MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ULTRASESE MARUZ KALAN *Carassius auratus* (PISCES:CYPRINIDAE) TÜRÜ BALIKLARDA DAVRANIŞSAL, BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

HARİKA EYLÜL ESMER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ULTRASESE MARUZ KALAN *Carassius auratus* (PISCES:CYPRINIDAE) TÜRÜ BALIKLARDA DAVRANIŞSAL, BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

HARİKA EYLÜL ESMER

(520113001)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. N. Cenk SESAL

İSTANBUL, 2016

TC.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi Harika Eylül ESMER'in **"Ultrasese Maruz Kalan *Carassius auratus* (Pisces:Cyprinidae) Türü Balıklarda Davranışsal, Biyokimyasal ve Histolojik Değişimlerin İncelenmesi."** başlıklı tez çalışması, 17 Mayıs 2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN (Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Doç. Dr. N. Cenk SESAL (Eş- Danışman)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Prof. Dr. Z. Ulya NURULLAHOĞLU (Üye)
Marmara Üniversitesi (İMZA).....

Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK (Üye)
İstanbul Medeniyet Üniversitesi (İMZA).....

Doç. Dr. Ayşegül MÜLAYİM (Üye)
İstanbul Üniversitesi (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30.05.2016 tarih ve 2016/12-07 sayılı kararı ile Harika Eylül ESMER'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Ugur YAHŞİ

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her anımda yanımda olan, bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren, zorluklar karşısında yılmadan yoluma devam etmemi sağlayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN'a sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Yaratıcı fikirleriyle, çalışma azmiyle, öğrenmeye ve öğretmeye olan sevgisiyle tezime yön veren değerli eş danışmanım Sayın Doç. Dr. N. Cenk SESAL'a çok teşekkür ederim.

Algler hakkında bilgi edinip, laboratuvar imkanlarını kullanmamda destek olan hocam Sayın Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK ve ekibine, tezime sağladıkları katkıdan dolayı çok teşekkür ederim.

Histolojik analizlerin yapılması ve görüntülenmesi konusunda sağladıkları bilgiler ve laboratuvar imkanlarından dolayı, hocalarım Sayın Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ, Sayın Arş. Gör. Cansu AKBULUT ve ekiplerine çok teşekkür ederim.

Laboratuvar malzeme ve koşullarını kullanmamda her zaman yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Filiz VARDAR'a teşekkür ederim.

Ekibin ne anlama geldiğini anlamamı sağlayan, hem hocalarım hem ablalarım olan, maddi ve manevi olarak desteklerini hiç eksik etmeyen Uzman Biyolog Güllü KAYMAK ve Uzman Biyolog Şeyma TARTAR'a tüm içtenliğim ile teşekkür ederim.

Tezimde alglerin görüntülenmesi konusunda yardımını esirgemeyen arkadaşım Uzman Biyolog Barış GÖKALSIN'a ve tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimin ailede başladığını öğreten, her koşulda yanımda olup desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili babam Ahmet Uğur ESMER'e, sevgili annem Gülnihal ESMER'e, hayatıma renk katan minik yeğenim Hamza ODACI ve ailesine teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca maddi destek sağladığı için TÜBİTAK-BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na teşekkür ederim.

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından, FEN-C-YLP-121214-0389 no'lu proje ile desteklenmiştir, teşekkür ederim.

Mayıs, 2016 **Harika Eylül ESMER**

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR	**i**
İÇİNDEKİLER	**ii**
ÖZET	**v**
ABSTRACT	**vi**
SEMBOLLER	**vii**
KISALTMALAR	**viii**
ŞEKİL LİSTESİ	**ix**
TABLO LİSTESİ	**xii**
1. GİRİŞ	**1**
1.1. Ötrofikasyon	**1**
1.1.1. Algler	**3**
1.1.1.1. Siyanobakteriler	**4**
1.1.1.2. Yeşil algler	**4**
1.2. Su Arıtmada Kullanılan Bazı Temel Yöntemler	**5**
1.3. İleri Su Arıtma Teknolojileri	**6**
1.4. Ses Dalgaları ve Ultrases	**7**
1.4.1. Kavitasyon	**9**
1.5. Ultrases ve Algler	**10**
1.6. Teleost Balık Dokuları ve *Carassius auratus*'un genel özellikleri	**14**
1.6.1. Solungacın yapı ve işlevleri	**14**
1.6.2. Karaciğerin yapı ve işlevleri	**15**
1.6.3. Kalbin yapı ve işlevleri	**15**
1.6.4. Beynin yapı ve işlevleri	**16**
1.7. Oksidatif Stres	**17**
1.7.1. Antioksidan savunma sistemi	**19**
1.7.2. Antioksidan etki tipleri	**19**
1.7.2.1. Total protein	**19**

