T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARSENİK (As^{+3} ve As^{+5}) UYGULANMIŞ *DAPHNIA MAGNA*' DA LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Tezi Hazırlayan
Selma TAŞDEMİR

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2009
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARSENİK (As^{+3} ve As^{+5}) UYGULANMIŞ *DAPHNIA MAGNA*' DA LİPİD PEROKSYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Tezi Hazırlayan
Selma TAŞDEMİR

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2009
KAYSERİ

Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN danışmanlığında **Selma TAŞDEMİR** tarafından hazırlanan **"Arsenik (As^{+3} ve As^{+5}) Uygulanmış *Daphnia magna*' da Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

17.07.2009

JÜRİ:

Başkan : Doç.Dr. Abdurrahman AYVAZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Didem AYDIN

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 28/07/2009. tarih ve 2009/24-21 ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

28/07/2009

N. Ayyıldız

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile rehberlik eden tez yöneticim Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını ve emeğini esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet AKSOY' a, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK'e teşekkür ederim. Tez çalışmam için laboratuvar imkanlarını kullandığım Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi' ne ve çalışanlarına teşekkür derim.
Bana her konuda destek olan ve varlıklarından her zaman güç aldığım aileme teşekkür ederim.

ARSENİK (As^{+3} ve As^{+5}) UYGULANMIŞ *DAPHNIA MAGNA*' DA LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Selma TAŞDEMİR
Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2009
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih DUMAN

ÖZET

Bu çalışmada, inorganik arsenik türlerinin (arsenit ve arsenat) *Daphnia magna*'nın lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. *D. magna* kültüründen alınan örneklere 12, 24 ve 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda arsenit (As^{+3}) ve arsenat (As^{+5}) uygulanmıştır. Lipid peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişimi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Her iki arsenik türünün de hem lipid peroksidasyonunu hem de enzim aktivitesini önemli derecede etkilediği görülmüştür. Arsenitin *D. magna* üzerine toksisitesinin arsenata göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Enzim aktivitelerinin farklı konsantrasyon ve farklı uygulama sürelerine bağlı olarak değişim gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca *D. magna*'nın arsenik türlerine karşı oluşturduğu biyolojik cevap üzerine hem uygulama konsantrasyonunun hem de uygulama periyodunun önemli olduğu ve mutlaka birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Daphnia magna,* Arsenit, Arsenat, Antioksidan Enzim, Lipid Peroksidasyon

A STUDY ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN ARSENIC (As^{+3} ve As^{+5}) APPLIED *DAPHNIA MAGNA*

Selma TAŞDEMİR

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
M. Sc. Thesis, July 2009
Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Fatih DUMAN

ABSTRACT

In this study, it was aimed to study the effects of inorganic arsenic forms (arsenit and arsenat) on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Daphnia magna*. Arsenit (As^{+3}) and arsenat (As^{+5}) in different concentrations were applied to the samples obtained from *D. magna* cultures for 12, 24 and 48 hours

The changes in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities depending on the duration and concentration were statistically evaluated. It was found that these two arsenic forms affected both lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities significantly.

It was determined that the toxidity of arsenit on *D. magna* was higher compared to arsenat and that enzyme activities changed depending on different concentrations and different durations of application. In conclusion, we suggest that both the duration of concentration and the duration of applicaton be important and that they be evaluated together, depending on *D. magna's* biological response against arsenic forms.

Keywords: *Daphnia magna,* arsenic, antioxidant enzyme, lipid peroxidation

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY ……...……...……... i
TEŞEKKÜR ……...……. ii
ÖZET ……...……...……... iii
ABSTRACT ……...……... iv
ŞEKİLLER LİSTESİ ……...……..…… vii
1.BÖLÜM
GENEL BİLGİLER ……. 1
1.1 Giriş ……..…….. 1
1.2 *Daphnia magna* Straus, 1820 Genel Özellikleri ……..…….. 1
1.2.1 *Daphnia magna* Sistematiği ……..……. 1
1.2.2 *Daphnia magna*' nın Morfolojisi ……..…….. 2
1.2.3 *Daphnia magna*' nın Hayat Devri ……..… 3
1.2.4 *Daphnia* Kültürü ……..... 4
1.3 Arseniğin Genel Özellikleri ……...…… 4
1.3.1 Arseniğin Kimyası …….. 5
1.3.2 Arseniğin Kaynakları …….. 5
1.4 Kaynak Özetleri ……. 7
2. BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM ……..…….. 9
2.1 *Daphnia magna* Kültürünün Hazırlanması ……...……. 9
2.2 Deney Düzeneğinin Hazırlanması ……..…… 9
2.3 *Daphnia magna'* ya Ağır Metalin Uygulanması ……. 10
2.4 Protein, Enzim ve Lipid Ektraksiyonun Hazırlanması …… 10
2.5 Lipid Peroksidasyon Tayini ……..… 10
2.6 Protein Miktarının Tayini ……..…….. 11
2.7 Enzim Aktivitelerinin Tayini ……...…… 12
2.7.1 Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin (SOD) Belirlenmesi .....……..… 13
2.7.2 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi ……..……. 13
2.7.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi …….…… 14
2.8 İstatiksel Analiz ……..….. 14

3. BÖLÜM
BULGULAR …….. ...15
3.1 Arseniğin *D. magna*' da Lipid Peroksidasyonuna Etkisi ……..……..…… 15
3.1.1 Arsenatın Etkisi …….……... 15
3.1.2 Arsenitin Etkisi ……...…….. 16
3.2Arseniğin *D. magna'* da Protein Miktarına Etkisi …… 17
3.2.1 Arsenatın Etkisi …….……... 17
3.2.2 Arsenitin Etkisi …. ……...…… 19
3.3 Arseniğin *D. magna'* da SOD Aktivitesine Etkisi …….…….. 20
3.3.1 Arsenatın Etkisi …….……... 20
3.3.2 Arsenitin Etkisi ……...…….. 21
3.4 Arseniğin *D. magna'* da CAT Aktivitesine Etkisi ……...……... 22
3.4.1 Arsenatın Etkisi …….……... 22
3.4.2 Arsenitin Etkisi ……...…….. 24
3.5 Arseniğin *D. magna'* da APX Aktivitesine Etkisi ……...…… 25
3.5.1 Arsenatın Etkisi …….……. 25
3.5.2 Arsenitin Etkisi ……...…….. 26
4. BÖLÜM
TARTIŞMA VE SONUÇ …….…… 28
KAYNAKLAR …….…… 32
ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 *Daphnia magna* genel görünüşü ……..…. 3
Şekil 2.1 BSA standartlarına göre elde edilen grafik ……...……..12
Şekil 3.1 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da MDA düzeylerinin değişimi ……..……..16
Şekil 3.2 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da MDA düzeyinin değişimi……..……... 17
Şekil 3.3 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da protein içeriğinin değişimi…… 19
Şekil 3.4 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da protein içeriğinin değişimi…… 20
Şekil 3.5 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da SOD aktivitesinin değişimi…… 21
Şekil 3.6 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da SOD aktivitesinin değişimi…….. 22
Şekil 3.7 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da CAT aktivitesinin değişimi…… 23
Şekil 3.8 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da CAT aktivitesinin değişimi……... 25
Şekil 3.9 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da APX aktivitesinin değişimi…… 26
Şekil 3.10 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da APX aktivitesinin değişimi…….. 27

1. BÖLÜM
GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Su canlıların hayatını devam ettirebilmeleri için gerekli en önemli unsurdur. Artan nüfus yoğunluğu ve teknolojik gelişme sonucu suya olan ihtiyaç gün geçtikçe artarken, su ekosistemleri hem evsel hem de endüstriyel atıklar ile gittikçe kirlenmektedir. Su fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin etkisi ile kirlenir.

Su ve sedimentteki kirleticilerin konsantrasyonunun ölçülmesi tek başına o ortamda yaşayan canlılar üzerine kirleticinin potansiyel etkisi hakkında bilgi veremez. Bu nedenle kirleticilerin canlılarla olan direkt ilişkilerinin incelenmesi gerekir.

Daphnia magna Straus, 1820 birçok toksisite deneyi için biyoindikatör olarak kullanılan bir canlıdır [1, 2, 3]. Ayrıca akvaryumlarda yosunların temizlenmesi ve sucul ortamda pek çok canlı için yem olarak kullanılması bakımından da oldukça önemlidir

1.2 *Daphnia magna* Straus, 1820 Genel Özellikleri

1.2.1 *Daphnia magna* Sistematiği

Daphnia magna'nın Sistematiği [4];

Alem: Animalia

Şube: Arthropoda

Altşube: Crustacea

Sınıf: Branchiopoda

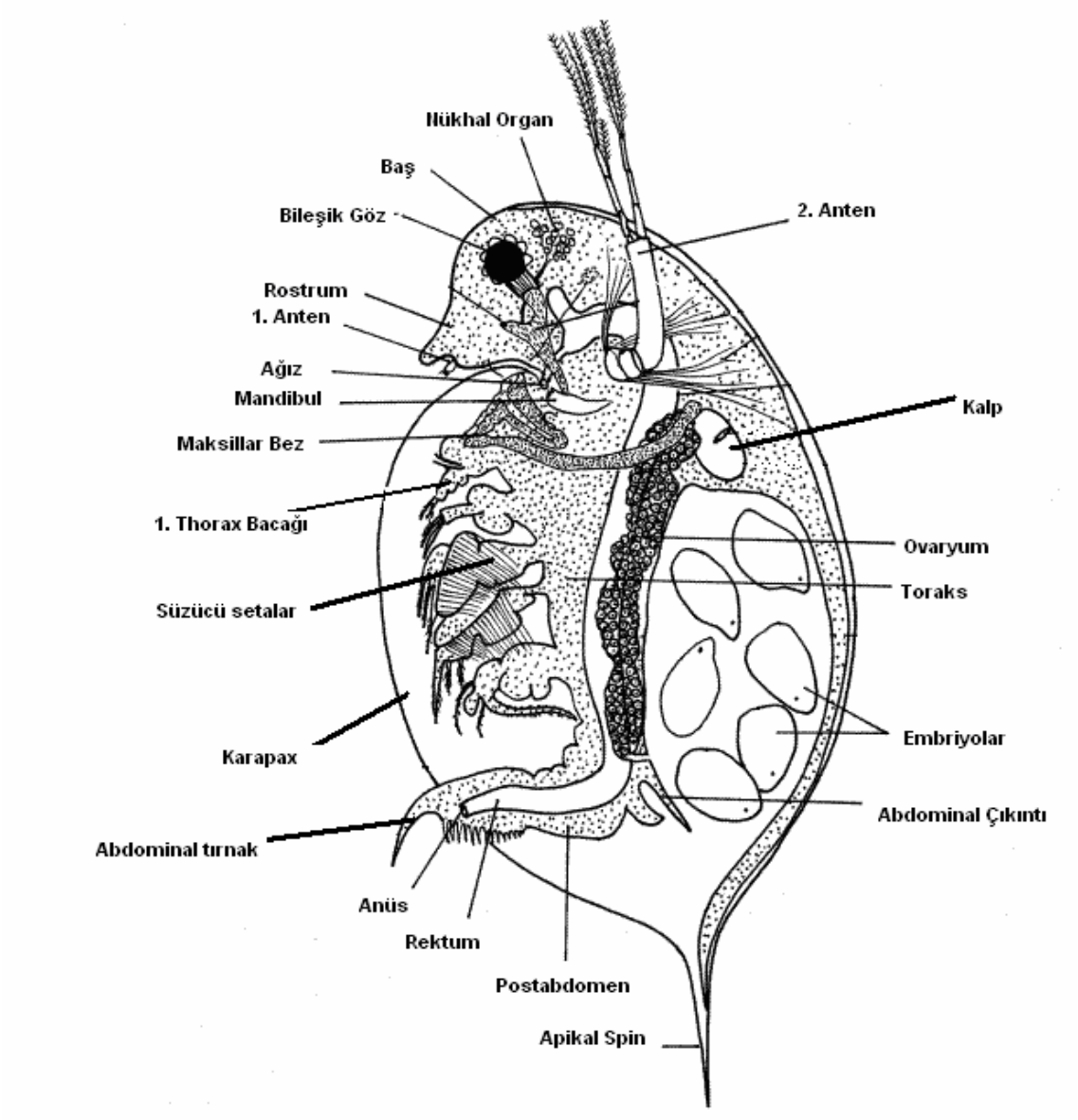
Takım: Cladocera

Familya: Daphniidae Straus, 1820
Tür: *Daphnia magna* (Straus, 1820)

D. magna tatlı su kabuklusu olup yaygın olarak su piresi olarak isimlendirilir. Bu isim daha ziyade organizmanın su içerisindeki zıplama türü hareketlerinden kaynaklanır. Daphniiadae familyasına ait olan bu canlı yeryüzünde kozmopolit bir dağılıma sahiptir. Bu familyanın iki önemli üyesi *Daphnia* ve *Moina* cinsleri doğal ortamlarda tatlı su balıklarının en önemli besin kaynağıdır. Uzun yıllardır bilinen bu türler aynı zamanda balık yetiştiricileri tarafından da canlı besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. *Daphnia*, organik maddelerin ayrıştığı su birikintilerinde, havuzlarda, göletlerde ve bataklık bölgelerde çok sayıda bireye ulaşabilir. Büyüme koşullarının optimum olduğu geçici sularda belli periyotlarda bol olarak bulunur [4].

