 ± 0.014
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	6	17	1.172 ± 0.027 ^z	0.639 ± 0.016 ^z	0.435 ± 0.011

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

^a:Morfolojik parametreler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

^x:Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^y:Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^z:*C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

TBF ile ilgili veriler incelendiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında TBF uygulamalarının letaliteyi konsantrasyon ilişkili olarak artırdığı belirlendi. Beslenmeyen gruplarda LC₅₀ ve LC₅₀/2 konsantrasyonları için letalite düzeyleri %9 ve %26, besin karışımları için %40 ve %11, *Chlorella* ile beslenen grupta ise %34 ve %11 olarak belirlenmiştir. GBH'den farklı olarak TBF'nin LC₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılan her üç grupta da, LC₅₀/2 konsantrasyonunun maruz bırakılanlarda ise beslenen (karışım yem ve *Chlorella* ile) gruplarda boy ve spin uzunluğunda gerilik belirlenmiştir.

Çizelge 4.6: TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite

Kons. (µg/L)	Grup	Ölüm (%)		Boy (mm) ^a	En (mm) ^a	Spin (mm) ^a
		24 s	48 s			
Baş.	-	-	-	1.124 ± 0.020	0.616 ± 0.013	0.392 ± 0.009
Kontrol	Beslenmeyen	0	0	1.238 ± 0.014	0.661 ± 0.008	0.427 ± 0.008
	Karışım yemle beslenen	0	0	1.224 ± 0.013	0.660 ± 0.007	0.413 ± 0.007
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.314 ± 0.015 ^x	0.715 ± 0.012	0.402 ± 0.006
5.18	Beslenmeyen	0	11	1.276 ± 0.015	0.663 ± 0.010	0.399 ± 0.008
	Karışım yemle beslenen	6	6	1.231 ± 0.015	0.668 ± 0.009	0.398 ± 0.007
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	3	1.231 ± 0.012 ^z	0.664 ± 0.008	0.397 ± 0.006
10.36	Beslenmeyen	26	26	1.244 ± 0.013	0.649 ± 0.010	0.404 ± 0.007
	Karışım yemle beslenen	11	11	1.176 ± 0.014	0.688 ± 0.011	0.386 ± 0.008 ^x
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	11	1.180 ± 0.014 ^z	0.678 ± 0.008	0.372 ± 0.009 ^x
20.71	Beslenmeyen	9	9	1.109 ± 0.015 ^x	0.665 ± 0.009	0.357 ± 0.008 ^x
	Karışım yemle beslenen	40	40	1.124 ± 0.019 ^{x,y}	0.684 ± 0.011	0.364 ± 0.018 ^x
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	11	34	1.125 ± 0.016 ^{x,z}	0.683 ± 0.019 ^z	0.350 ± 0.012 ^{x,z}

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

^a:Morfolojik parametreler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

^x:Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^y:Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^z:*C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

4.2.2 *D. magna* neonatlarının farklı ortamlarda, pestisitlere dolaylı maruz bırakılması

Direkt maruz bırakmadan farklı olarak, ortamlara pestisitler (GBH veya TBF) eklendikten sonra, 24 saat bekletilen üç ortam (beslenmeyen, karışım yemle beslenen ve *Chlorella* ile beslenen) santrifül edilmiş ve santrifüj sonrası pellet 1 mL NCM çözeltisi ile sulandırılarak içinde *Daphnia* neonatlarının bulunduğu ortama eklenmiştir.

Dolaylı GBH uygulamalarında en yüksek letalite düzeyi GBH'nin LC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılırken beslenmeyen *D. magna* örneklerinde %23 olarak belirlenmiştir. Direkt pestisit uygulaması ile kıyaslandığında dolaylı pestisit uygulaması letaliteyi önemli oranda azaltmıştır. Beslenmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında *Chlorella* ile beslenen bütün gruplarda boy, en ve spin düzeyleri önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$). Diğer yandan, GBH'nin LC₅₀ ve LC₅₀/2 konsantrasyonuna maruz

bırakılırken beslenmeyen veya karışım yemle beslenen gruplarda en ve spin açısından büyüme geriliği tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.7: GBH'ye farklı ortamlarda, dolaylı maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite.

Kons. (µg/L)	Grup	Ölüm(%)		Boy (mm) ^a	En (mm) ^a	Spin (mm) ^a
		24 h	48 h			
Baş	-	-	-	1.153 ± 0.016	0.618 ± 0.009	0.398 ± 0.006
Kontrol	Beslenmeyen	0	0	1.274 ± 0.014	0.755 ± 0.011	0.452 ± 0.010
	Karışım yemle beslenen	3	11	1.251 ± 0.013	0.756 ± 0.009	0.453 ± 0.009
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.515 ± 0.013 ^x	0.851 ± 0.011 ^x	0.504 ± 0.008 ^x
63.3	Beslenmeyen	6	11	1.283 ± 0.008	0.687 ± 0.007 ^x	0.400 ± 0.006 ^x
	Karışım yemle beslenen	9	14	1.310 ± 0.009	0.695 ± 0.004 ^{x,y}	0.390 ± 0.006 ^{x,y}
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	3	1.630 ± 0.012 ^x	0.797 ± 0.008	0.500 ± 0.007 ^x
126.6	Beslenmeyen	6	14	1.218 ± 0.012	0.685 ± 0.006 ^x	0.381 ± 0.007 ^x
	Karışım yemle beslenen	6	17	1.270 ± 0.010	0.686 ± 0.007 ^{x,y}	0.392 ± 0.009 ^{x,y}
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	3	1.590 ± 0.012 ^x	0.811 ± 0.008 ^x	0.498 ± 0.015 ^x
253.1	Beslenmeyen	11	23	1.253 ± 0.014	0.720 ± 0.008	0.404 ± 0.008
	Karışım yemle beslenen	9	14	1.244 ± 0.015	0.735 ± 0.008	0.431 ± 0.009
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	3	1.563 ± 0.013 ^x	0.820 ± 0.010 ^x	0.504 ± 0.007 ^x

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

^a:Morfolojik parametreler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

^x:Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^y:Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^z:*C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

Dolaylı TBF uygulamalarında en yüksek letalite düzeyi TBF'nin LC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılırken karışım yemle beslenen ve beslenmeyen *D. magna* örneklerinde sırasıyla %29 ve %26 olarak belirlenmiştir. GBH'de olduğu gibi direkt pestisit uygulaması ile kıyaslandığında dolaylı TBF uygulaması letaliteyi önemli oranda azaltmıştır. Yine dolaylı GBH uygulamasında olduğu gibi, beslenmeyen kontrol grubu ile kıyaslandığında *Chlorella* ile beslenen bütün gruplarda boy düzeylerinde önemli oranda artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Diğer yandan, TBF'nin her üç konsantrasyonuna maruz bırakılırken beslenmeyen veya karışım yemle beslenen gruplarda boy, en ve spin açısından büyüme geriliği tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.8: TBF'ye farklı ortamlarda, dolaylı maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında zamana bağlı toksisite