1.7.2.2. Lipit peroksidasyonu (LPO) **20**
1.7.2.3. Glutatyon **20**
1.7.2.4. Katalaz (CAT) **22**
1.7.2.5. Asetilkolinesteraz (AChE) **22**
1.8. Davranış **23**
2. MATERYAL VE YÖNTEM **26**
2.1. Materyal **26**
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler **26**
2.1.2. Kullanılan cihazlar **27**
2.1.3. *Carassius auratus*'un sistematikteki yeri **28**
2.1.3.1. *Carassius auratus*'un biyolojisi **29**
2.1.4. Yeşil alg *Chlorella variabilis*'in sistematikteki yeri **30**
2.1.4.1. Yeşil alg *Chlorella variabilis*'in biyolojisi **31**
2.1.4.2. *Chlorella variabilis*'in kültür ortamının hazırlanması **31**
2.1.4.3. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilmesi **33**
2.1.5. Ultrasonik uygulama **34**
2.2. Yöntem **35**
2.2.1. Biyokimyasal analizler
2.2.1.1. %10'luk doku homojenatı hazırlanması **35**
2.2.1.2. Dokularda protein tayini (Bradford yöntemi) **35**
2.2.1.3. Dokularda malondialdehit (MDA) tayini (Ledwozyw yöntemi) **36**
2.2.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini (Beutler yöntemi) **37**
2.2.1.5. Dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini (Aebi yöntemi) **39**
2.2.1.6. Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) tayini (Ellman yöntemi) **40**
2.2.2. Histolojik analizler **41**
2.2.3. Davranış analizleri **43**
2.2.4. İstatistiksel analizler **43**

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular **44**

3.1.1. Ön çalışma **44**

3.1.1.1. *Chlorella variabilis* ve ultrases **44**

3.1.2. Biyokimyasal bulgular **45**

3.1.2.1. Dokularda total protein tayini **45**

3.1.2.2. Dokularda MDA tayini **49**

3.1.2.3. Dokularda GSH tayini **50**

3.1.2.4. Dokularda CAT aktivitesi tayini **53**

3.1.2.5. Dokularda AChE aktivitesi tayini **56**

3.1.3. Histolojik bulgular

3.1.3.1. Kontrol grubu solungaç histolojisi **59**

3.1.3.2. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 1.gün etkisi **60**

3.1.3.3. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 4.gün etkisi **60**

3.1.3.4. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 7.gün etkisi **61**

3.1.3.5. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 1.gün etkisi **62**

3.1.3.6. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 4.gün etkisi **63**

3.1.3.7. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 7.gün etkisi **64**