1.2.2 *D. magna*' nın Morfolojisi

Şekil 1.1' de görülen *Daphnia*' nın vücudu beş ekstremiteli baş kısım ve gövdeden oluşur. Bu ekstremitelerden 1. çifti eşeysel dimorfizm gösteren çubuk şeklindeki antennulardır. 2. çift ise esas olarak hareket organeli olan antenlerdir. Bunlardan başka 2 çift maksil ve bir çift mandibul ise besin alma işleminde kullanılır ve filtrasyon işlevini görür. Başın her iki yanında büyük bileşik gözler mevcuttur. *Daphnia*' nın önemli bir özelliği, gövdenin karapas adı verilen dış iskelet ile kaplanmış olmasıdır. Erkek bireyler yılın belli mevsiminde örülürler. Erkeklerin görülmediği mevsimlerde partogenetik yolla çoğalırlar. Yumurtalar vücut boşluğunun sırt tarafındaki kuluçka odacığında gelişir ve ergine benzeyen fertler çıkar. *Daphnia*'nın kuluçka kesesi tamamen kapalıdır. *Daphnia* dış kabuğunu periyodik olarak değiştirir [4, 5].



Şekil 1.1 *D. magna*' nın genel görünüşü [6].

1.2.3 *D. magna*' nın Hayat Devri

Daphnia sp. hayat devri eşeyli ve eşeysiz dönemleri içerir. Yüksek yoğunlukta bulundukları pek çok ortamda populasyonun eşeysiz üreme fazındaki dişilerden oluştuğu gözlenmiştir. Optimal koşullarda bir yumurtlama döneminde *Daphnia'*nın 100' den fazla yumurta üretebildiği ve her 2,5-3 günde yumurtlama dönemine girdiği bilinmektedir. Bir dişi tüm yaşamı boyunca 25 yeni yumurtlama dönemine girebilmektedir.

Uygun ortam koşullarında populasyonda erkek bireylerin sayısı artar ve üreme devri eşeysel faza girer. Eşeyli üreme sonunda ephippium adı verilen kalıcı yumurtalar oluşur.

Üremenin eşeysiz fazdan eşeyli faza geçişindeki en önemli faktörler besin yetersizliği, oksijen düzeyinin düşüklüğü ve yüksek populasyon yoğunluğudur. Bunun yanı sıra düşük sıcaklık, çok uzun (20 saat) ya da çok kısa (4 saat) gibi aşırı fotoperyotlarda kalıcı yumurtaların oluşmasında önemli etkenlerdir.

Daphnia sp. çeşitli bakteri grupları, maya ve mikroalg hücreleri, detritus ve çözünmüş organik maddeler ile beslenebilir. Bu nedenle *Daphnia* sp. populasyonları bakteri ve maya hücreleri veya mikroalg hücrelerinin yeterli miktarda olduğu ortamda daha çok büyür. Hem bitkisel hem de hayvansal detritus, *Daphnia* sp. üreme ve büyüme hızını artırıcı rol oynar. *Daphnia* sp. besin değeri yaşına ve besin tipine göre değişir. Ancak ortalama olarak kuru ağırlığının % 50'sini protein oluşturur. Ergin bireylerin içerdiği yağ miktarı juvenillerdeki yağ miktarından daha yüksektir [4].

1.2.4 *Daphnia* Kültürü

Uzun süreli *Daphnia* kültürleri 1-2 litrelik şişelerde kolayca yetiştirilebilir. Ancak bunlar balık beslemesine yönelik, yeterli biyoması sağlayamayacağından kültürlerin stok olarak saklanması için daha uygundur. *Daphnia* kültürleri için en az 30-40 litrelik yada daha büyük kapların kullanılması daha iyi sonuç verir. Bu amaçla cam akvaryumlar, tanklar yada toprakta kazılmış havuzlar kullanılabilir.

Daphnia kültürlerinin yapıldığı havuzlardaki su derinliğinin 1 metreden az olması hatta derinliğin 40-50 cm olması tavsiye edilir. Su derinliğinin az olması hem ortamdaki mikroalg fotosentezi için ışığın daha iyi nüfuz etmesi hem de oksijenlenme düzeyinin artması bakımından önem taşır.

Daphnia kültürlerinin kuvvetli bir havalandırma ile çok iyi karıştırılması gerekir. Kuvvetli havalandırma alg üretimini arttırdığı gibi, dişiler üzerindeki yumurta sayısını, yumurtalı dişi sayısını ve populasyon yoğunluğunuda artırır. Ancak hava kabarcıklarının çok küçük olmasına dikkat edilmelidir. *Daphnia* kültürlerinin yapıldığı kabın 1/2' sinin yada 1/3'ünün örtülmesi tavsiye edilir. *Daphnia* kültürlerinin yoğunluğu 8X-10X' lik bir büyütme ile izlenebilir [4].

1.3 Arseniğin Genel Özellikleri

Yerkabuğunda en çok bulunan yirminci element olan arseniğin oluşumu ve dağılımı özellikle son yıllarda daha çok durulmaya başlanmıştır.

Arsenik, çelik grisi metalik parlaklıkta, iri kristalli, ısıtıldığı zaman sarımsak kokulu ve zehirli buharlar çıkaran 5A grubu bir metalloid olup, bileşikleri de zehirlidir. Arsenik, insektisit ve yarı iletken olarak birçok amaç için yüzyıllardır kullanılmaktadır. İnorganik arsenik bileşenleri endüstriyel ve tarımsal aktivitelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sucul bitki kontrolü içinde kullanılmışlardır. Arseniğin toksisitesi onun oksidasyon seviyesine direkt olarak bağlıdır. İnorganik arsenik türleri organik arsenik türlerine oranla çok daha toksiktirler. Arsenat (As^{+5}) kimyasal olarak PO_4^{-2}' e çok benzediği için hücre içerisine kolayca dahil olabilir. Bu şekilde ATP sentezi, oksidatif fosforilasyon gibi çok önemli hücresel olaylara girişim yapabilir. Arsenit (As^{+3}) hücre içerisine $As(OH)_3$ şeklinde alınır. Bugün bu elementin ekotoksikolojik olarak önemi, zehirli etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu yarı metal elementin biyojeokimyasal çevrimi insanın teknolojik faaliyetlerinin sonucu bozulmuş ve kirletici boyutları çok etkili olmuştur [7].

1.3.1 Arseniğin Kimyası

Yerkabuğunda en çok bulunan elementlerden biri olan ve doğada genellikle kristal formda bulunan arsenik metal olmayan ya da metaloid olarak sınıflandırılmakta ve ağır metal grubunda yer almaktadır. Arsenik aynı zamanda bir arada bulunduğu elementlerin türüne göre inorganik ve organik bileşikler olarak da sınıflandırılabilir. İnorganik arsenik bileşikleri oksijen, sülfür, klor gibi elementlerle bir arada bulunurken organik arsenik bileşikleri ise karbon ve hidrojen ile bir arada bulunur [8, 9]. Doğada en çok bulunan arsenik türü olan inorganik arsenik yüzeysel su, yeraltı suyu ve deniz suyunda baskın olan tür iken organik arsenik türleri doğal gaz ve petrolde baskındır [10]. Arseniğin kimyası pek çok forma sahip olması nedeniyle karmaşıktır. Doğada, +5 (arsenat), +3 (arsenit), 0, ve -3 oksidasyon basamaklarında bulunur. -3 ve 0 değerlikli arsenik doğada nadiren bulunur [11]. Arsenik doğada kolay bir şekilde oksidasyon basamağı ve kimyasal formunu değiştirir. Arseniğin değerliğini ve türünü suyun pH değeri, redoks potansiyeli, sülfür, demir ve kalsiyum gibi iyonların varlığı ve mikrobiyal aktivite etkilemektedir [10].

1.3.2 Arseniğin Kaynakları

Arsenik kaynakları doğal ve antropojeniktir. Arsenik toprakta, bazı kaya türlerinde ve özellikle kurşun ve bakır içeren mineral ve cevherlerde doğal olarak bulunur. Rüzgarın

taşıdığı toz, yüzeysel akış ve yeraltına sızma sonucu havaya ve suya geçebilir [12]. Yerkabuğunda bulunan arseniğin ortalama olarak kilogramda 6 mg olduğu ve toplam miktarının $4.01x10^6$ kg olduğu tahmin edilmektedir. Deniz suyundaki arsenik konsantrasyonu 0.09-24 μgL^{-1} arasında değişmektedir. Yüzeysel sularda ise bu değer 0.15 – 0.45 μgL^{-1} arasındadır [11]. Arseniğin doğal kaynakları arasında kaplıcalar, ılıcalar, volkanik kayalar, çöküntü kayaları (organik/inorganik killer), başkalaşım kayaları, deniz suyu ve mineral çökeller yer alır. Ayrıca volkanik hareketler, kaya erozyonu ve orman yangınları da arseniğin doğal kaynakları arasındadır [10].

Doğal sularda arsenik oluşumu akiferin jeolojik, hidrojeolojik ve jeokimyasal özelliklerine bağlıdır. Doğada arseniğin en önemli kaynağı sülfür mineralleridir. Arsenik içeren en önemli mineraller arasında As_2S_3 (orpiment), AsS (realgar), FeAsS, $FeAs_2$, NiAs, CoAsS, $Cu_{12}As_4S_{13}$ ve Cu_3AsS_4 yer almaktadır [11, 13]. Sülfür mineralleri dışında arseniğin diğer bir önemli kaynağı ise arsenik içeren demir oksitlerdir [14, 15]. Ayrıca karbonatlı kayalar, kireçtaşı/dolomit ve travertendeki kırık zonlar boyunca oluşan realgar ve orpiment formundaki epitermal jipsler ve volkano-sedimanter istiflerdeki volkanik kayalar da önemli arsenik kaynakları arasında bulunmaktadır [16]. Arseniğin antropojenik kaynakları oldukça çeşitlidir. Arsenik içeren endüstriyel üretimler arasında ahşap, kereste koruma işlemleri, kozmetikler, boya işletmeleri, ilaç sanayi, herbisit sanayi, yarı iletken madde üretimi, dericilik, cam üretimi, tıbbi kullanımlar, kağıt ve kağıt hamuru üretimi ve çimento işletmeleri bulunmaktadır. Ayrıca bakır, nikel, altın madenciliği ve cevher tasfiye etme işlemleri, zirai uygulamalar, fosil yakıtların kullanımı, düzenli depolama sahası sızıntı suları da arseniğin antropojenik kaynakları arasındadır.

Arsenik oluşumuna neden olan en önemli insan aktiviteleri arasında zararlı bitki ve böcekleri yok eden tarım ilaçlarının kullanımı ve madencilik faaliyetleri gelmektedir [17, 18]. Arsenik içeren pestisitlerin kullanımı arseniğin noktasal olmayan antropojenik kaynakları arasında yer almaktadır. Dünyada en çok kullanılan arsenik içeren pestisitler arasında kurşun arsenat ($Pb_3(AsO_4)_2$), kalsiyum arsenat ($Ca_3(AsO_4)_2$), magnezyum arsenat ($Mg_3(AsO_4)_2$), çinko arsenat ($Zn_3(AsO_4)_2$) ve çinko arsenit ($Zn(AsO_2)_2$) yer almaktadır [19]. Türkiye'de ise ruhsatı olan pestisitler arasından fumigantlar, nematositler ve toprak fumigantları grubunda yer alan alüminyum fosfit ve fungisitler grubunda yer alan bakır oksiklorit arsenik içeren aktif maddelere örnek olarak verilebilir [20].

1.4 Kaynak Özetleri

İç sularda arsenik konsantrasyonu 0.5 μgL^{-1} – 5000 μgL^{-1} arasında değişebilir [21]. İçme suyunda izin verilen limit 10 μgL^{-1} ' dir [22]. Arsenik sularda daha çok arsenat formunda bulunur [21].

Yapılan birçok araştırmada artan arsenik konsantrasyonlarında reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretildiği ve bunun bir sonucu olarak, protein, lipit ve DNA gibi makromolekülerin yapısının bozulduğu belirlenmiştir [23-26].

Barata ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan çalışmada, menadione, paraquat, endosulfan, kadmiyum ve bakır gibi çeşitli kontaminantlar uygulanan *Daphnia magna*'da lipid peroksidasyon ve antioksidant enzim cevapları değerlendirilmiştir. Çalışılan enzimler arasında oksidatif strese en iyi cevap veren enzimlerin total glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon S-transferaz olduğunu bulmuşlardır [23].

Barata ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, büyüme sürecinde *Daphnia magna*'daki değişen lipid peroksidasyon ve antioksidasyon enzim aktivitesi belirlenmiştir [24].

Sucul toksisite ile ilgili yapılan çalışmalardan birinde C.I. Direct Blue 218 boyalarının toksisitesini belirlemede *D. magna* kullanmanın oldukça uygun bir metot olduğu belirtilmiştir [27].

Abe ve arkadaşları (2001) *D. magna* larvalarını anilin ve türevi kimyasallara maruz bırakarak larvadan ergine kadar olan dönemde meydana gelen değişimleri incelemişler, bu kimyasallara maruz kalan yumurtaların açılma oranın düştüğünü ve gelişim dönemlerinde fiziksel anormalliklerin olduğunu tespit etmişlerdir [28].