Kons. (µg/L)	Grup	Ölüm (%)		Boy (mm) ^a	En (mm) ^a	Spin (mm) ^a
		24 h	48 h			
Baş	-	-	-	1.153 ± 0.016	0.618 ± 0.009	0.398 ± 0.006
Kontrol	Beslenmeyen	0	0	1.274 ± 0.014	0.755 ± 0.011	0.452 ± 0.010
	Karışım yemle beslenen	3	11	1.251 ± 0.013	0.756 ± 0.009	0.453 ± 0.009
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.515 ± 0.013 ^x	0.851 ± 0.011 ^x	0.504 ± 0.008
5.18	Beslenmeyen	6	6	1.254 ± 0.013	0.664 ± 0.008 ^x	0.390 ± 0.007 ^x
	Karışım yemle beslenen	9	17	1.247 ± 0.011	0.677 ± 0.006 ^{x,y}	0.396 ± 0.006 ^{x,y}
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.323 ± 0.007 ^z	0.722 ± 0.006 ^z	0.431 ± 0.007 ^z
10.36	Beslenmeyen	11	23	1.232 ± 0.012	0.633 ± 0.008 ^x	0.387 ± 0.006 ^x
	Karışım yemle beslenen	11	23	1.203 ± 0.014	0.664 ± 0.008 ^{x,y}	0.401 ± 0.007 ^{x,y}
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	0	0	1.351 ± 0.009 ^{x,z}	0.704 ± 0.007 ^z	0.393 ± 0.009 ^{x,z}
20.71	Beslenmeyen	14	26	1.157 ± 0.010 ^x	0.654 ± 0.008 ^x	0.367 ± 0.007 ^x
	Karışım yemle beslenen	14	29	1.254 ± 0.009	0.689 ± 0.005 ^{x,y}	0.384 ± 0.009 ^{x,y}
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	6	6	1.316 ± 0.009 ^x	0.683 ± 0.008 ^{x,z}	0.398 ± 0.008 ^{x,z}

n: Her konsantrasyon için 5x7 = 35 birey kullanılmıştır.

^a:Morfolojik parametreler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi.

^x:Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^y:Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

^z:*C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.05$).

4.2.3 *D. magna* erginlerinin biyokimyasal analizler için farklı ortamlarda, pestisitlere direkt maruz bırakılması

Çalışmanın bu aşamasında neonatlar yerine ergin bireyler tercih edildi. Tek başına pestisit uygulamalarından elde edilen verilerden hareketle, pestisitlere trofik transfer yoluyla maruz kalmanın subletal etkilerini değerlendirmeye yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla, *Daphnia* suyu ortamında *C. vulgaris* ve *D. magna* bireyleri, Şekil 4.1'de verilen maruz bırakma planına göre pestisitlere maruz bırakıldı. Elde edilen veriler, kontrol grubu ile kıyaslandığında GBH uygulamalarının letaliteyi konsantrasyon ilişkili olarak artırdığını gösterdi. Beslenmeyen gruplarda LC₅₀ ve LC₅₀/2 konsantrasyonları için letalite düzeyleri %33 ve %18, karışım yemle beslenen gruplarda %29 ve %9 *Chlorella* ile beslenen gruplarda ise %20 ve %6 olarak belirlenmiştir. Ancak neonat uygulamasından farklı olarak bu toksisite testinde beslenmeyen, karışım yemle beslenen ve *Chlorella* ile beslenen kontrol gruplarında da sırasıyla %11, 14 ve 9 düzeyinde ölüm belirlendi.

GBH'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde biyobelirteç düzeyleri incelendiğinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GST ve CAT aktiviteleri için istatistiksel olarak önemli farklılıklar belirlenmiştir (Çizelge 4.9) ($p<0.05$). Kontrol gruplarında GST aktivitesi, beslenmeyen, karışım yemle beslenen ve *Chlorella* ile beslenen gruplar için sırasıyla 90, 119 ve 101 nmol/dak/mg protein olarak belirlenirken, GBH'nin LC₅₀/4 konsantrasyonuna maruz bırakılan aynı gruplarda sırasıyla 186,194 ve 149 nmol/dak/mg protein olarak belirlenmiştir. GBH'nin LC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılırken *Chlorella* ile beslenen grupta da hem beslenmeyen hem de *Chlorella* ile beslenen kontrol gruplarıyla kıyaslandığında enzim aktivitesinde önemli düzeyde artış belirlenmiştir ($p<0.05$).

TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde GST aktivitesi LC₅₀/4 ve LC₅₀/2 konsantrasyonlarına maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde enzim aktivitesinde azalış belirlense de istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir (Çizelge 4.10) ($p>0.05$). CAT aktivitesinde, *Chlorella* ile beslenen grup haricindeki gruplarda (beslenmeyen ve karışım yemle beslenen) kontrol gruplarıyla kıyaslandığında önemli düzeyde artış belirlenmiştir ($p<0.05$). Diğer biyokimyasal belirteçlerde ise uygulama ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir.

Çizelge 4.9: GBH'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde biyobelirteç düzeyleri

Kons. (mg/L)	Grup	Ölüm (%)		GST ^a	GR ^a	CaE ^a	CAT ^a	ACHE ^a	GSH _{red} ^b
		24 s	48 s						
Kontrol	Beslenmeyen	3	11	89.9 ± 12.71	4.33 ± 1.23	1794 ± 218	25.21 ± 7.34	8.34 ± 2.52	3.85 ± 0.78
	Karışım yemle beslenen	7	14	119.0 ± 12.01	2.42 ± 0.76	2045 ± 201	25.54 ± 6.48	12.21 ± 3.48	3.68 ± 0.81
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	9	100.8 ± 17.86	1.28 ± 0.38	2207 ± 56	51.13 ± 20.62	10.67 ± 1.54	2.96 ± 0.11
63.3	Beslenmeyen	10	14	186.1 ± 6.39 ^x	1.39 ± 0.47	2130 ± 78	43.19 ± 8.88	11.71 ± 2.18	4.00 ± 0.48
	Karışım yemle beslenen	8	21	193.7 ± 9.81 ^{x,y}	4.56 ± 0.29	2573 ± 218	82.12 ± 22.21	12.90 ± 1.68	5.16 ± 0.38
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	7	7	148.5 ± 9.60 ^x	4.30 ± 1.29	2163 ± 129	63.79 ± 7.22	9.66 ± 1.11	3.29 ± 0.31
126.6	Beslenmeyen	10	18	115.7 ± 5.99	3.88 ± 0.32	1595 ± 125	70.15 ± 2.47	10.65 ± 1.67	3.08 ± 0.40
	Karışım yemle beslenen	4	9	113.1 ± 9.34	4.57 ± 2.27	1755 ± 251	98.74 ± 23.65	11.98 ± 2.24	3.91 ± 0.73
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	6	6	116.9 ± 11.36	3.03 ± 0.63	1667 ± 129	76.74 ± 10.66	13.35 ± 2.01	2.85 ± 0.37
253.1	Beslenmeyen	17	33	111.4 ± 7.72	10.75 ± 0.12	2220 ± 340	142.8 ± 24.06 ^x	16.54 ± 2.25	6.18 ± 0.74
	Karışım yemle beslenen	16	29	134.0 ± 4.55	4.85 ± 0.78	2265 ± 392	159.0 ± 52.17 ^{x,y}	18.60 ± 6.77	5.53 ± 1.03
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	15	20	164.4 ± 8.88 ^{x,z}	3.18 ± 0.65	1990 ± 68	98.69 ± 9.53 ^x	11.41 ± 1.19	3.81 ± 0.39

n: Her konsantrasyon için 5x25 = 125 birey kullanılmıştır.