3.1.4. Davranış bulguları

3.1.4.1. Bath tipi cihazın davranış üzerine etkisi **65**

3.1.4.2. Horn tipi cihazın davranış üzerine etkisi **66**

3.2. Tartışma **66**

4. SONUÇLAR **70**

KAYNAKLAR **71**

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

ULTRASESE MARUZ KALAN *Carassius auratus* (PISCES:CYPRINIDAE) TÜRÜ BALIKLARDA DAVRANIŞSAL, BİYOKİMYASAL VE HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışmasının amacı ultrasesin temizleme özelliğinin meydana getirdiği etkileri; ön çalışmalarla birlikte yeşil alglerden *Chlorella variabilis* üzerinde mikroskobik yöntemlerle ve daha sonra da *Carassius auratus* türü balıkların çeşitli dokuları (solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokuları) üzerinde farklı parametrelerle (biyokimyasal, histolojik, davranışsal) belirlemektir. Yapılan deneylerde iki farklı sonikatör tipi kullanılmıştır. 28 kHz, 800 W ve 3.10^{-4}- $7. 10^{-4}$ özgül enerji aralığında, 7 gün boyunca hergün 10 sn. uygulama bath tipi sonikatör ile yapılırken; 30 kHz, 100 W $8. 10^{-2}$- $2. 10^{-1}$ özgül enerji aralığında, 7gün boyunca hergün 1 saatlik uygulama horn tipi sonikatör ile yapılmıştır. Uygulanan ultrasesin meydana getirdiği hasarlar *Chlorella variabilis*'de multimod okuyucu tarafından saptanmıştır. *Carassius auratus* üzerinde meydana gelen hasarlar biyokimyasal olarak oksidatif stres parametreleriyle (total protein, GSH, MDA, CAT ve AChE); histolojik olarak hematoksilen-eozin boyama yöntemiyle, davranışsal olarak video kayıtlarının değerlendirilmesi gibi yöntemlerle belirlenmiştir. Özgül enerjilerine bağlı olarak bath tipi sonikatör uygulamasında CAT enzim aktivitesi, GSH miktarı ve AChE enzim aktivitesi artarken, total protein miktarı azalmıştır; horn tipi sonikatör uygulamasında CAT enzim aktivitesi, GSH miktarı, MDA miktarı ve AChE enzim aktivitesi azalırken, total protein miktarı artmıştır. Özgül enerjilerine bağlı olarak bath tipi sonikatör uygulamasında solungaç dokularında meydana gelen histolojik hasarlar; ödem, hipertrofi, hiperplazi ve merkezi vena bozukluğu olarak belirlenmiştir; horn tipi sonikatör uygulamasında hiperplazi, ödem, anevrizma ve merkezi vena daralması olarak belirlenmiştir. Davranışsal açıdan yaklaşıldığında, özgül enerjilerine bağlı olarak bath tipi sonikatör uygulamasında ters dönmüş abdomen, yüzmenin yavaşlaması, tepkisizlik gözlenirken; horn tipi sonikatör uygulamasında yüzme yavaşlaması ve tepkisizlik gözlenmiş ancak ters dönmüş abdomen gözlenmemiştir. Sonuç olarak; bu tez ötrofikasyon ve su arıtmayla ilgili yapılacak olan ileri çalışmalara temel oluşturacaktır.

Mayıs, 2016 **Harika Eylül ESMER**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BEHAVIORAL, BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES IN *Carassius auratus* (PISCES:CYPRINIDAE) EXPOSED TO ULTRASOUND

The aim of this study, to determine the effects of cleaning features of ultrasound method; with preliminary studies on green algae *Chlorella variabilis* with microscopic methods and then on *Carassius auratus* species of several tissues (gills, liver, heart and brain tissues) with various parameters (biochemical, histological and behavioral). The experiments were performed with two different ultrasonic application device. First application was performed with bath type sonicator in the 28 kHz, 800 W and 3.10^{-4}-7.10^{-4} spesific energy range, for 10 sec. each day for a week. Second application was performed with horn type sonicator in the 30 kHz, 100 W and 8.10^{-2}-2.10^{-1} spesific energy range, for 1 hour each day for a week. The damages caused by ultrasonicator on *Chlorella variabilis* determined by multimod reader. The damages determined biochemically with oxidative stress parameters (GSH, CAT, MDA, AChE and total protein); histologically with hematoxylin and eosin dyeing method; behaviorally with evaluating video records. Depending on their specific energies, in bath type sonicator; CAT enzyme activity, GSH levels and AChE enzyme activity were increased whereas total protein was decreased. On the other hand, in horn type sonicator; CAT enzyme activity, GSH levels, MDA levels and AChE enzyme activity were decreased but total protein was increased. Depending on their specific energies, in bath type sonicator application; the histological damage on the gill tissue, edema, hypertrophy, hyperplasia and central vein disorder were determined. In horn type sonicator application, hyperplasia, edema, aneurysm and narrowing central vein were determined. When we approach in terms of behavior, depending on their specific energies, in bath type sonicator application; reversed abdomen, slowed walking, responsiveness were observed; and also in horn type sonicator application, except reversed abdomen, the same behaviors were observed. As a conclusion, this thesis will form a basis for further studies about eutrophication and water treatment.