D. magna' da surfaktanların farklı konsantrasyonlarında akut toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir [29].

Jemec ve arkadaşları (2007) en çok satılan insektisitlerden olduğunu belirttikleri imidaclopridin ve sıvı formülasyonunu *D. magna*' ya uygulayarak biyokimyasal, üreme ve hayatta kalma paremetreleri ile ilgili veriler toplamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre imidaclopridin sıvı formülasyonun üremelerine ve hayatta kalma oranlarını azalttığı ve diğer hedef olmayan sucul omurgasızları da etkilediği bulunmuştur [30].

Tatlısu omurgasızları ve özellikle *D. carinata* üzerine yapılan bir çalışmada organofosfat pestisitlerin 2.78-9.35 μgL^{-1} konsantrasyonda oldukça toksik olduğu belirtilmiş ve doğal ekosistemlere zararlı olduğu vurgulanmıştır [31].

Repetto ve arkadaşları (2001) oluşturdukları ekotoksikolojik modelde pentaklorofenolün etkisini araştırmış ve pentaklorofenolün *D. magna*' yı hareketsiz hale getirdiğini tespit etmişlerdir [32].

Arsenik toksisitesinin subletal etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada ise, 21 günlük süre ile değişen miktarlarda arseniğe maruz bırakılan *D. magna*'ların mortalite oranlarının arttığı, fakat büyümelerinin önemli oranda etkilenmediği tespit edilmiştir [33].

İsveç yapımı 26 deterjan ve 5 yumuşatıcı ürünü ile *D. magna*'da toksisite çalışması yapılmış ve bu çalışmada deterjanlardan yalnızca birinde 48 saatlik süre içerisinde LD_{50} değerinin üzerinde bulunmuştur [34].

Jo ve arkadaşları (2008) boya üreten bir fabrikanın atıklarında *D. magna*' ya en büyük toksikant olarak Cr (VI) ve *o*-toluidine olduğunu belirlemişlerdir [35].

Fluoranthene maddesinin sucul krustaselerden *Daphnia magna* ve *Thamnocephalus platyurus* üzerine etkisine yönelik yapılan toksisite çalışmasında, fluoranthenin *Thamnocephalus platyurus* üzerinde toksik olmadığı *Daphnia magna*' da toksik olduğu belirlenmiştir [36].

Yapılan literatür taramasında farklı kimyasal türlerinin *Daphnia manga* üzerinde toksik olduğuna dair çalışmalara rastlanmışken farklı arsenik türlerine karşı sucul organizmalar tarafından oluşturulan biyolojik cevap ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Bu çalışmada, arseit ve arsenata maruz bırakılan *Daphnia magna*' nın bu metallere tolerans aralıklarının tespiti ve bu aralıklarda verilen konsantrasyonlardaki artışa bağlı olarak oluşturulan biyolojik cevabın belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. BÖLÜM
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 *Daphnia magna* Kültürünün Hazırlanması

Çalışmamızın materyali Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Hidrobiyoloji Laboratuvarında bulunan tek klondan oluşturulmuş kültürlerde yetiştirilen *D. magna* oluşturmaktadır. *Daphnia*' lara besin olarak ekmek mayası verilmiştir. *D. magna* 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta tutulmuştur [37]. Kültür ortamının sıcaklığı 20^0C±2 olarak ayarlanmıştır. Oksijen düzeyinin ayarlanması için havalandırma sistemi kuruldu. Hava kabarcıklarının çok büyük olmamasına özen gösterildi. Kültürün dış ortamdan etkilenmemesi için akvaryumun üstünün yarısı cam malzeme ile kapatıldı.

2.2 Deney Düzeneğinin Hazırlanması

Çalışmada kullanmak için yeterli miktarda *Daphnia magna* üretilmiş ve deneyin yapılacağı ortam ile kültür ortamı aynı şartlara getirilmiştir. Barata ve arkadaşları tarafından tanımlanan "hard water" hazırlanarak bireyler günlük olarak beslenmiştir [37]. Deney ortamı ile kültür ortamının uygun sıcaklık, oksijen miktarı ve havalandırma sistemi kültür ortamı ile aynı olması sağlanmıştır. Deneyde kullanılacak beherler önce deterjanlı suda bir gece bekletildikten sonra yıkanmıştır. Sonra % 20'lik HNO_3 içinde iki gece bekletilmiş, tekrar distile sudan geçirilerek etüvde kurutulmuştur. Hemen hemen hepsi aynı boyda olan *D. magna* enjektör yardımıyla toplanarak, 80 adet birey beherlere konulmuştur. *D. magna* örneklerine arseniğe maruz bırakılma döneminde besin verilmemiştir.

2.3 *Daphnia magna'* ya Ağır Metalin Uygulanması

Arsenit, sodyum meta arsenit ($NaAsO_2$)' den arsenat ise sodyum arsenattan ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) hazırlanmıştır. Önce 1000 mg L^{-1} stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden istenilen konsantrasyonlara seyreltme yapılmıştır. *D. magna*' nın 48 saat boyunca ölen canlı kalabileceği konsantrasyonlar belirlenmiştir. Aralık belirleme çalışmaları arsenit ve arsenat için 0.01-4 mg L^{-1} arasındaki konsantrasyonlar belirlenmiştir. Arsenit için 0.05 mg L^{-1}, 0.1 mg L^{-1}, 0.25 mg L^{-1} ve 0.5 mg L^{-1}' lik konsantrasyonların uygun olduğu, arsenat için ise 0.5 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 2 mg L^{-1} ve 4 mg L^{-1}' lik konsantrasyonların uygun olduğu belirlenmiştir. Her bir arsenik türü için deneyin istatistiksel güvenirliliğini sağlamak amacıyla kontrol düzeneği hazırlanmış ve her bir deney üç tekrar şeklinde yapılmıştır. Hem arsenit hem de arsenat için hazırlanan düzenekler 12 saat, 24 saat ve 48 saat olmak üzere üç farklı uygulama süresine maruz bırakılmıştır. Uygulama süreleri sonunda bireyler çıkarılarak distile su ile yıkanmıştır. Lipid peroksidasyonu, protein içeriği ve antioksidan enzim aktivitesi belirlenmiştir.

2.4 Lipid Peroksidasyonu, Protein ve Enzim Ektraksiyonunun Hazırlanması

Arsenit ve arsenat uygulaması sonunda her bir konsantrasyondaki örnekler alınarak ependorf tüpler içerisinde homojenize edilmiştir. Daha sonra üzerine ağırlığının 4 katı kadar tampon çözelti ilave edilmiştir. Tampon çözelti olarak 100µM fosfat tamponu (pH 7.4), 100 mM KCl ve 1 mM EDTA karışımı kullanılmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika soğuk santrifüjde santrifüj edildikten sonra süpernatant temiz ependorflara alınarak -20 ^{0}C'de saklanmıştır [24].

2.5 Lipid Peroksidasyon Tayini

Lipid peroksidasyon tayininde Barata ve arkadaşlarının (2005) önerdiği yöntem kullanılmıştır [24]. Lipid peroksidasyon tayininde % 8.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 20 trikloro asetik asit (TCA) ve % 0.5 tiyobarbütürik asit (TBA) çözeltileri hazırlanmıştır. 187 µL TBA, 187 µL TCA ve enzim 100 µL ekstraktından alınarak hazırlanan karışım 1 saat sıcak su banyosunda kaynatılmıştır. Kaynatma işleminden hemen sonra soğutulmak üzere buzlu su üzerine alınmıştır. Üzerine 125 µL dH_2O ve 15:1 oranında hazırlanan n-bütanol ve piridin karışımından 625 µL ilave edilerek 4000

rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımda oluşan organik faz alınarak 532 nm ve 600 nm'de okunmuştur.

Hesaplama yapılırken;

$$\frac{(A_{532} - A_{600}) \text{ x ekstraksiyon hacmi (ml)}}{155\ mM^{-1} \text{ x örnek miktarı (gr)}}$$

formülüne göre MDA içeriği hesaplanmıştır.

2.6 Protein Miktarının Tayini

Örneklerdeki protein tayini Lowry metodu (1951) ile yapılmıştır [38]. Lowry metodu ile protein tayininde üç farklı çözelti hazırlanmıştır. Bunlardan A çözeltisi için 0.5 g bakır sülfat ve 1 g sodyum sitrat tartılıp 100 mL dH_2O'da çözülmüştür. B çözeltisini hazırlamak için 10 g Na_2CO_3 ve 2 g NaOH tartılarak 500 mL dH_2O'da çözülmüştür. Lowry C çözeltisi ise, 1 mL A ve 50 mL B ile hazırlanmıştır. Son olarak da D çözeltisi hazırlandı. 1:1 oranında folin çözeltisi hazırlanmıştır.

Tablo 2.1 Lowry Standartlarının Hazırlanması

Standartlar	dH_2O (µL)	1 mg/mL stok BSA (µL)	Lowry C (A+B) (mL)	Lowry D (Folin) (µL)
Kör	500	0	2,5	250
0,05 mg/mL	475	25	2,5	250
0,1 mg/mL	450	50	2,5	250
0,2 mg/mL	400	100	2,5	250
0,3 mg/mL	350	150	2,5	250
0,4 mg/mL	300	200	2,5	250
0,5 mg/mL	250	250	2,5	250

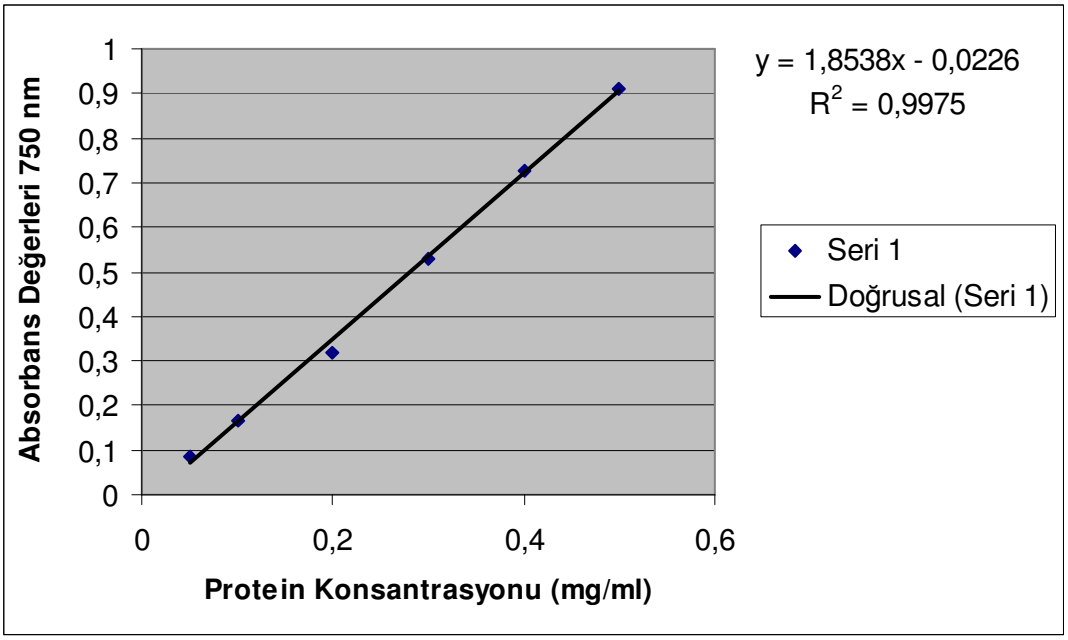
Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için sığır serum albümini (BSA) kullanılarak standartlar hazırlanmıştır (Tablo 2.1). 1 mg/mL BSA stoğundan 25-250 µL arasında değişik konsantarasyonlar alınmış ve son hacimleri dH_2O ile 500 µL'ye

tamamlanmıştır. Sonra üzerine hazırlanan Lowry çözeltilerinden (A,B,C ve D) son hacim 5 mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

Örneklerdeki protein miktarının belirlenmesi için 4 ^{0}C'de buzlu suda bekletilen örneklerden 50 µL alınmış ve üzerine hazırlanan Lowry C çözeltisinden 2.5 mL eklenmiştir. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra üzerine Lowry D çözeltisi eklenerek 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 750 nm dalga boyunda köre karşılık okunmuştur.

Standartlara ait absorbans değerleri okunarak bir grafik elde edildi (Şekil 2.1), elde edilen denklem ile örneklerdeki protein miktarı belirlenmiştir. Denklemde x eğim, y ise örneklerin Lowry çözeltileri sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon katsayısı da eklenmiştir.

Şekil 2.1 BSA standartlarına göre elde edilen grafik



2.7 Enzim Aktivitelerinin Tayini

Enzim aktiviteleri ölçülürken bütün enzim ekstraktları buzlu suda bekletilmiştir. Ayrıca ışıktan etkilenmemesine dikkat edilmiştir. Daha önce küçük hacimlere ayrılarak -20 ^{0}C' de bekletilen örnekler ile enzim çalışmaları yapılmıştır.