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: GSH_{red} düzeyi nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^x: Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

^y: Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

^z: *C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.10: TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde biyobelirteç düzeyleri

Kons. (µg/L)	Grup	Ölüm (%)		GST ^a	GR ^a	CaE ^a	CAT ^a	ACHE ^a	GSH _{red} ^b
		24 s	48 s						
Kontrol	Beslenmeyen	3	11	89.9 ± 12.71	4.33 ± 1.23	1794 ± 218	25.2 ± 7.34	8.34 ± 2.52	3.85 ± 0.78
	Karışım yemle beslenen	7	14	119.0 ± 12.01	2.42 ± 0.76	2045 ± 201	25.5 ± 6.48	12.21 ± 3.48	3.68 ± 0.81
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	3	9	100.8 ± 17.86	1.28 ± 0.38	2207 ± 56	51.1 ± 20.62	10.67 ± 1.54	2.96 ± 0.11
5.18	Beslenmeyen	10	14	84.1 ± 11.14	5.14 ± 1.81	1324 ± 99	88.2 ± 10.62	12.33 ± 0.67	4.02 ± 0.38
	Karışım yemle beslenen	17	27	42.1 ± 8.37	3.20 ± 1.00	1457 ± 189	126.3 ± 20.08 ^{x,y}	22.14 ± 4.92	4.22 ± 0.49
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	8	12	76.3 ± 12.70	3.27 ± 1.05	1342 ± 68	73.9 ± 9.01	10.93 ± 0.69	2.67 ± 0.14
10.36	Beslenmeyen	22	29	31.1 ± 4.30	6.31 ± 1.77	1617 ± 108	156.2 ± 24.61 ^x	17.88 ± 1.49	6.02 ± 0.80
	Karışım yemle beslenen	21	24	66.9 ± 12.33	4.91 ± 1.42	1567 ± 111	113.6 ± 12.92 ^{x,y}	19.55 ± 3.21	4.90 ± 0.64
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	4	7	45.1 ± 4.63	2.38 ± 0.74	1445 ± 93	67.0 ± 4.75	10.97 ± 1.12	2.39 ± 0.26
20.71	Beslenmeyen	21	39	159.7 ± 11.36	4.10 ± 0.50	2356 ± 482	122.6 ± 21.63 ^{x,y}	18.09 ± 5.44	5.29 ± 0.64
	Karışım yemle beslenen	34	49	115.6 ± 11.88	2.83 ± 1.91	2266 ± 369	104.9 ± 17.94 ^x	12.60 ± 5.37	5.54 ± 1.16
	<i>Chlorella</i> ile beslenen	12	15	119.9 ± 14.86	5.01 ± 1.27	1481 ± 81	74.5 ± 10.28	7.35 ± 0.93	2.88 ± 0.25

n: Her konsantrasyon için 5x25 = 125 birey kullanılmıştır.

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: GSH_{red} düzeyi nmol/mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^x: Beslenmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

^y: Karışım yem ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

^z: *C. vulgaris* ile beslenen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.05$).

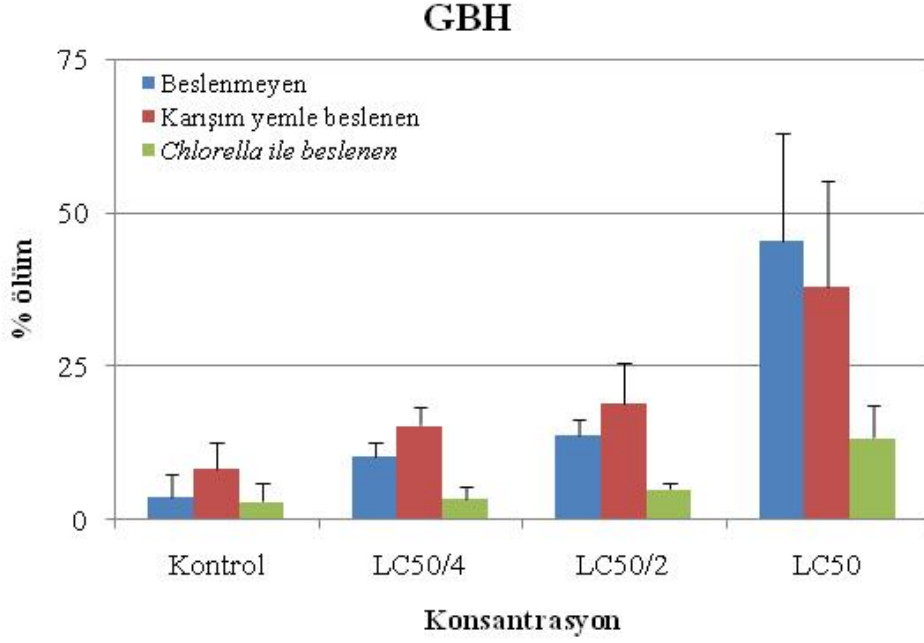
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glifosat bazlı herbisitlerin (GBH) toksisitesinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma olduğu ve ticari formülasyonlarda bulunan sürfaktan maddelerin pestisit formülasyonunun toksisitesini büyük oranda etkilediği bilinmektedir. Ticari formülasyonlardan en iyi bilinenlerden biri Roundup'tır (Turhan ve diğ., 2020). Bu formülasyonun toksisitesi çok sayıda omurgalı ve omurgasız organizmada ortaya konmuştur. Roundup formülasyonunda sürfaktan olarak kullanılan polioksietilen tallov amin'in (POEA) toksisiteyi önemli ölçüde artırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada farklı bir ticari GBH formülasyonunun etkileri incelenmiştir. İlgili literatür incelediğinde *D. magna* için glifosat ve farklı GBH formülasyonlarının LC₅₀ değerlerinin oldukça değişken olduğu görülmektedir (Cuhra ve diğ., 2013). Örneğin, *D. magna* ile toksisite testlerinin yapıldığı çalışmalarda GBH'ler için LC₅₀ değerleri 13 ila 24 mg/L (FAO, 2016) ila 2000 mg/L arasında değişmektedir (Pereira ve diğ., 2009). Çalışmamızda GBH'nin *D. magna* için 48 saatlik LC₅₀ değeri 253.1 mg/L gibi görece yüksek bir düzeyde belirlenmiştir.