May, 2016 **Harika Eylül ESMER**

SEMBOLLER

°C : Derece Celcius

·OH : Hidroksil Radikali

atm : Atmosfer

cm : Santimetre

CO_2 : Karbondioksit

dk. : Dakika

g : Gram

GHz : Giga Hertz

H· : Hidrojen Atomu

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

kg : Kilogram

kHz : Kilo Hertz

l : Litre

mg : Miligram

MHz : Mega Hertz

ml : Mililitre

mM : Mili Molar

MPa : Megapascal

nm : Nanometre

ppm : mg/l

-SH : Sülfidril Grubu

sn. : Saniye

Ü/mg : Ünite/miligram

W : Watt

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

KISALTMALAR

AChE : Asetilkolinesteraz

ATP : Adenozin Tri Fosfat

BSA : Sığır Serum Albümin

CAT : Katalaz

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DTNB : Ellman Reaktifi (5-5'- Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit))

EDTA : Etilendiamin Tetraasetikasit

GSH : İndirgenmiş Glutatyon

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

GSSG : Okside Glutatyon

H&E :Hematoksilen-Eozin

LPO : Lipit Peroksidasyonu

MDA : Malondialdehit

PS : Fotosistem

ROT : Reaktif Oksijen Türler

SOD: Süper Oksit Dismutaz

TBA : Tiyobarbitürik Asit

TCA : Trikloroasetik Asit

UV : Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. Göle azot ve fosfor ilavesi süreci. **2**

Şekil 1.2. *Chlorella* sp. hücresi. **5**

Şekil 1.3. Ses dalgalarına genel bakış. **7**

Şekil 1.4. Ultrasesin etki şekli. **8**

Şekil 1.5. Kavitasyon prensibine bakış. **10**

Şekil 1.6. Ultrases- uyarımlı hücre yıkımı mekanizması. **10**

Şekil 1.7. Solungaç yapısı. **14**

Şekil 1.8. Teleost kalp yapısı. **16**

Şekil 1.9. Teleost balıklarda beyin yapısı. **17**

Şekil 1.10. Oksidatif stres oluşum şeması. **18**

Şekil 1.11. Glutatyonun yapısı. **20**

Şekil 1.12. Davranışın oluşması. **24**

Şekil 2.1. *Carassius auratus*'un dış görünüşü. **28**

Şekil 2.2. *Carassius auratus* balığının morfolojisi. **29**

Şekil 2.3. *Carassius auratus* balığının anatomisi. **30**

Şekil 2.4. *Chlorella variabilis*'in ışık mikroskobundaki görünüşü. **30**

Şekil 2.5. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilme ortamı (Şematik). **33**

Şekil 2.6. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilme ortamı. **33**

Şekil 2.7. Horn tipi sonikatör. **34**

Şekil 2.8. Bath tipi sonikatör ve deney ortamı. **34**

Şekil 2.9. Protein tayini yapılmak üzere Bradford reaktifi eklenmiş doku tüpleri ve kör tüp. **36**

Şekil 2.10. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan deneyin aşamaları. **37**

Şekil 2.11. GSH miktarının belirlenmesi için yapılan santrifüj aşaması. **38**

Şekil 2.12. Alkol serileri, parafin emdirme, parafin blokları. **42**

Şekil 2.13. Mikrotomda parafin blokların kesilmesi. **42**

Şekil 3.1. 0-120 dk boyunca Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış *C.variabilis* hücrelerinin Cytation-3 ile görüntülenmesi. **44**

Şekil 3.2. Protein Standart Grafiği **45**

Şekil 3.3. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında total protein miktarları. **46**

Şekil 3.4. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında total protein miktarları. **47**

Şekil 3.5. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularındaki total protein miktarlarının karşılaştırılması. **48**

Şekil 3.6. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında MDA miktarları. **49**

Şekil 3.7. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında GSH miktarları. **50**