2.7.1 Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin (SOD) Belirlenmesi

Süperoksit dismütaz aktivitesinin belirlenmesinde Beauchamp ve Fridovich'in (1971) metodu kullanılmıştır [39]. Bu yöntem için bir karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 27 ml sodyum fosfat (pH 7.8), 1.5 ml metiyonin (300 mg, ml^{-1}), 1 ml Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (14.4 mg, 10 ml^{-1}), 0.75 ml triton-X-100 ve 1.5 ml 2mM EDTA ile hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımdan 1 ml alınarak temiz tüplere aktarılmış ve üzerine 50 µg protein ekstraktı ilave edilmiştir. Bu karışıma en son olarak 10 µl riboflavin (4.4 mg, 100 ml^{-1}) eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. NBT ve riboflavinin ışıktan etkilenmemesine dikkat edilmiştir. Hazırlanan örneklerin ağzı kapatılmıştır. İki adet kör hazırlanmıştır. Bu körlere enzim ekstraktı dışında diğer kimyasallar eklenmiştir. Körlerden biri karanlıkta diğer kör ve örnekler ise ışıkta 15 dakika bekletilmiştir. Karanlıkta bekletilen kör ile sıfırlama yapılmıştır. Işıkta bekleyen kör ile 560 nm' de okuma yapılmış ve elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu absorbans değerleri % inhibisyon hesaplamasında kullanılmıştır.

$$\%\text{inhibisyon} = \frac{\text{Kontrol OD} - \text{Örnek OD}}{\text{Kontrol OD}} \times 100$$

2.7.2 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Protein ekstraktlarındaki katalaz aktivitesi Barata ve arkadaşlarının önerdiği yönteme göre belirlenmiştir [24]. Bu yöntem için 50 mM sodyum fosfat (pH 7.0), 19 mM H_2O_2 ve 100 µg protein örneği konulmuştur. Son hacim 3 mL' ye tamamlanmıştır. Kör olarak yalnızca tampon kullanılmıştır. Küvete yüklemeden önce iyice karışması sağlanmıştır. Reaksiyon H_2O_2'nin eklenmesi ile başlatılmış ve 240 nm'de ölçülmüştür. Absorbans okumaları quartz küvet kullanılarak yapılmıştır. 3 dakika boyunca absorbans değerindeki değişiklikler kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler aktivite hesaplamalarında kullanılmıştır. Hesaplamada formül olarak;

$$\frac{dA/dt}{\varepsilon\ (mM^{-1})\ \text{prot/ml}} \times \frac{\text{toplam hacim (ml)}}{1000\ \text{ml}} \times \frac{1000}{\text{ölçülen µl}} \times SF \times \frac{1}{\text{mg}}$$

kullanılmıştır. Burada ε değeri parçalanma katsayısı (katalaz için 40 mM^{-1} cm^{-1}), SF ise sulandırma katsayısıdır. Formülle yapılan hesaplamadan elde edilen değer kullanılarak da katalaza ait spesifik aktivite değerleri elde edildi.

2.7.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Nakano ve Asada'nın (1981) metodu kullanılmıştır [40]. Bu yönteme göre 50 mM sodyum fosfat (pH 7.0), 0,2 mM EDTA, 0.5 mM askorbik asit ve 250 mM H_2O_2 karışımı kullanılmıştır. Reaksiyonu başlatmak için 50 µg enzim ekstraktı kullanılmıştır. Reaksiyonun son hacmi 3 mL olarak belirlenmiştir. Kör olarak yalnızca tampon çözelti konulmuştur. Reaksiyon ölçümü yapılırken quartz küvet kullanılmış ve 290 nm' de ölçülmüştür. 3 dakika boyunca absorbans değerleri kaydedilmiştir. Aktivite hesaplamasında kullanılan formül şu şekildedir.

$$\frac{dA/dt}{\varepsilon\ (mM^{-1})\ prot/ml} \times \frac{\text{toplam hacim (ml)}}{1000\ ml} \times \frac{1000}{\text{ölçülen } \mu l} \times SF \times \frac{1}{mg}$$

Askorbata ait ε değeri 2.8 mM^{-1}'dir. Formüle göre askorbatın spesifik aktivite değeri hesaplanmıştır.

2.8 İstatiksel Analiz

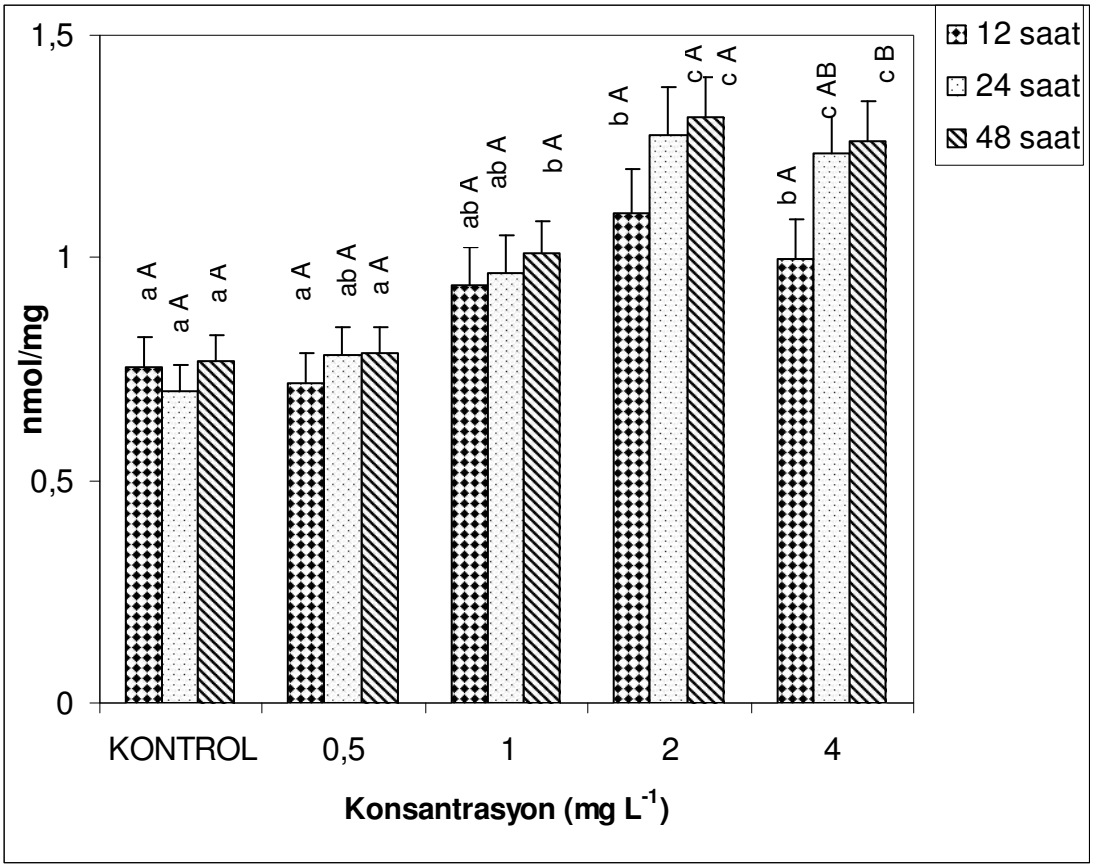
Tüm uygulamalar birbirinden bağımsız tekrarlar şeklinde yapılmış, uygulamalar arasındaki farklılığın önemliliğinin belirlenmesinde varyans analizi kullanılmıştır (ANOVA) ve ardından post-hoc testi (tukey testi) yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı ile yapıldı.

3. BÖLÜM
BULGULAR

3.1 Arseniğin *D. magna*' da Lipid Peroksidasyonuna Etkisi

3.1.1 Arsenatın Etkisi

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi arsenatın 48 saat uygulama süresinde 2 mg L^{-1} konsantrasyonda MDA konsantrasyonunun en yüksek olduğu bulunmuştur. Bu artışın kontrole göre % 70 olduğu belirlenmiştir. Arsenat uygulamasında 12 saat uygulama süresince tüm kosantrasyonlar karşılaştırılmıştır. Kontrole göre 2 mg L^{-1} ve 4 mg L^{-1} konsantrasyonlarda fark önemli bulunmuştur. 24 saat uygulama süresi için 2 mg L^{-1}'lik uygulamaya kadar düzenli bir artış gözlenmiştir. 48 saat uygulama süresince kontrole göre 0.5 mg L^{-1} konsatrasyonda bir fark gözlenmemiştir ($p<0.05$). Fakat 1 ve 2 mg L^{-1} konsantrasyonlarda bir artış belirlenmiştir. Arsenat uygulamasında tüm konsantrasyonlar için uygulama süreleri karşılaştırılmıştır. Buna göre sadece 4 mg L^{-1} konsantrasyonda 48 saatte MDA düzeyinde bir artış bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlarda kontrole göre önemli bir fark bulunmamıştır.



Şekil 3.1 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da MDA düzeylerinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

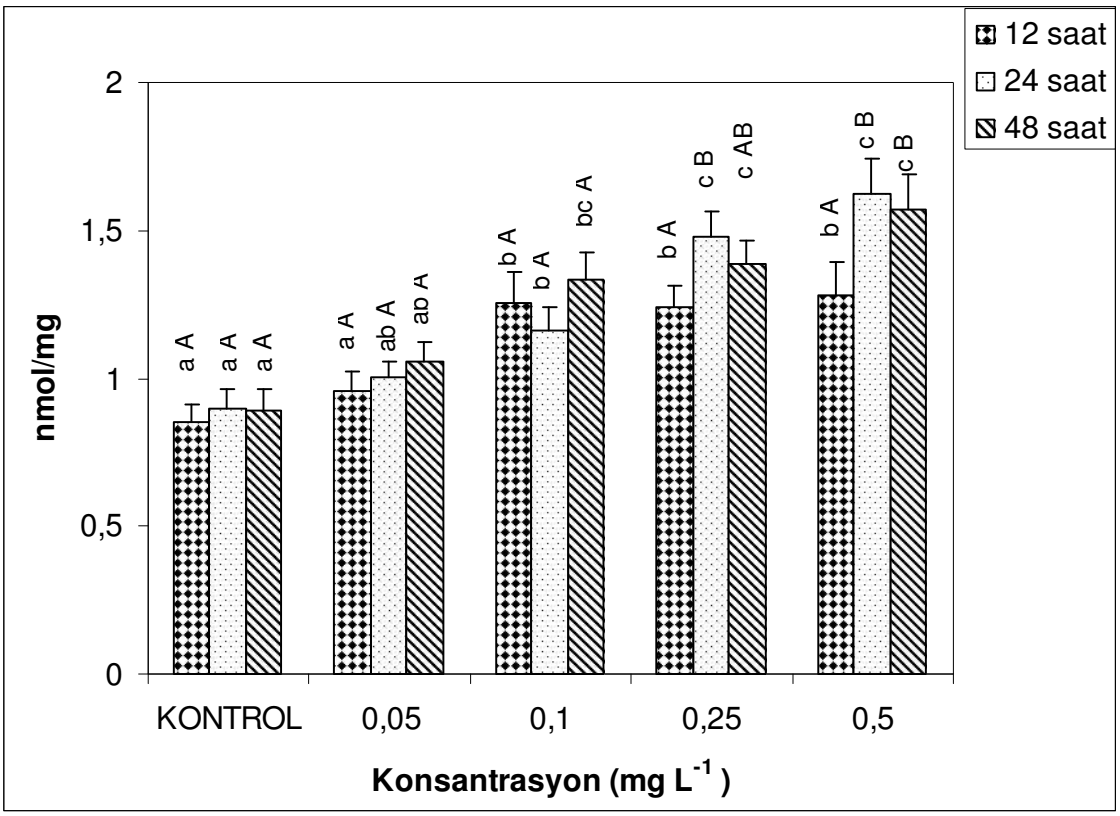
3.1.2 Arsenitin Etkisi

Arsenit için MDA düzeyindeki en yüksek artış kontrole göre 24 saat uygulama süresi ve 0.5 mg L^{-1} uygulama konsantrasyonunda bulunmuştur (% 82). 12 saat uygulama süresi için tüm konsantrasyonlar karşılaştırıldığında kontrole göre 0.1 mg L^{-1} de bir artış belirlenmiştir. 0.1 mg L^{-1}'e göre konsantrasyon artışına bağlı olarak lipid peroksidasyon aktivitesinde önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 3.2).

24 saat uygulama süresi için uygulanan tüm konsantrasyonlar ile kontrol arasında önemli bir artış gözlenmiştir. 48 saat uygulama süresi için 24 saat uygulama süresinde olduğu gibi 0.1 mg L^{-1}'lik uygulamadan itibaren artış gözlenmiştir.

Arsenit uygulamasında her bir uygulama süresi için 0.05 mg L^{-1} ve 1 mg L^{-1} konsantrasyonlar uygulandığında süreye bağlı olarak kontrol ile bu uygulama arasında

bir fark bulunamamıştır. Uygulama konsantrasyonu O.25 mg L^{-1} de 12 saat ve 48 saat arasında bir fark yokken 24 saatlik uygulamada artış belirlenmiştir. 12 saatlik uygulama ile diğer uygulamalar arasında fark görülmüş ve artan süreye bağlı olarak MDA konsantrasyonu artmıştır.