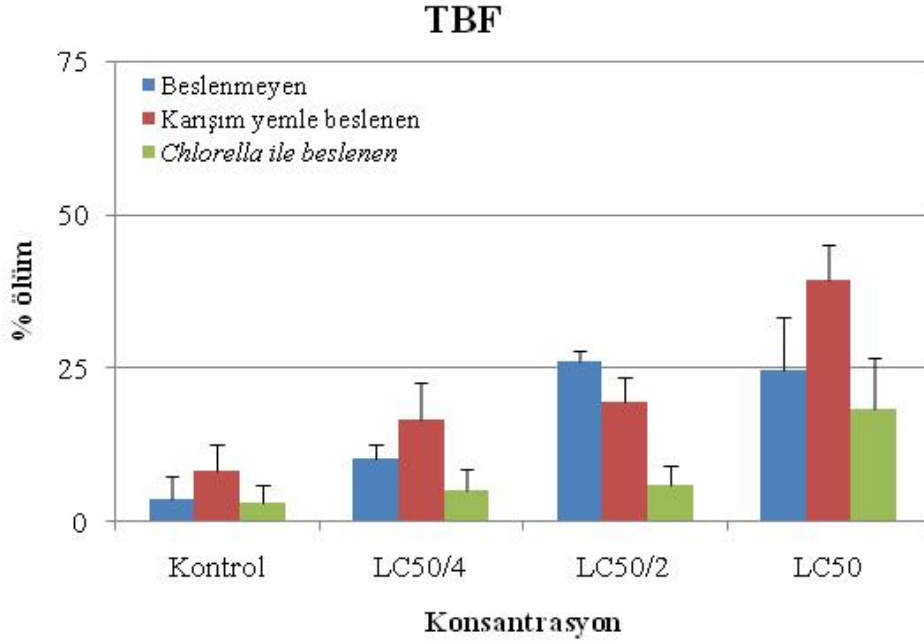
Strobilurinler, dünyada en yaygın kullanılan yeni bir fungusit sınıfını oluşturmaktadır. Daha önceki çalışmalarda üç yaygın strobilurin fungusitinin (kresoksim-metil, pyraklostrobin ve trifloksistrobin) *D. magna* için 48 saatlik LC₅₀ düzeyleri sırasıyla 443.3, 20.9 ve 23.0 µg/L olarak belirlenmiştir (Cui ve diğ., 2017). Çalışmamızda TBF'nin *D. magna* için 48 saatlik LC₅₀ değeri ise 20.7 µg/L olarak belirlenmiş olup literatürde belirtilen değere çok yakındır.

Farklı ortamların pestisit toksisitesi üzerine etkileri değerlendirilirken üç toksisite çalışmasında elde edilen letalite verileri birleştirildiğinde, letalitenin hem GBH ve hem de TBF için konsantrasyon ilişkili olarak arttığı görülmektedir (Şekil 5.1 ve 5.2). Buna göre hem GBH hem de TBF için *Chlorella* ile beslemenin *D. magna* için letaliteyi azalttığı söylenebilir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir: (i) *Chlorella*, pestisitleri tutuklayıp metabolize ediyor ve toksisitesini azaltıyor olabilir (ii) *Chlorella* varlığı *Daphnia*'ların pestisitle etkileşimini sınırlıyor olabilir. Steroid östrojenlerin biyomagnifikasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, östronun sulu ortam yoluyla doğrudan alım düzeyinin (biyokonsantrasyon) *C. vulgaris* yoluyla alımdan (biyomagnifikasyon) daha yüksek bir

birikime neden olduğu gösterilmiştir. Belirtilen çalışmada, besin kaynağı olan *C. vulgaris* yoluyla *D. magna*'ya östron transferinin daha az önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Gomes ve diğ, 2004).

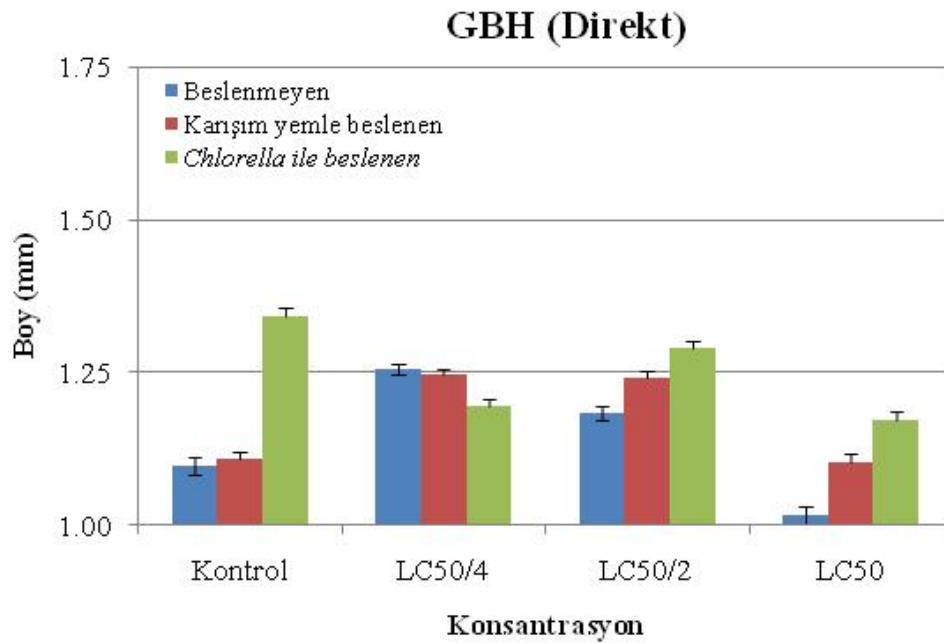


Şekil 5.1: GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde letalite düzeyleri (Çizelge 4.5, 4.7 ve 4.9'da verilen letalite verilerinden hazırlanmıştır)

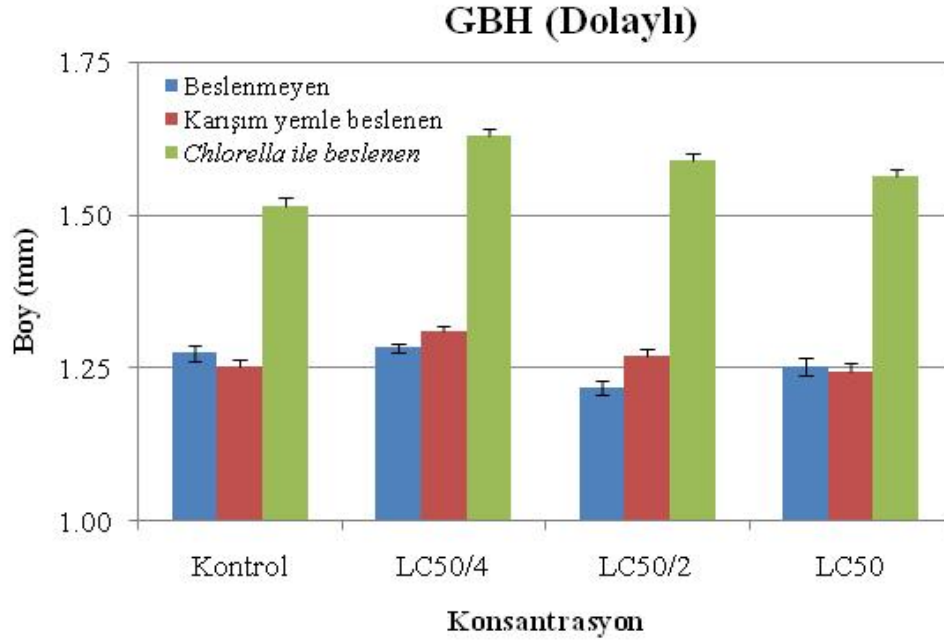


Şekil 5.2: TBF'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *Daphni magna* bireylerinde letalite düzeyleri (Çizelge 4.6, 4.8 ve 4.10'da verilen letalite verilerinden hazırlanmıştır)