Şekil 3.8. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında GSH miktarları. **51**

Şekil 3.9. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularındaki GSH miktarlarının karşılaştırılması. **52**

Şekil 3.10. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında CAT enzim aktivitesi tayini. **53**

Şekil 3.11. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında CAT enzim aktivitesi tayini. **54**

Şekil 3.12. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularındaki CAT enzim aktivitesinin karşılaştırılması. **55**

Şekil 3.13. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında AChE enzim aktivitesi tayini. **56**

Şekil 3.14. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında AChE enzim aktivitesi tayini. **57**

Şekil 3.15. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularındaki AChE enzim aktivitesinin karşılaştırılması. **58**

Şekil 3.16. Kontrol grubu solungaç yapısı. **59**

Şekil 3.17. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 1. gün solungaç yapısı. **60**

Şekil 3.18. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 4. gün solungaç yapısı. **60**

Şekil 3.19. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 7. gün solungaç yapısı. **61**

Şekil 3.20. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 1. gün solungaç yapısı. **62**

Şekil 3.21. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 4. gün solungaç yapısı. **63**

Şekil 3.22. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 7. gün solungaç yapısı. **64**
Şekil 3.23. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış *C. auratus* türü balıkların davranış şekli. **65**
Şekil 3.24. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış *C. auratus* türü balıkların davranış şekli. **66**

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Alglerin sınıflandırılması. **4**

Tablo 1.2. Elektron transferi. **18**

Tablo 1.3. Oksijenden oluşan başlıca reaktif türler. **18**

Tablo 2.1. *Chlorella variabilis'*in kültür ortamı olan BG11 besi yerinin hazırlanışı. **32**

Tablo 2.2. Dokulardaki protein tayininin Bradford yöntemine göre yapılışı. **35**

Tablo 2.3. Dokulardaki MDA tayininin Ledwozyw yöntemine göre yapılışı. **37**

Tablo 2.4. Dokularda GSH miktarı tayininin Beutler yöntemine göre yapılışı. **38**

Tablo 2.5. CAT enzim aktivitesinin Aebi yöntemine göre belirlenmesi. **39**

Tablo 2.6. AChE enzim aktivitesi tayininin Ellman yöntemine göre yapılışı. **40**

Tablo 2.7. Alkol serisi ve parafin emdirme işlemi. **41**

Tablo 2.8. H&E boyama prosedürü. **42**

1. GİRİŞ

Çevre kirliliği günümüzde hızla artmakta olan bir sorundur. Endüstrileşme ve nüfus artışıyla birlikte doğaya ciddi ölçüde zarar verilmektedir. Bu tahribattan en çok etkilenen şüphesiz ki su ortamıdır. Ülkemizin üç tarafı denizlerle çevrili olmasına rağmen sulama, içme, soğutma gibi çeşitli amaçlarda kullanılan su tatlı su kaynaklarıdır. Daha genel olarak bakıldığında; canlıların yaşamı için vazgeçilmez olan tatlı su doğada kısıtlı olarak bulunmaktadır. Dünyadaki suyun %97.6'sı okyanus ve denizlerde tuzlu su olarak bulunurken kullanılabilir tatlı su göller ve akarsularda yer almaktadır (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Bu miktar ise toplam suların ancak %3.5'i kadardır. Tatlı suların %1.74'ü buzullarda katı halde, %1.66'sı sıvı halde yer altı boşluklarında bulunmaktadır (Morbidelli ve ark., 2000; Sampat, 2001; Firth ve Fisher, 2012; Tian ve Ida, 2015). Bu kadar sınırlı olan su kaynaklarının kirletilmeden korunabilmesi canlılığın devamı için gereklidir. Bu sular özellikle küresel ısınma olgusuyla birlikte bizler için daha da değerli olmuştur (Kayhan ve ark., 2015).