Şekil 3.2 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da MDA düzeylerinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

3.2Arseniğin *D. magna'* da Protein Miktarına Etkisi

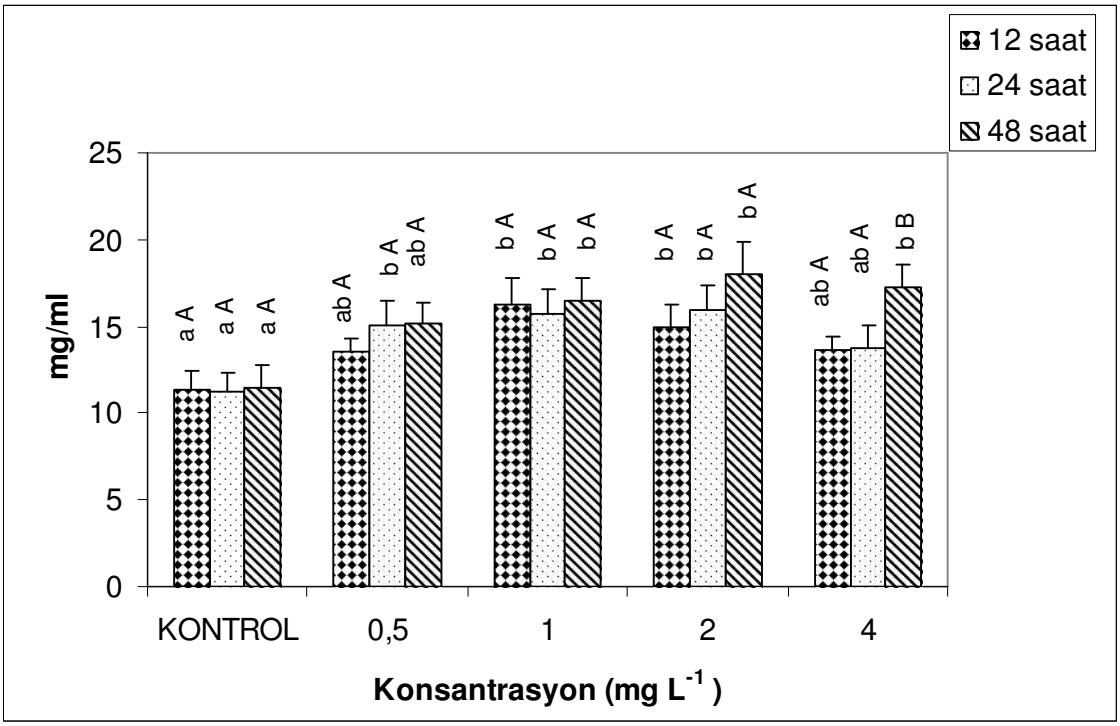
3.2.1 Arsenatın Etkisi

Arsenatın protein içeriği üzerine maksimal etkileri farklı konsantrasyon ve farklı uygulama sürelerinde olmuştur (Şekil 3.3). Protein içeriğindeki en yüksek artış arsenat ile muamele edilmiş *D. magna'* da 48 saat 2 mg L^{-1} uygulamasında gözlenmiştir. Bu

artış kontrole göre % 57 oranındadır. arsenat için tüm çalışma konsantrasyonlarında hiçbir değer kontrole göre düşük bulunmamıştır.

Şekil 3.3' te gösterildiği gibi arsenat uygulamasında hem konsantrasyonlar hem de uygulama süreleri arasındaki fark karşılaştırılmıştır. 12 saat uygulama süresinde kontrol ve 0.5 mg L^{-1} arasındaki fark istatiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$). 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} arsenat uygulamalarında kontrole göre artış gözlenmiştir. 4 mg L^{-1} de 2 mg L^{-1}'e göre bir düşüş gözlenmiş olup kontrol ve 0.5 mg L^{-1} ile arasındaki fark istatiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$). 24 saat arsenat uygulaması için kontrole göre 0.5 mg L^{-1} de artış görülmüştür. 0.5 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} uygulamalarındaki fark önemsiz bulunmuştur. Fakat bu üç konsantrasyon kontrole göre yüksek olduğu belirlenmiştir. 4 mg L^{-1} de ise tekrar bir düşüş olmuştur. 4 mg L^{-1} ile kontrol arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$). 48 saatte arsenat uygulaması için kontrol ve 0.5 mg L^{-1} arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$). 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} de kontrole göre artış vardır. Ancak 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1}'in kendi aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p< 0.05$).

Arsenat uygulamasında her bir konsantrasyon için 12 saat, 24 saat ve 48 saat uygulama süreleri karşılaştırılmıştır. Buna göre kontrol, 0.5 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} uygulamalarında uygulama süreleri bakımından aralarında fark görülmemiştir. 4 mg L^{-1} de ise 12 saat ve 24 saatteki fark önemsizken 48 saatte bir artış gözlenmiştir.



Şekil 3.3 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da protein içeriğinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

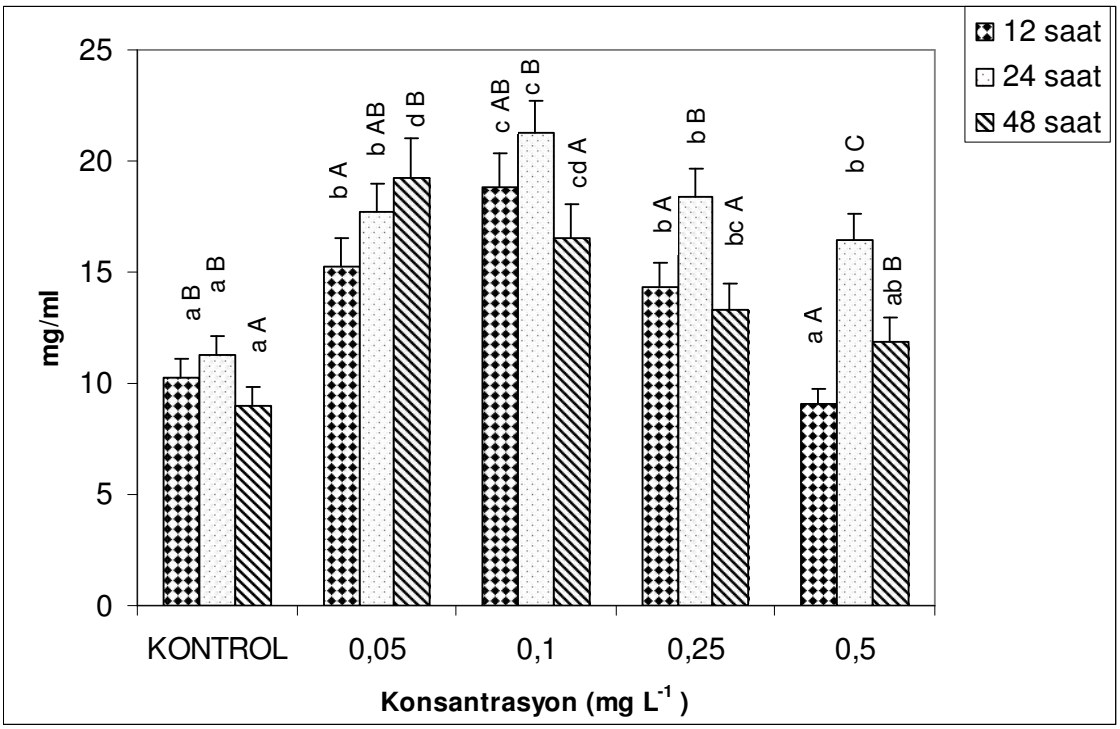
3.2.2 Arsenitin Etkisi

Arsenit ile muamele edilen *D. magna'* da 24 saat uygulamasında 0.1 mg L^{-1}'de kontrole göre en yüksek artış % 88 olarak bulunmuştur. Kontrole göre 0.5 mg L^{-1} ve 12 saatteki protein içeriği en düşük bulunmuştur.

Şekil 3.4' te görüldüğü gibi arsenit uygulamasında uygulama süreleri bakımından tüm konsantrasyonlar karşılaştırılmıştır. Buna göre 12 saat uygulama süresinde, kontrole göre 0.05 ve 0.1 mg L^{-1}'de istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmiştir. Konsantrasyon miktarı arttıkça protein miktarında önemli oranda doğrusal bir azalma görülmüştür.

24 saat uygulama süresinde ise en yüksek artış 0.1 mg L^{-1} de gözlenmiştir. Kontrole göre protein içeriği 0.1 mg L^{-1}'e kadar doğrusal bir artış göstermiştir. 0.25 mg L^{-1}'den itibaren ise protein miktarında önemli oranda bir azalma göstermiştir. 48 saat uygulama süresinde kontrole göre en yüksek artış 0.05 mg L^{-1} de bulunmuştur. Fakat artan konsantrasyonlarda protein içeriğinin azaldığı belirlenmiştir.

Uygulama süreleri bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında kontrol için 48 saat uygulama süresi 12 saat ve 24 saate göre düşük bulunmuştur. 0.25 mg L^{-1} de 12 saat ve 48 saat uygulama sürelerinin kendi arasındaki fark önemsizken 24 saat uygulama süresinde bir artış gözlenmiştir. Arsenit uygulamalarında 0.1, 0.25 ve 0.5 mg L^{-1}'lik konsantrasyonlarda 24 saat uygulama süresinin 12 ve 48 saat uygulamalara göre protein içeriğinin daha çok arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 3.4 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da protein içeriğinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

3.3 Arseniğin *D. magna'* da SOD Aktivitesine Etkisi

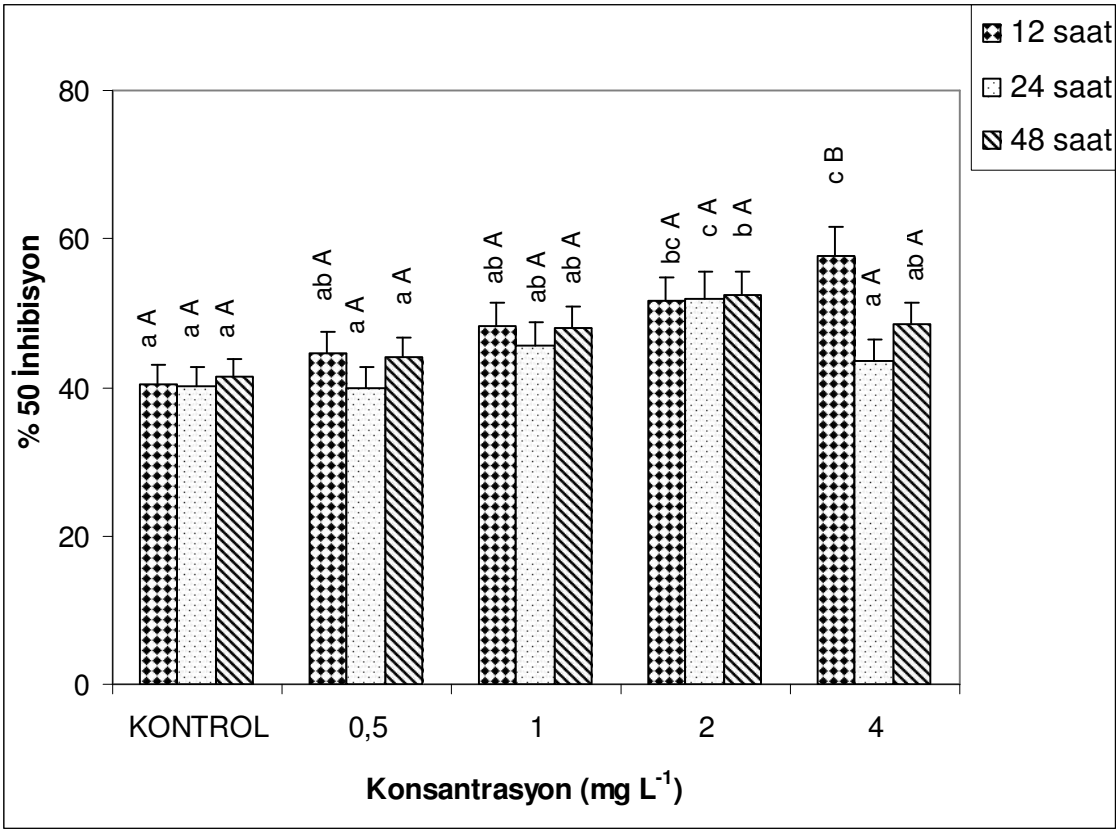
3.3.1 Arsenatın Etkisi

Kontrole göre en yüksek artış (% 42) 12 saat süre ile 4 mg L^{-1} arsenat uygulanmasında görülmüştür. Sadece 12 saat uygulama süresinde konsantrasyon artıkça SOD değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

Şekil 3.5'te görüldüğü gibi arsenat uygulamasında konsantrasyon artışına bağlı olarak SOD aktivitesinde artış gözlenmiştir. 24 saat uygulama süresinde 2 mg L^{-1} deki değer

en yüksek bulunmuştur. 48 saat uygulama süresinde SOD aktivitesi 2 mg L^{-1}'e kadar artmıştır. Fakat 4 mg L^{-1} de bir azalma gözlenmiştir.

Konsantrasyonlar uygulama süreleri bakımından karşılaştırıldığında kontrol, 0.5 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} konsantrasyonlarda fark önemsiz bulunmuştur ($p<0.05$). 4 mg L^{-1} de ise 12 saat uygulama süresinde bir artış vardır. 12 saatte ki SOD aktivitesi 24 ve 48 saattekinden yüksek bulunmuştur.