GBH için farklı ortamların pestisit toksisitesi üzerine etkilerinin değerlendirilirken neonat boyutlarının direkt ve dolaylı maruz kalma durumunda birbirinden farklı etkilere neden olduğu görülmektedir. Hem direkt hem de dolaylı pestisit maruziyetinde diğer gruplardan farklı olarak *Chlorella* ile beslenen grupta boyda önemli bir artış olurken, direkt uygulamada en yüksek uygulama konsantrasyonu boy uzunluğunda geriliğe neden olmuştur (Şekil 5.3 ve 5.4). Mikroplastiklerin *D. magna* üzerine toksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, mikroplastikler yetişkinlerinin morfolojik yapısını etkilenmese de, neonat vücut uzunluğu, vücut genişliği ve spin uzunluğunda farklılıklara neden olmuştur (Imhof ve diğ, 2017).

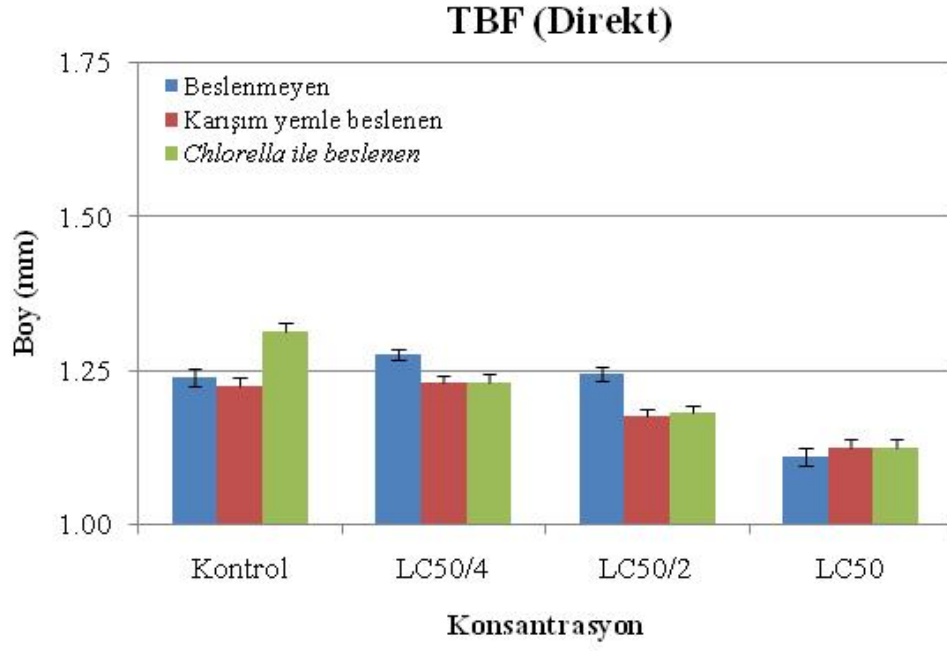


Şekil 5.3: GBH'ye 48 saat süreyle direkt maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında boy uzunluğu (Çizelge 4.5 verilen verilerinden hazırlanmıştır)

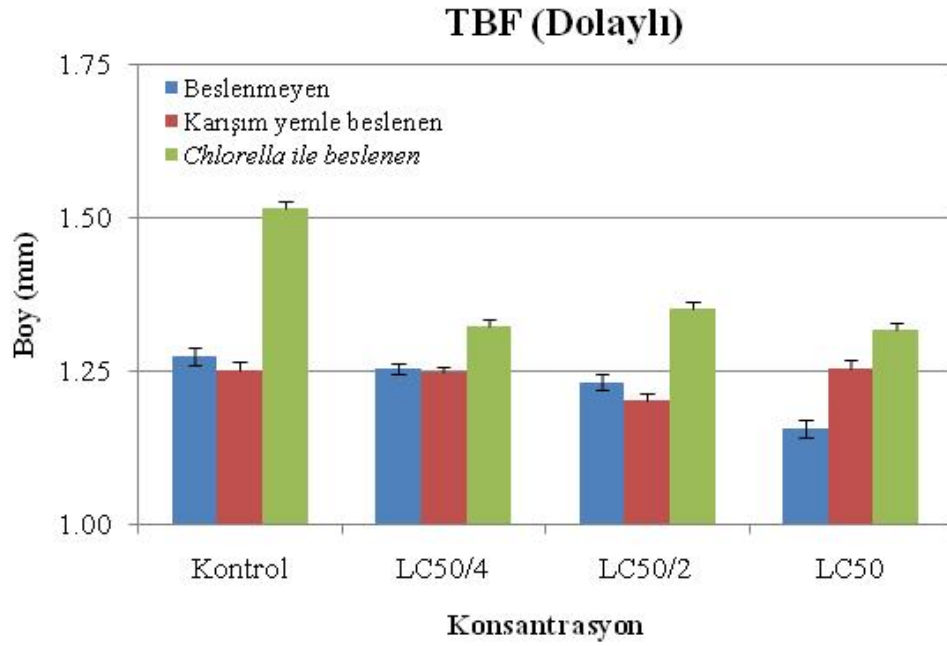


Şekil 5.4: GBH'ye 48 saat süreyle dolaylı maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında boy uzunluğu (Çizelge 4.7'de verilen verilerinden hazırlanmıştır)

GBH'ye benzer şekilde TBF için farklı ortamların pestisit toksisitesi üzerine etkileri değerlendirilirken neonat boyutlarının, direkt ve dolaylı maruz kalma durumunda birbirinden farklı etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Yine, dolaylı TBF maruziyetinde *Chlorella* ile beslenen grupta boyda önemli bir artış olurken, direkt uygulama gruplarının hepsinde konsantrasyon ilişkili olarak boy uzunluğunda gerilik belirlenmiştir (Şekil 5.5 ve 5.6). Bazı kirleticilerin alg varlığında toksisitesinin azaldığı ve bu da serbest halde toksik etkilerini gösteren kirleticilerin alglere bağlanması nedeniyle toksisitelerinin azalması ile ilişkilendirilmiştir (Taylor ve diğ, 1998).