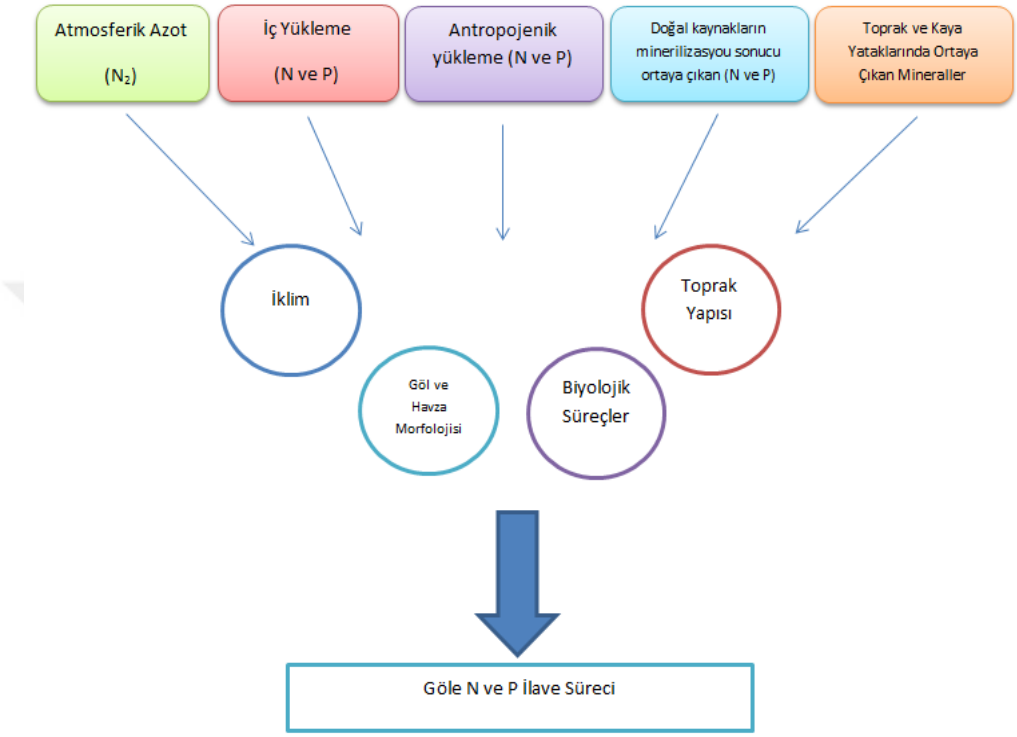
Su kaynakları aynı zamanda sucul canlılar için bir yaşam ortamıdır. Sahip olduğu ekolojik özellikleri sayesinde biyolojik çeşitliliği yüksektir (Özen ve Korkmaz 2005; Timoshkin ve ark., 2016). Göller ve akarsular gibi su kaynaklarının çevreleri yerleşik yaşama geçilen zamandan beri tarım için elverişli yerler olmuştur. Fakat göllerde akıntının olmaması ve sürekli olarak atık maddelerin doğal ve insan yoluyla birikmesiyle birlikte çeşitli sorunlarla karşılaşılmaktadır. Bu sorunlardan biri de azot ve fosfor artışına paralel olarak meydana gelen alg patlamalarıdır. Bu patlamaların sonucunda gölde ötrofikasyon meydana gelmekte, ortam anaerobikleşmekte ve ortamdaki canlılar bu durumdan olumsuz olarak etkilenmektedir.

Bu çalışmada, alg temizliğinde ikincil bir kirlenmeye neden olmadığı için kullanımı yaygınlaşmakta olan ultrasesin aynı ortamda yaşayan balıklara etkisi gözlemlenmiştir.

1.1. Ötrofikasyon

Ötrofikasyon, antropojenik etkiler de dahil olmak üzere pek çok kaynaktan çeşitli sebeplerle oluşabilen, bir su kaynağında artan besin maddesi birikimidir. Aşırı

azot ve fosfor girişi ötrofikasyonu tetikler. Bunun sonucunda su kalitesi ve ekolojik yapı bozulur (Dodds ve Welch, 2000; Ferreira ve ark., 2011). Tatlı su ekosistemleri bitki kalıntıları ve atmosferik denitrasyon sebebiyle doğal olarak azot ve fosfor minerallerini içermektedir. Ancak bu doğal mineraller insan kaynaklı olarak da aşırı artış gösterebilirler (Lewis ve ark., 2011; Bracken ve ark., 2015).