Şekil 3.5 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da SOD aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

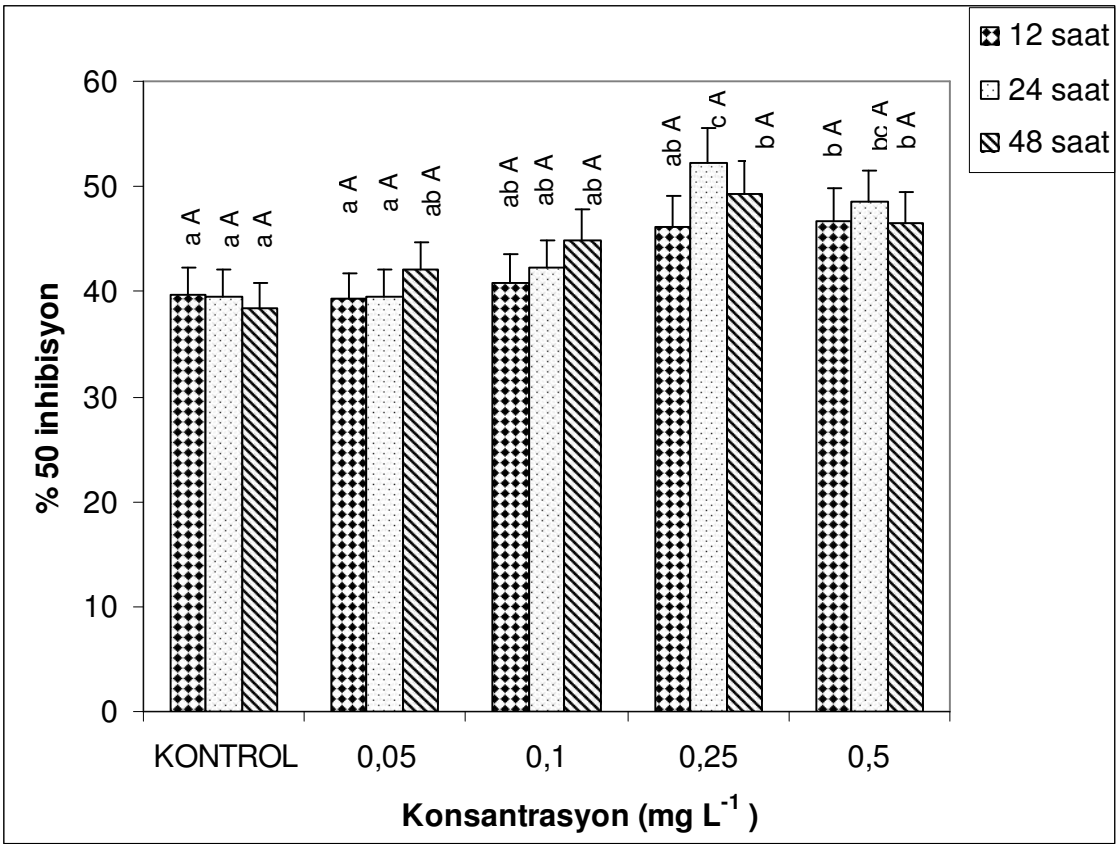
3.3.2 Arsenitin Etkisi

Arsenit SOD aktivitesi 24 saat uygulama süresinde 0.25 mg L^{-1}'de en yüksek artış gözlenmiştir ve bu artış kontrole göre % 32 olarak bulunmuştur.

Şekil 3.6' da Arsenit için 12 saatlik uygulama süresi için her bir konsantrasyon karşılaştırılmıştır. Kontrole göre 0.5 mg L^{-1}' e kadar arsenit uygulamasında düzenli bir

artış gözlenmiştir. 24 saat uygulama süresinde 0.25 mg L^{-1} de en yüksek artış gözlenmiştir. 48 saat uygulama süresinde kontrole göre 0.25 mg L^{-1}'e kadar düzenli bir artış gözlenmiştir. 0.25 mg L^{-1} ve 0.5 mg L^{-1} 'in kendi aralarındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Arsenit uygulamasında konsantrasyonların her biri 12 saat, 24 saat ve 48 saatlik uygulama süreleri bakımından karşılaştırılmıştır. Tüm konsantrasyonlar için SOD aktivitesinin uygulama sürelerinden önemli düzeyde etkilenmediği belirlenmiştir.



Şekil 3.6 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da SOD aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

3.4 Arseniğin *D. magna'* da CAT Aktivitesine Etkisi

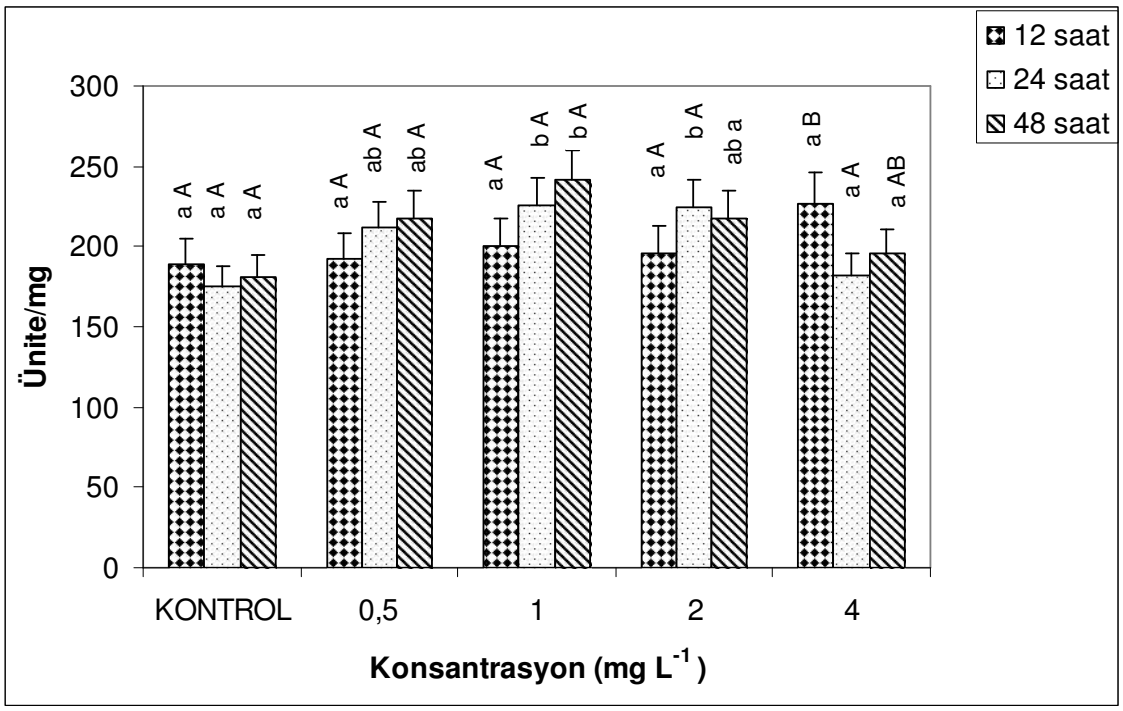
3.4.1 Arsenatın Etkisi

Arsenat uygulaması için CAT aktivitesi 48 saat uygulama süresinde 1 mg L^{-1} konsantrasyonda en yüksek bulunmuştur (Şekil 3.7). Bu değer kontrole göre % 28' lik

bir artıştır. Arsenat için çalışılan konsantrasyon aralığında hiçbir değer kontrole göre düşük bulunmamıştır ($p< 0.05$).

Şekil 3.7' de arsenat uygulamasında tüm konsantrasyonlar için her bir uygulama süresine göre karşılaştırma yapılmıştır. 12 saat uygulama süresine göre yapılan karşılaştırmada, konsantrasyon artışına bağlı bir fark gözlenmemiştir ($p< 0.05$). 24 saat uygulamada kontrol göre 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1}'lik arsenat uygulamasında bir artış gözlenmiştir. 4 mg L^{-1} de ise 2 mg L^{-1}' e göre bir azalma görülmüştür. 48 saat uygulamada 1 mg L^{-1}'e kadar düzenli bir artış görülmüştür. Daha sonra düzenli bir azalma görülmüştür.

Arsenat uygulamasında her bir konsantrasyon tüm uygulama süreleri bakımından karşılaştırıldığında, kontrol, 0.5 mg L^{-1}, 1 mg L^{-1} ve 2 mg L^{-1} konsantrasyonlarda 12 saat, 24 saat ve 48 saat uygulama süreleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 4 mg L^{-1} konsantrasyonda, en düşük değer 24 saat en yüksek değer ise 12 saat arsenat uygulamasında gözlenmiştir.



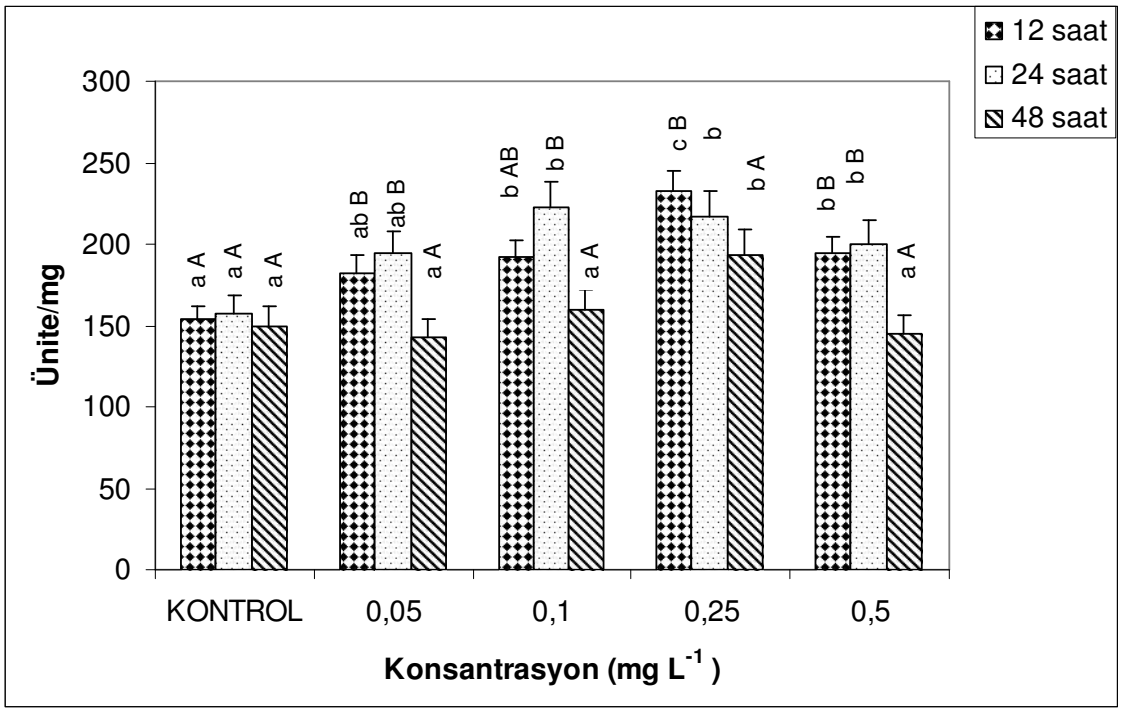
Şekil 3.7 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da CAT aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

3.4.2 Arsenitin Etkisi

Arsenit için CAT aktivitesi, kontrole göre % 51' lik artışla en yüksek, uygulama süresi 12 saat ve 0.25 mg L^{-1} konsantrasyonda olmuştur. Arsenit ile muamelelerde 12 ve 24 saat uygulamalarda tüm konsantrasyonlarda kontrol değerinin altında değildir. Ancak 48 saat uygulamada 0.05 ve 0.5 mg L^{-1} konsantrasyonların CAT aktivitesi kontrol değerinden düşük bulunmuştur.

Şekil 3.8' de arsenit uygulamasında 12 saat uygulama süresinde 0.25 mg L^{-1}'e kadar CAT aktivitesinde düzenli bir artış olmuştur. 0.5 mg L^{-1} de ise 0.25 mg L^{-1}'e göre bir düşüş gözlenmiştir. 24 saat uygulamada ise 0.1 mg L^{-1}'e kadar (kontrol, 0.05 mg L^{-1}, 0.1 mg L^{-1}) düzenli bir artış gözlenmiştir. Fakat artan konsantrasyonlarda CAT aktivitesi bakımından önemli bir fark bulunamamıştır ($p< 0.05$). 48 saat uygulama süresi için sadece 0.25 mg L^{-1} uygulaması diğerlerinden yüksek bulunmuştur. 48 saat uygulaması için CAT aktivitesi üzerine konsantrasyon artışının önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p< 0.05$).