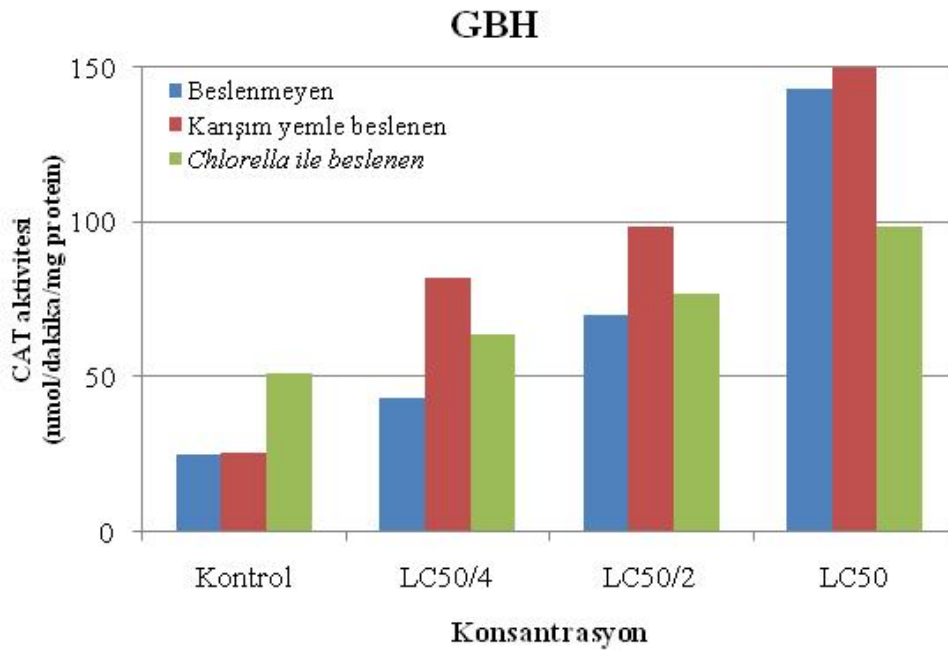


Şekil 5.5: TBF'ye 48 saat süreyle direkt maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında boy uzunluğu (Çizelge 4.6'da verilen verilerinden hazırlanmıştır)



Şekil 5.6: TBF'ye 48 saat süreyle dolaylı maruz bırakılan *D. magna* neonatlarında boy uzunluğu (Çizelge 4.8'de verilen verilerinden hazırlanmıştır)

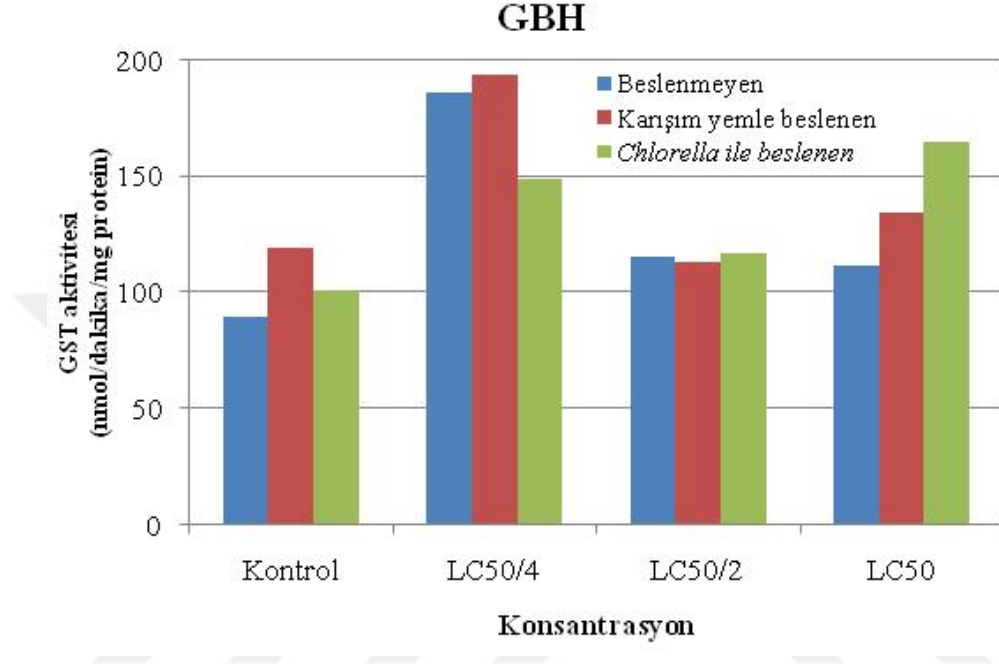
Bu çalışmada, letalite verileri ile CAT aktiviteleri dikkate alındığında hem GBH (Şekil 5.8) hem de TBF'nin CAT aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Pestisit konsantrasyonundaki artışla birlikte letalitenin düzeyi ve CAT aktivitesinin birlikte artışı oksidatif stresle mücadele mekanizması olarak düşünülmektedir. Bir tıbbi ilaç olan diklofenakın *D. magna*'da yüksek MDA içeriğine neden olduğu ve bunun nispeten güçlü oksidatif stres başlattığını, buna karşın antioksidatif stresten korumanın daha az ölçüde uyarıldığını gösterilmiştir. *D. magna*'yı oksidatif hasardan korumak için antioksidan enzimlerin uyarılmasının ve SOD, CAT ve GR enzimlerinin eliminasyon yeteneğinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Gomez-Olivan ve diğ, 2014).



Şekil 5.7: GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde CAT aktivitesi (Çizelge 4.9'da verilen verilerden hazırlanmıştır)

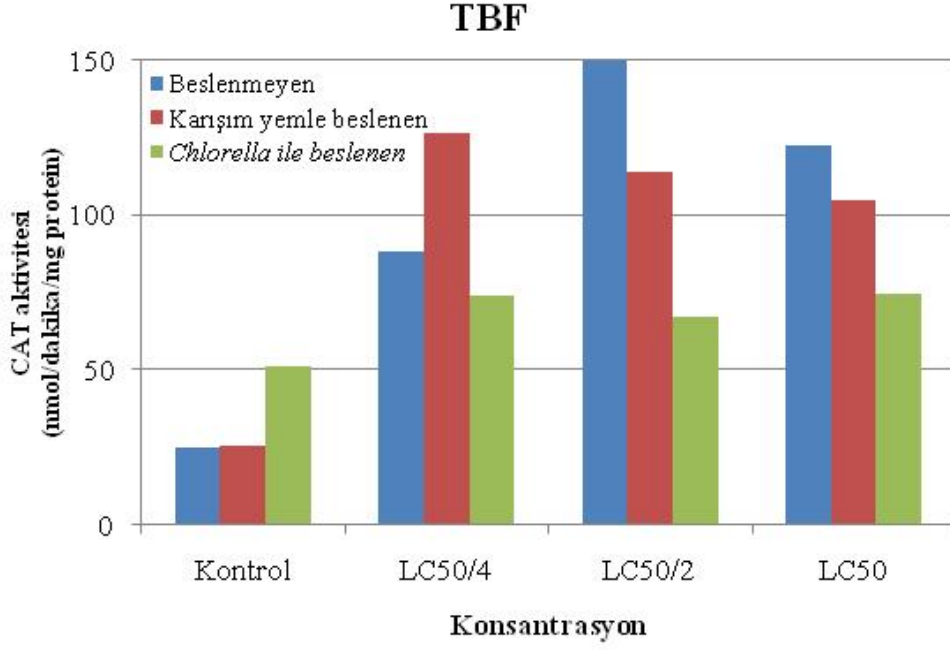
GBH'nin LC₅₀/4 konsantrasyonuna maruz bırakılırken beslenmeyen, karışım yemle beslenen ve *Chlorella* ile beslenen gruplarda GST aktivitesinde, aynı ortamlarda tutulan kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında sırasıyla, %107, 63 ve 48 oranında artış belirlenmiştir (Şekil 5.8). Ayrıca GBH'nin LC₅₀ konsantrasyonuna maruz bırakılırken *Chlorella* ile beslenen grupta da hem beslenmeyen hem de *Chlorella* ile beslenen kontrol gruplarıyla kıyaslandığında enzim aktivitesinde önemli düzeyde artış belirlenmiştir ($p < 0.05$). Daha önceki çalışmalarda siyanobakteriyel mikrosistin varlığında GST aktivitesinin indüksiyonu gösterilmiş ve *Daphnia*'daki GST indüksiyonunun