Şekil 1.1. Göle azot ve fosfor ilavesi süreci.

Göllerdeki ve rezervuarlardaki ötrofikasyon sonucunda alg patlamaları meydana gelir ve bu dünya çapında bir problemdir. Alg patlamaları sucul ekosistemlerdeki ötrofik su kütlelerinde neden olduğu yıkımdan dolayı önemlidir (Xu, 1997; Salacinska ve ark., 2010; Fortin ve ark., 2015). Göllerdeki ötrofikasyon sürecinde artan birincil üretimin sonucunda ışık, CO_2 ve besinlere ulaşım sınırlanır (Chislock ve ark., 2013). Ötrofikasyon sucul ekosistemin su kalitesindeki bir bozulma olarak görülse de fitoplanktonun geliştiği, siyanobakteri patlamalarının yaşandığı bir durumdur. Patlamaya genelde hücre konsantrasyonu >20.000 ml^{-1} olan birkaç baskın alg türü sebep olur (Schindler ve ark., 2008; Zhu ve ark, 2014; Gkelis ve ark., 2014). Bahar ve geç yaz/sonbahar patlamalarında baskın olarak diatomlar, Heterokontofita filumundan ve yeşil alglerden Chlorophyta filumundan olma eğilimindedir. Bu algal patlamalar suyun

içerisine ışığın geçişini engelleyebilir ve bu sebeple bentik mikrofitlerin gelişmesini durdurabilir (Chislock ve ark., 2013). Dahası azalan su geçirgenliği balıkların avlanmalarını zorlaştırabilir. Su içerisinde artan fotosentez pH'ı artırarak kemosensörleriyle hareket eden canlıların yaşamlarını sürdürmelerini zorlaştırabilir (Turner ve Chislock, 2010). Göllerin yüzey sularındaki alg patlamaları burada anoksik durumların ortaya çıkmasına neden olabilir ve bu da başlangıçta küçük organizmalar, sonrasında da kitlesel balık ölümlerine neden olabilir (Moss, 2010). Diğer patlama çeşitlerinin dışında siyanobakteriler aynı zamanda toksin üretebilme yeteneğine sahiplerdir. Ürettikleri bu toksinler diğer canlıları ve halk sağlığını etkilemektedir. Bu toksinlerin evcil hayvanlar ve insanlar açısından zehirli etkileri hakkında pek çok kayıt mevcuttur (Scheffer, 1997; Nyakairu ve ark., 2010; Zegura ve ark., 2011; Carmichael, 2013; Hu ve ark., 2016). Alg patlamalarının olması su arıtma maliyetin artmasına yol açar. Bunlar, tat/koku sorunları ve olası toksin birikimi gibi çevre sorunlarıdır (Johnson ve ark., 1977; Izaguirre ve ark., 1982; Bernhardt, 1984; Hutson, 1987; Bauer ve ark., 1998). Algal patlamalara yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları nütrient değişimi (Azot-Fosfor oranı), yapay tabakasızlaştırma, hipolimnetik havalandırma/ geri çevirme, sediment oksidasyon/ uzaklaştırma, fosfor çökeltilmesi ve biyomanipülasyondur (Wetzel, 2001; Ekvall ve ark., 2014; Yi ve ark., 2016). Fakat bütün bunlara rağmen patlamalar meydana gelmeye devam etmiştir. Bunun sonucunda, algal kontrol için alternatif yöntemlerin yürütülmesine gerek duyulmuştur.

1.1.1. Algler

Algler tek hücreli ve çok hücreli formları olan geniş yayılım gösteren ve çeşitli gruplara sahip olan basit tipik ototrof organizmalardır. Gerçek alglerin bulunduğu temel grupta yeşil algler, diatomlar, kırmızı algler, kahverengi algler ve flagellata algleri bulunur (van den Hoek ve ark., 1995a). Algler, modern tanımlamayla, boyutlarının 5-20µm aralığında bulunmasıyla prokaryotlardan daha büyük olan ve fotosentezi kloroplast olarak adlandırılan membrana bağlı organelde gerçekleştiren ökaryotlardır. Kloroplastlar dairesel DNA içerir ve yapısal olarak siyanobakteriye benzer, aynı zamanda hücre içinde yer almaları siyanobakterilerin endosimbiyozu olarak düşünülmektedir.