Arsenit uygulamasında konsantrasyonlara göre uygulama süreleri bakımından karşılaştırma yapıldığında kontrol grubunda 12 saat, 24 saat ve 48 saat uygulama süreleri bakımından fark istatiksel bir farklılık bulunmamıştır ($p< 0.05$). 0.05 mg L^{-1}'e göre yapılan karşılaştırmada ise 12 saat ve 24 saat uygulama süreleri arasında önemli bir fark bulunmamıştır. 48 saatte uygulama süresinde ise bu değerlere göre düşük olduğu belirlenmiştir. 0.1 mg L^{-1} de yapılan karşılaştırmada, en yüksek değer 24 saatte en düşük ise 48 saatte gözlenmiştir. 0.25 mg L^{-1} de yapılan karşılaştırmada en yüksek değer 12 saat uygulama süresinde en düşük ise 48 saat uygulama süresinde gözlenmiştir. 0,5 mg L^{-1} için 12 saat ve 24 saat uygulama süreleri arasında önemli bir fark bulunmamış, fakat 48 saat uygulamasının 12 ve 24 saat uygulamalarına göre düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.8 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenite maruz bırakılmış *D. magna*'da CAT aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

3.5 Arseniğin *D. magna'* da APX Aktivitesine Etkisi

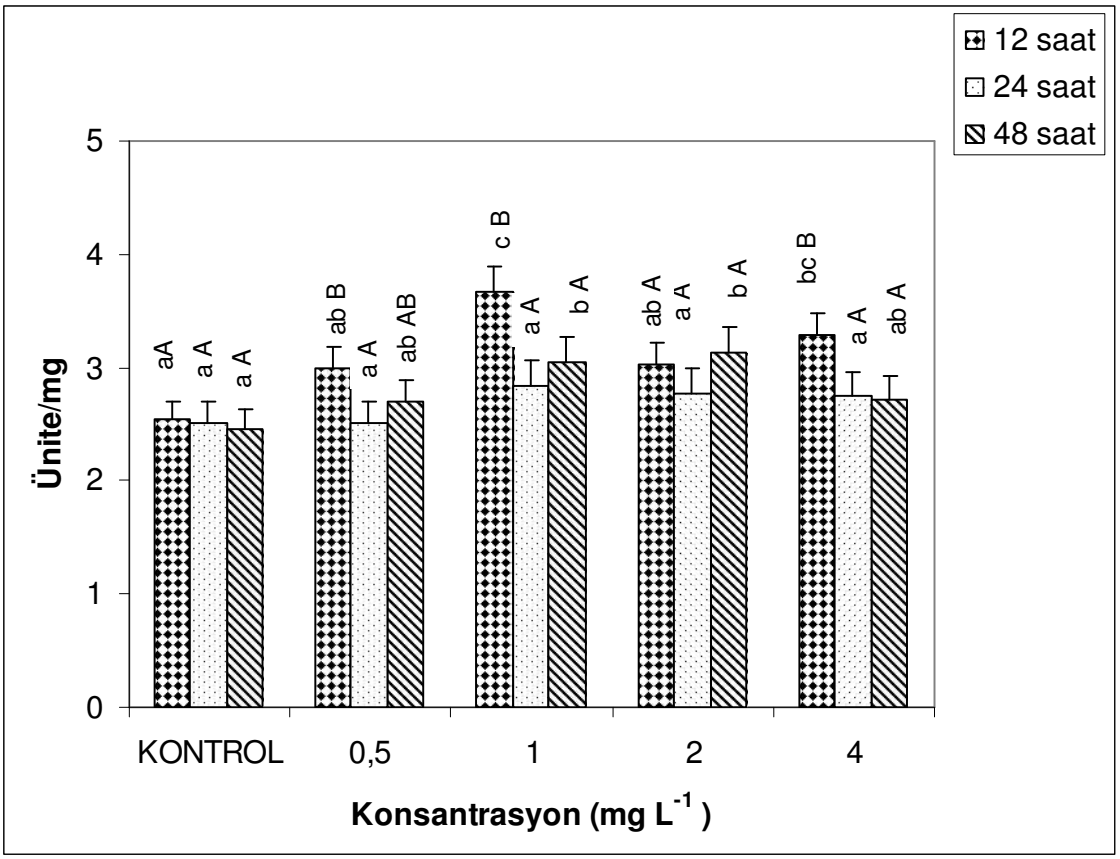
3.5.1 Arsenatın Etkisi

Arsenat ile muamele edilmiş *D. magna'* ların askorbat peroksidaz aktivitesi en yüksek 12 saat uygulama süresinde ve 1 mg L^{-1} arsenat uygulamasında gözlenmiştir. Bu artış kontrole göre % 44 olarak bulunmuştur. Arsenat için konsantrasyon aralığında hiçbir değer kontrole göre düşük bulunmamıştır.

Şekil 3.9' da arsenat için uygulama sürelerine göre konsantrasyonlar arasında yapılan karşılaştırmada, 12 saat uygulama süresinde en yüksek APX değeri arsenat uygulamasında 1 mg L^{-1} konsantrasyonda görülmüştür. 24 saat arsenat uygulamasının konsantrasyon artışına bağlı olarak APX aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. 48 saat uygulama süresi için 1 ve 2 mg L^{-1} arsenat uygulamasının kontrole göre APX aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Arsenat için her bir konsantrasyonu tüm uygulama süreleri içerisinde karşılaştırıldığında kontrol ve 2 mg L^{-}

[1], de ki tüm uygulama sürelerindeki fark önemsiz bulunmuştur. Fakat 0.5 mg L^{-1} için en yüksek değer 12 saatte en düşük değeri ise 24 saatte bulunmuştur.

Diğer konsantrasyonlar için 12 saat uygulama süresinin APX aktivitesine 24 ve 48 saate oranla daha çok arttırdığı belirlenmiştir.



Şekil 3.9 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arsenata maruz bırakılmış *D. magna*'da APX aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

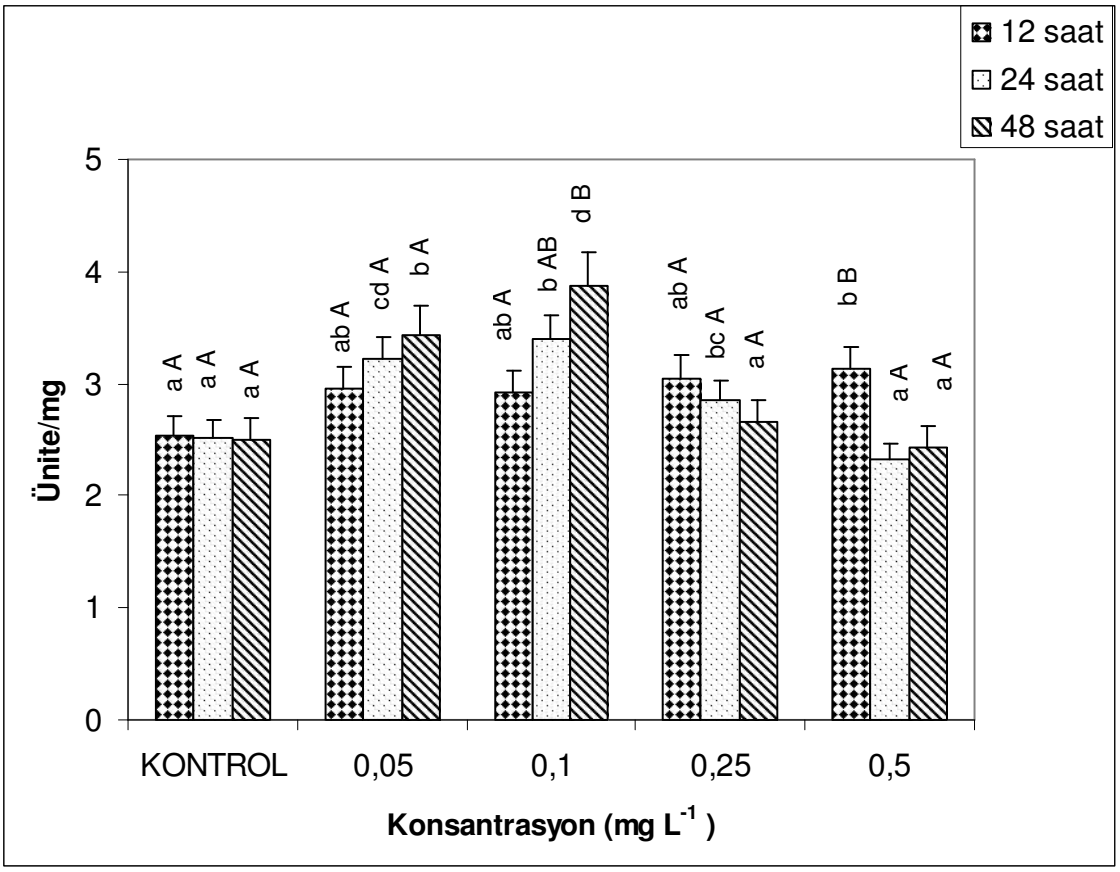
3.5.2 Arsenitin Etkisi

Arsenit için APX aktivitesinin maksimum olduğu değer kontrole göre % 51' lik bir artış ile 48 saat 0.1 ppm uygulamasında gözlenmiştir.

Şekil 3.10' da görüldüğü gibi arsenit için 12 saat uygulama süresinde tüm konsantrasyonlar karşılaştırılmıştır. Buna göre en yüksek değer kontrole göre 0.5 mg L^{-1} de en düşük değer de kontrolde gözlenmiştir. 0.05 mg L^{-1}, 0.1 mg L^{-1} ve 0.25 mg L^{-1} de

ise aralarında önemli bir fark bulunamamıştır. 24 saat uygulama süresi için konsantrasyon 0.1 mg L^{-1}'e ulaşıncaya kadar artmış, konsantrasyon artışına bağlı olarak APX aktivitesi azalmıştır. 48 saat uygulama süresi için 0.05 ve 0.1 mg L^{-1} Arsenit uygulaması kontrole göre APX aktivitesini arttırmış, fakat, 0.25 ve 0.5 mg L^{-1} uygulamalarında ise bir azalma gözlenmiştir.

Arsenit uygulamasında konsantrasyonlar açısından uygulama süreleri karşılaştırıldığında kontrole göre 0.05 mg L^{-1} ve 0.25 mg L^{-1} konsantrasyonları arasındaki fark uygulama süreleri bakımından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.



Şekil 3.10 Farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arseniteA maruz bırakılmış *D. magna*'da APX aktivitesinin değişimi. Küçük harfler özel uygulama süresi için değerler arasındaki önemli farklılığı göstermektedir. Özel uygulama konsantrasyonu için büyük harflerle gösterilen değerlerin ortalaması varyans analizine göre istatiksel olarak önemliliği göstermektedir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

Arsenit bazı enzimlerin ve doku proteinlerinin yapısında bulunan sülfhidril gruplarının kuvvetli bir inhibitörüdür. Dolayısıyla hücre mebranlarına atak yaparak hücresel fonksiyonlarda bozulmalar, hatta ölümlere sebep olur [41]. Benzer şekilde arsenatta hücre fonksiyonlarında değişiklikler meydana getirebilirler. Toksik maddeler tarafından oluşturulan oksidatif stresin önemli bir göstergesi lipid peroksidasyonundaki artıştır [22]. Lipid peroksidasyonu oksiradikaller tarafından meydana getirilen doku hasarlarının en önemli mekanizması olarak değerlendirilebilir. Lipid peroksitler MDA (malondialdehit) gibi birçok maddeye dönüşebilir. MDA çeşitli biyomoleküllerle birleşebilir ve hücrede biriktirilebilirler [42]. Bu çalışmada hem arsenit hem de arsenat için artan süre ve konsantrasyonlarda kontrole göre MDA miktarının önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Lipid peroksidasyonundaki artıştan yola çıkarak arsenitin daha düşük konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonuna sebep olması arsenitin arsenata göre *D. magna* üzerine daha toksik olduğunu göstermektedir. Bizim bulgularımıza benzer olarak Sharma ve Sohn'un (2009) yaptığı çalışmada arsenitin arsenattan daha toksik olduğu belirlenmiştir [43]. Elde edilen bulgular ışığında arsenat için MDA miktarı üzerine uygulama süresinden çok uygulanan konsantrasyonun etkili olduğu belirlenmiştir. Çünkü uygulanan konsantrasyonlardan sadece 4 mg L^{-1} arsenat uygulamasında uygulama süreleri bakımından bir farklılık görülmüştür. Ancak arsenit

uygulaması için 0.25 mg L^{-1} ve 0.5 mg L^{-1} uygulamalarında uygulama sürelerine bağlı bir değişim gözlenmiştir.

Protein içeriği doğal ve doğal olmayan stres faktörleri tarafından meydana getirilen oksidatif stresin güvenilir bir indikatörü olarak değerlendirilebilir [44]. *Daphnia* türleri tatlı sulardaki besin zincirinin anahtar organizmalarıdır ve sıklıkla çevresel çalışmalarda model organizma olarak kullanılırlar. Reaktif oksijen türleri (ROS) normal oksidatif metabolizmanın ürünü olarak sürekli üretilir [45]. Fakat artan stres koşullarında reaktif oksijen türlerinin miktarı artmaktadır. *D. magna*' nın reaktif oksijen türlerini su (H_2O) ve O_2' ye dönüştüren etkin bir antioksidan enzim sistemine sahip olduğu bilinmektedir [22]. Bu çalışmada düşük uygulama süresi ve konsantrasyonlarda protein içeriğinin her iki arsenik türü içinde arttığı belirlenmiştir. Bu durumun sebebi, oluşan reaktif oksijen türlerine karşı oluşturulan düşük moleküler ağırlıklı antioksidan enzimlerden kaynaklanıyor olmalıdır. Özellikle arsenit uygulaması için protein içeriği artan uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. Protein konsantrasyonundaki düşüşün sebebi, reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olmalıdır. *Mugil cephalus* ile yapılan çalışmada kirlenmiş nehir ağızlarından yakalanan balıklarda protein içeriğinin düştüğünü bunun sebebini de kirlilik sonucu oluşan reaktif oksijen türleri olduğu gösterilmiştir [46]. Yine bu çalışmada arsenitin arsenata göre protein içeriğini çok daha fazla etkilediği belirlenmiştir.