detoksifikasyondan ziyade bir oksidatif stres tepkisi nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır (Sadler ve von Elert, 2014). Daha yüksek konsantrasyonlarda ise bu ölçüde bir artış olmaması letalite ile GST düzeyi arasında bir paralelliğin olmadığını göstermektedir. Önceden yapılan bir çalışmada da Cr^{6+} , Cd^{2+} ve diazinon maruziyetinde GST düzeyi ile *D. magna*'nın letalitesi arasında bir bağlantı bulunamamıştır (Jemec ve diğ, 2007).



Şekil 5.8: GBH'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde GST aktivitesi (Çizelge 4.9'da verilen verilerden hazırlanmıştır)

TBF'ye farklı ortamlarda, direkt maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde CAT aktivitesinde, *Chlorella* ile beslenen grup haricindeki gruplarda (beslenmeyen ve karışım yemle beslenen) kontrol gruplarıyla kıyaslandığında önemli düzeyde artış belirlenmiştir (Şekil 5.9) ($p < 0.05$). Diğer biyokimyasal belirteçler için ise uygulama ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiştir. Letaliteye benzer şekilde *Chlorella* ile beslenen gruplarda CAT aktivitesinin de indüklenmemesinden dolayı oksidatif stres ve toksik etkinin sınırlandığı sonucuna varılabilir.



Şekil 5.9: TBF'ye 48 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* erginlerinde CAT aktivitesi (Çizelge 4.10'da verilen verilerden hazırlanmıştır)

Sonuç olarak, bu çalışma GBH ve TBF'nin *D. magna*'da toksik etki gösterdiğini, morfolojik ve biyokimyasal parametrelerin bazılarının konsantrasyon ilişkili yanıtlara neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle boy uzunluklarının 48 saatlik bir maruziyette değişiklik göstermesi, bu biyobelirteçlerin olası bir pestisit toksisitesini açıklamada önemli yanıtlar olacağını göstermektedir. CAT aktivitesinin letalitedeki artışla birlikte artması, oksidatif stresin letalite ile ilişkili olduğunu ve CAT'nin biyobelirteç olma potansiyelinin diğer belirteçlere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, trofik transferle yanıtların değişimi incelendiğinde ise *Chlorella* ile beslenen grupların, beslenmeyen veya karışım yemle beslenen gruplara göre letalite düzeylerinin düştüğü görülmektedir. Bu da trofik transfer yoluyla madde transferinin gerçekleşmediği veya *Chlorella* varlığında toksisitenin azaldığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Achar, J. C., Kim, D. Y., Kwon, J. H., & Jung, J. (2020). Toxicokinetic modeling of octylphenol bioconcentration in *Chlorella vulgaris* and its trophic transfer to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 110379.
- Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmayer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press.
- Alvarez-Diaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragan, J., Garrido-Perez, M. C., & Perales, J. A. (2017). Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 24, 477-485.
- Barata, C., Solayan, A., & Porte, C. (2004). Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 66(2), 125-139.
- Belden, J., McMurry, S., Smith, L., & Reilley, P. (2010). Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(11), 2477-2480.
- Benbrook, C. M. (2019). How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 2.
- Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bacchetta, R. (2004). Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology*, 70(3), 189-200.
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., & Colombo, A. (2018). A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 195, 103-113.
- Bownik, A. (2017). *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment*, 601, 194-205.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braune, B. M., & Norstrom, R. J. (1989). Dynamics of Organochlorine Compounds in Herring-Gulls - .3. Tissue Distribution and Bioaccumulation in Lake-Ontario Gulls. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(10), 957-968.
- Calow, P. (1993). *Handbook of ecotoxicology*. London ; Boston: Blackwell Scientific Publications.
- Carvalho, W. F., Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J. M., Laborde, M. R. R., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial

formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*.

- Casarett, L. J., Doull, J., & Klaassen, C. D. (2001). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons* (6th ed.). New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division.
- Cuhra, M., Traavik, T., & Bohn, T. (2013). Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, 22(2), 251-262.
- Cui, F., Chai, T., Liu, X., & Wang, C. (2017). Toxicity of three strobilurins (kresoxim-methyl, pyraclostrobin, and trifloxystrobin) on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(1), 182-189.
- da Silva, M. B., Abrantes, N., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C., Freitas, A. C., Gomes, A. M. (2016). Effects of dietary exposure to herbicide and of the nutritive quality of contaminated food on the reproductive output of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 179, 1-7.
- Demirsoy, A. (2003). *Yaşamın Temel Kuralları, Cilt 2, Kısım 1, OMURGASIZLAR-Böcekler Dışında İnvertebrata*.
- Drouillard, K. G. (2008). Biomagnification. In B. Fath (Ed.), *Encyclopedia of Ecology* (2 ed., Vol. 1, pp. 353-358). London: Elsevier.
- Ebert, D. (2005). Introduction to *Daphnia* Biology (Chapter 2) *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>.
- Edge, C., Gahl, M., Thompson, D., Hao, C., & Houlahan, J. (2014). Variation in amphibian response to two formulations of glyphosate-based herbicides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(11), 2628-2632.
- Edginton, A. N., Sheridan, P. M., Stephenson, G. R., Thompson, D. G., & Boermans, H. J. (2004). Comparative effects of pH and Vision (R) herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 815-822.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides: Glyphosate, N-(Phosphonomethyl)Glycine http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate.
- Favari, L., Lopez, E., Martinez-Tabche, L., & Diaz-Pardo, E. (2002). Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnification study. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 51(3), 177-186.

- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, *16*(2), 401-426.
- Gomes, R. L., Deacon, H. E., Lai, K. M., Birkett, J. W., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2004). An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *23*(1), 105-108.
- Gomez-Olivan, L. M., Galar-Martinez, M., Garcia-Medina, S., Valdes-Alanis, A., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. (2014). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, *37*(4), 391-399.
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *54*(6), 1665-1669.
- Gosset, A., Durrieu, C., Renaud, L., Deman, A. L., Barbe, P., Bayard, R. (2018). Xurography-based microfluidic algal biosensor and dedicated portable measurement station for online monitoring of urban polluted samples. *Biosensors & Bioelectronics*, *117*, 669-677.
- Gungordu, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, *140-141*, 220-228.
- Gungordu, A., Uckun, M., & Yologlu, E. (2016). Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. *Chemosphere*, *144*, 2024-2035.
- Gupta, R. C. (2006). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Amsterdam ; London: Elsevier Academic Press.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*, *16*(5), 490-491.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(22), 7130-7139.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution*, *112*(1), 1-10.
- Hansen, L. R., & Roslev, P. (2016). Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, *179*, 36-43.