SOD; reaktif oksijen türlerine karşı oluşturulan hücresel savunma sisteminin anahtar bir enzimi olarak değerlendirilmektedir. SOD enzim aktivitesi ile hidroksit radikalleri oluşumu azalır. SOD aktivitesinin artması ile H_2O_2'nin konsantrasyonu artar. *Diplotus sargus* metal akümülasyonuna karşı oluşturulan oksidatif stresi incelenmiş ve bizim bulgularımızı destekler şekilde metal artışına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir [47]. Bu çalışmada hem arsenitin hem de arsenatın SOD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Ancak SOD aktivitesinin belirli bir konsantrasyonda ve uygulama süresinden sonra azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum enzimin bu konsantrasyonlarda inhibe edildiği şeklinde yorumlanabilir. Enzim aktivitesindeki azalışın nedeni hücre içerisinde oluşan H_2O_2'nin SOD enzimini inhibe etmesi olabilir.

Katalaz; SOD enzimi tarafından üretilen H_2O_2'yi su (H_2O) ve O_2' ye dönüştüren bir enzimdir. CAT aktivitesi de düşük uygulama süreleri ve konsantrasyonlarda artmış,

fakat artan konsantrasyonlarda CAT enzim aktivitesi azalmıştır. Düşük konsantrasyonlarda CAT enzim aktivitesinin artmasının sebebi düşük konsantrasyonlardaki SOD aktivitesinin yüksek olması nedeniyle SOD' un substratı olan su H_2O_2 düzeyinin yüksek olması olabilir. Artan konsantrasyon ve uygulama sürelerinde CAT enziminin artan konsantrasyon ve sürelerde artması ise CAT enziminin inaktivasyonu sebebiyle olmalıdır. Bu çalışmada CAT enzim aktivitesi üzerine arsenitin arsenattan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim bulgularımıza benzer olarak Barata ve ark. (2005) Cd ile muamele ettiği *D. magna*'da 5 μg L^{-1} uygulamasının kontrole göre CAT aktivitesini azalttığını belirlemişlerdir [23]. Ancak 20 μg L^{-1}'lik Cu uygulamasının CAT aktivitesini kontrole göre önemli oranda arttırdığını belirlemişler. Barata ve ark. (2005) çalışması ile bizim çalışmamız birlikte değerlendirildiğinde uygulanan metalin türüne ve oksidasyon seviyesine bağlı olarak canlıların verdiği antioksidan cevabın birbirinden farklı olduğu görülmektedir.

APX' te CAT gibi H_2O_2'yi temizleyen bir enzimdir. APX askorbatı elektron alıcısı olarak kullanır ve H_2O_2'yi parçalar. Arsenat uygulaması *D. magna*'nın APX aktivitesi üzerine çok ani değişiklikler meydana getirmezken, arsenit uygulamasında ani değişiklikler meydana getirmiştir. Örneğin 48 saat arsenit uygulaması için APX değeri, 0.1 mg L^{-1}' e kadar artmış fakat artan konsantrasyonlarda önemli bir azalma görülmüştür.

Bu çalışmada sonuç olarak, *D. magna'*nın hem arsenit hem de arsenata karşı biyolojik bir tepkisi vardır. Ancak bu tepki farklı konsantrasyonlarda ve farklı uygulama sürelerinde olmuştur. *D. magna* üzerine arsenitin etkisinin arsenattan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Genel olarak MDA düzeylerinin uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak sürekli bir artış eğiliminde olduğu görülmektedir. Protein içeriğinin ise düşük konsantrasyon ve uygulama sürelerinde arttığı ancak artan konsantrasyon ve uygulama sürelerinde azaldığı söylenebilir. Çalışılan her üç antioksidan enzim için düşük konsantrasyon ve uygulama sürelerinde enzim aktivitesinin arttığı, ancak konsantrasyon ve uygulama süresinin artışına bağlı olarak enzim aktivitelerinin inhibe edildiği belirlenmiştir. Ayrıca *D. magna'*nın arsenik türlerine karşı oluşturduğu biyolojik cevapta hem uygulama konsantrasyonunun hem de uygulama periyodunun önemli olduğu ve mutlaka birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, arsenit (As^{+3}) ve arsenatın (As^{+5}) sucul ekosistemler üzerine etkisini ve canlıların biyolojik cevabını göstermek açısından önemlidir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Barata C., et al., *Daphnia magna* Feeding Bioassay as A Cost Effective and Ecological Relevant Sublethal Toxicity Test for Environmental Risk Assessment of Toxic Effluents, Science of The Total Enviroment, 405, 78–86, 2008.

2. Isabel R., et al., Acute and Chronic Effects of Testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to The Crustacean *Daphnia magna,* Ecotoxicology and Environmental Safety, 71, 757– 764, 2008.

3. Pretti, C., et al., Acut Ecoxicityofionic Liquids Forthreef Reshwater Organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 10, 1016, 2008.

4. Cirik, S., Gökpınar, Ş., Plankton Bilgisi ve Kültürü, s.255-257, Ege Üniversitesi Yayınları Su Ürünleri Fakültesi, Yayın no:47, Bornova- İzmir, 2006.

5. Salman, S., Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara, s. 236, 2004.

6. webs.lander.edu/rsfox/invertebrates/daphnia.htm

7. Başkan B., B., Pala, A., İçme Sularında Arsenik Kirliliği: Ülkemiz Açısından bir Değerlendirme, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 15 (1), 69-79, 2009.

8. Kumaresan, M., Riyazuddin, P., Overview of Speciation Chemistry of Arsenic, Current Science, 80, 7, 837-846, 2001.

9. Dousova, B., et al., Sorption of As(V) Species Fromaqueous Systems, Water, Air, and Soil Poll, 149, 251-267, 2003.

10. U.S. EPA., Arsenic Treatment Technologies for Soil, Waste and Water, U.S. EPA/National Service Center for Environmental Publications, Cincinnati, 2002.

11. Bissen, M., Frimmel, F.H., Arsenic A Review Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility, Acta Hydrochim, Hydrobiol., 1, 9-18, 2003.

12. Chou, H.S.J., Rosa, C.T.D., Case Studies Arsenic, J. Hyg. Env. Health., 206, 381-386, 2003.

13. Matschullat, J., Arsenic in The Geosphere A Review, Sci. Total Env., 249, 297-312, 2000.

14. Jain, A., et al., Arsenite and Arsenate Adsorption on Ferrihydrite: Surface Charge Reduction and Net oh-release Stoichiometry, Env. Sci. & Tech., 33 (8), 1179-1184, 1999.

15. Sadiq, M., et al., Geochemical Behavior of Arsenic in Kelly Lake, Ontario, Water Air and Soil Poll., 141, 299-312, 2002.

16. Doğan, M., ve ark., Geogenic Arsenic and Survey of Skin lesions in The Emet Region of Kutahya, Turkey, Indoor Built Env., 14(6), 533-536, 2005.

17. Mandal, B.K., Suzuki, K.T., Arsenic Round The World: A Review, Talanta, 58 (1), 201-235, 2002.

18. Moore, K., Treatment of Arsenic Contaminated Groundwater Using Oxidation and Membrane Filtration, Master of Applied Science in Civil Engineering, University of Waterloo, 2005.

19. Wang, S., Mulligan, C.N., Arsenic in Canada, Proceedings of the 57th Canadian Geotechnical Conference,1-18. Quebec, Canada, 2004.

20. Yücer, M.M., Ruhsatlı Tarım İlaçları 2008, Hasat Yayıncılık, İstanbul, s 355, 2008.

21. Smedley, PL., Kinniburg, DG., A Review of the Source, Behaviour and Distribution of Arsenic in Natural Waters, APPL GEOCHEM, 17, 517-568, 2002.

22. WHO., Guidelines for drinking-water Quality, World Health Organization, Genova, 1993.

23. Barata C., et al., Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in The Freshwater Cladoceran *Daphnia magna* Exposed to Redox Cycling Compounds, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Volume 140, Issue 2, Pages 175-186, February 2005.

24. Barata, C., et al., Changes in Antioxidant Enzyme Activities, Fatty Acid Composition and Lipid Peroxidation in *Daphnia magna* During The Aging Process, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, Volume 140, Issue 1, Pages 81-90, January 2005.

25. Parıhar M.S., et al., Responses of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Reduced Glutathione Antioxidant Defenses in Gills of The Freshwater Catfish *(Heteropneustes Fossıls)* to Short-Term Elevated Temperature, J. Therm. Biol.. 22, No. 2, pp.151-156, 1997.

26. Mishra, S., et al., Thial Metabolism and Antioxidant Systems Complement Each Other During Arsenata Detoxificiation in *Ceratophyllum demersum* L., Aquatic Toxicology, 86, 205-215, 2008.

27. Bae, J.S., Freeman S.H., Aquatic Toxicity Evaluation of New Direct Dyes to The *Daphnia magna,* Dyes and Pigments, 73, 81-85, 2007.

28. Abe, T., et al., Embryonic Development Assay with *Daphnia magna*: Aplication to Toxicity of Aniline Derivatives, Chemosphere, 45, 487-495, 2001.

29. Sandbacka, A., et al., The Acute Toxicity of Surfactants on Fish Cells, *Daphnia magna* and Fish Comparative Study, Toxicology in Vitro,14, 61–68, 2000.

30. Jemec, A., et al., Comparative Toxicity of Imidacloprid, of Its Commercial Liquid Formulation and of Diazinon to A non-target Arthropod, The Microcrustacean *Daphnia magna*, Chemosphere, 68, 1408–1418, 2007.

31. Ca´ceres, T., et al., Toxicity of Fenamiphos and Its Metabolites to The Cladoceran *Daphnia carinata*: The influence of Microbial Degradation in Natural Waters, Chemosphere, 66, 1264–1269, 2007.

32. Repetto, G., et al., A Test Battery for The Ecotoxicological Evaluation of Pentachlorophenol, Toxicology in Vitro, 15, 503–509, 2001.

33. Hoang, T.C., et al., Responses of *Daphnia magna* to Pulsed Exposures of Arsenic, Environmental Toxicology, DOI 10.1002/tox, 308-317, 2006.

34. Petterson, A., et al., Toxicity and Detoxification of Swedish Detergents and Softener Products, Chemosphere, 41, 1611-1620, 2000.

35. Jo, H.J., et al., Toxicity Identification and Reduction of Wastewaters from A Pigment Manufacturing Factory, Chemosphere, 70, 949–957, 2008.

36. Ŝepiĉ, E., et al., Toxicity of Fluoranthene and Its Biodegradation Metabolites to Aquatic Organisms, Chemosphere, 52, 1125–1133, 2003.

37. Barata, C., et al., Influence of Genetic and Enviromental Factors on The Tolerance of *Daphnia magna* Straus to Essential and non-essential Metals, Aquatic Toxicology, 42, 115-137, 1998.

38. Lowry, O.H., et al., Protein Measurement with The Folin-Phenol Reagents, J. Biol. Chem, 193, 265-275, 1951.

39. Beauchamp, C., Fridovich, I., Superoxide Dismutase:Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem., 44, 276-287, 1971.

40. Nakano, Y., Asada, K., Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbatespecific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiol., 22, 867-880, 1981.

41. Sizova, OI., et al., Arsenic-contaminated Soils: Genetically Modified *Pseudomonas spp*. and Their Arsenic-Phytoremediation Potential, J Soil Sediment, 2, 19–23, 2002.

42. Rikans, L.E., Hornbrook., K.R., Lipid Peroxidation, Antioxidant Protection and Aging, Biochimica et Biophysica Acta, 1362, 116–127, 1997.

43. Sharma, V.K., Sohn, M., Aquatic Arsenic: Toxicity, Speciation, Transformations, and Remediation, Environment International,35,743–759, 2009.

44. Levine R.L., et al., Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins, Methods Enzymol, Academic Press, New York, vol. 233, pp. 346–357, 1994.

45. Sohal, R., Metabolic Rate, Aging and Lipofucsin Accumulation, North Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 303-316, 1981.

46. Padmini, E., Rani, M.U., Evaluation of Oxidative Stres Biomarkers in Hepatocytes of Grey Mullet İnhabiting Natural and Polluted Estuaries, Science of The Total Environment, 407, 4533-4541, 2009.

47. Ferreira, M., et al., Metal Accumulation and Oxidative Stres Responses in, Cultured and Wild, White Seabream from Northwest Atlantic, Science of The Total Environment, 407, 638-646, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Selma TAŞDEMİR
Doğum Yeri ve Yılı: Kayseri, 1984
Baba Adı: Bilal
Anne Adı: Senem

1995 yılında Sümer İlkokulu'ndan, 1998 yılında Sümer Ortaokulu'ndan, 2001 yılında da Atatürk Lisesi'nden mezun oldu. 2002–2003 eğitim-öğretim yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne kayıt yaptırdı. Bu bölümden, 2006 yılında mezun oldu. Aynı yılda Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve halen bu anabilim dalında öğrenimine devam etmektedir.

İletişim Bilgileri:
Yeni Mahalle, 14. Cad. No: 94/4
38090 Kocasinan / Kayseri
Ev tlf: (352) 339 33 68

e-posta: tasdemirselma@gmail.com