- Hong, Y. H., Yang, X. Z., Huang, Y., Yan, G. W., & Cheng, Y. X. (2018). Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. *Chemosphere*, 210, 896-906.
- Imhof, H. K., Rusek, J., Thiel, M., Wolinska, J., & Laforsch, C. (2017). Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? *Plos One*, 12(11).
- Iswarya, V., Bhuvaneshwari, M., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2018). Trophic transfer potential of two different crystalline phases of TiO₂ NPs from *Chlorella sp.* to *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology*, 197, 89-97.
- Iummato, M. M., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., Cochon, A. C., Cataldo, D., de Molina, M. (2018). Biochemical responses of the golden mussel *Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 69-75.
- Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Trebse, P., Ros, M., & Sepcic, K. (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 144(4), 303-309.
- Jonczyk, E., & Gilron, G. (2005). Acute and Chronic Toxicity Testing with *Daphnia sp.* In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. Dordrecht: Springer.
- Junges, C. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Cabagna Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere*, 87(11), 1348-1354.
- Khoshnamvand, M., Hao, Z., Fadare, O. O., Hanachi, P., Chen, Y., & Liu, J. (2020). Toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 258, 127346.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Junges, C. M., & Cabagna, M. C. (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 681-689.
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water Air and Soil Pollution*, 224(3).
- Li, J. M., Smeda, R. J., Sellers, B. A., & Johnson, W. G. (2005). Influence of formulation and glyphosate salt on absorption and translocation in three annual weeds. *Weed Science*, 53(2), 153-159.
- Liu, J., & Chen, F. (2014). Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects. In C. Posten & S. Feng Chen (Eds.), *Microalgae Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 153). Cham: Springer.

- Liu, Y. H., Feng, Y. M., Li, J. R., Zhou, D. S., Guo, R. X., Ji, R. (2020). The bioaccumulation, elimination, and trophic transfer of BDE-47 in the aquatic food chain of *Chlorella pyrenoidosa*-*Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 258.
- Liu, Y. H., Guo, R. X., Tang, S. K., Zhu, F. Y., Zhang, S. H., Yan, Z. Y. (2018). Single and mixture toxicities of BDE-47, 6-OH-BDE-47 and 6-MeO-BDE-47 on the feeding activity of *Daphnia magna*: From behavior assessment to neurotoxicity. *Chemosphere*, 195, 542-550.
- Mackay, D., Celsie, A. K. D., Arnot, J. A., & Powell, D. E. (2016). Processes influencing chemical biomagnification and trophic magnification factors in aquatic ecosystems: Implications for chemical hazard and risk assessment. *Chemosphere*, 154, 99-108.
- Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Kenneth Mellanby Review Award. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, 110(3), 375-391.
- Maltby, L., Brock, T. C. M., & van den Brink, P. J. (2009). Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. *Environmental Science & Technology*, 43(19), 7556-7563.
- Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2), 193-199.
- Marrs, T. C., & Ballantyne, B. (2004). *Pesticide toxicology and international regulation*. Chichester: J. Wiley.
- Moore, L. J., Fuentes, L., Rodgers, J. H., Jr., Bowerman, W. W., Yarrow, G. K., Chao, W. Y. (2012). Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 128-133.
- OECD. (2004). *Guideline for testing of Chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilization Test. OECD 202, Paris*.
- Ozmen, M., Dominguez, S. E., & Fairbrother, A. (1998). Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(2), 194-201.
- Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K., & Prakash, P. (1997). Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22(2), 151-156.
- Peng, F. Q., Ying, G. G., Yang, B., Liu, Y. S., Lai, H. J., Zhou, G. J. (2014). Biotransformation of the Flame Retardant Tetrabromobisphenol-a (Tbbpa) by Freshwater Microalgae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(8), 1705-1711.
- Pereira, A. G., Jaramillo, M. L., Remor, A. P., Latini, A., Davico, C. E., da Silva, M. L. (2018). Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the

complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. *Chemosphere*, 209, 353-362.

- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Goncalves, A. M., Goncalves, F. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18(4), 455-463.
- Relyea, R. A., & Jones, D. K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-2008.
- Sadler, T., & von Elert, E. (2014). Dietary exposure of *Daphnia* to microcystins: no in vivo relevance of biotransformation. *Aquatic Toxicology*, 150, 73-82.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 120-125.
- Santhoshkumar, P., & Shivanandappa, T. (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 277-282.
- Santos, N. D., Oliveira, R., Lisboa, C. A., Pinto, J. M. E., Sousa-Moura, D., Camargo, N. S. (2018). Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 297-304.
- Shen, Y. F., Liu, L., Gong, Y. X., Zhu, B., Liu, G. L., & Wang, G. X. (2014). Potential toxic effect of trifloxystrobin on cellular microstructure, mRNA expression and antioxidant enzymes in *Chlorella vulgaris*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(3), 1040-1047.
- Silveira, T., Varela, A. S., Corcini, C. D., Domingues, W. B., Remiao, M., Santos, L. (2019). Roundup (R) herbicide decreases quality parameters of spermatozoa of *Silversides odontesthes humensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(1), 1-6.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., & Forlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 431-442.
- Taylor, G., Baird, D. J., & Soares, A. M. V. M. (1998). Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 412-419.

- Turhan, D. O., Gungordu, A., & Ozmen, M. (2020). Developmental and lethal effects of glyphosate and a glyphosate-based product on *Xenopus laevis* embryos and tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 104(2), 173-179.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Vidal, T., Abrantes, N., Goncalves, A. M. M., & Goncalves, F. (2012). Acute and chronic toxicity of Betanal (R) Expert and its active ingredients on nontarget aquatic organisms from different trophic levels. *Environmental toxicology*, 27(9), 537-548.
- Vrankovic, J., Zivic, M., Radojevic, A., Peric-Mataruga, V., Todorovic, D., Markovic, Z. (2018). Evaluation of oxidative stress biomarkers in the freshwater gammarid *Gammarus dulensis* exposed to trout farm outputs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 84-95.
- Wagner, N., Reichenbecher, W., Teichmann, H., Tappeser, B., & Lotters, S. (2013). Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8), 1688-1700.
- Xiong, Q. L., Shi, Y. J., Lu, Y. L., Pan, K. W., Dakhil, M. A., Zhang, L. (2018). Sublethal or not? Responses of multiple biomarkers in *Daphnia magna* to single and joint effects of BDE-47 and BDE-209. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 164-171.
- Yannicari, M., Istilart, C., Gimenez, D. O., & Castro, A. M. (2012). Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity. *Environmental and Experimental Botany*, 82, 14-19.
- Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P., & Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133, 378-387.
- Zhang, F., Wang, Z., Song, L., Fang, H., & Wang, D. G. (2020). Aquatic toxicity of iron-oxide-doped microplastics to *Chlorella pyrenoidosa* and *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 257.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ramazan TANER

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