Tablo 1.1. Alglerin sınıflandırılması.

Şubesi	Ekolojik rolü
Siyanobakteriler	Mavi-yeşil algler olarak bilinir, prokaryotik sucul bakterilerdir
Proklorofitler	Prokaryotik akuatik bakterilerdir
Glaukofitler	Tatlı su mikroskobik algleri
Rodofitler	Kırmızı algler
Krisofitler	Tek hücreli altın sarısı algler
Phaeofitler	Kahverengi algler
Klorofita	Yeşil algler olarak bilinirler
Diatomlar	Tek hücreli organizmalardır
Öglenofitler	Tatlı sularda yaşar ve genel olarak tek hücreli algleri içeir
Dinoflagellatlar	Flagellatlı protistleri içeren büyük bir gruptur

1.1.1.1. Siyanobakteriler

Mavi-yeşil algler yani siyanobakteriler bakteriler gibi prokaryot olarak sınıflandırılırlar. Zarlı bir nükleusu veya organelleri yoktur ve genellikle müsilajenik bir kılıf içine yerleşmiş olan peptidoglikan bir hücre duvarı içermektedir (van den Hoek ve ark., 1995b). Tek hücreli, koloni ve ipliksi formları vardır. Yüzmeyi ve batmayı basınç yardımıyla kontrol etmekle görevli gaz vezikülleri sayesinde hareket ederler. Siyanobakteriler, fotosentez yoluyla kendi besinlerini üretmeleri nedeniyle genel olarak gerçek alglerle paralel olarak düşünülürler. Fotosentez; fotosentetik pigment, klorofil a içeren ve sitoplazmada eşit aralıklarda bulunan tilakoidler içerisinde fotosistem (PS) II ve I (Z-düzeni) aktivitesi kullanılarak yapılır.

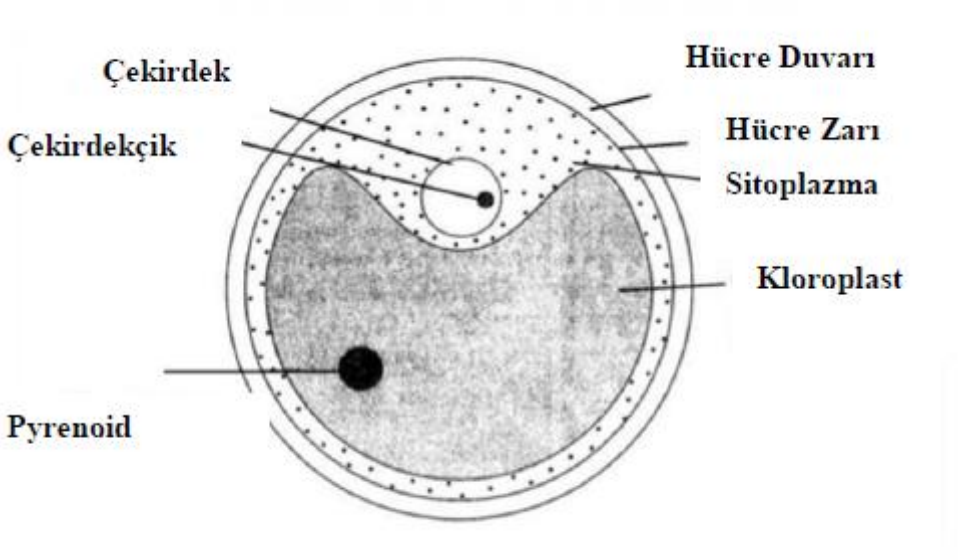
1.1.1.2. Yeşil Algler

Yeşil algler gerçek alglerdir. Ökaryotturlar, nükleus ve organel zarları vardır. Yeşil algler iki membranlı 2-6 tilakoid içeren kloroplasta sahip ilk canlılardır. Kloroplastları klorofil a, klorofil b, bir çok diğer yardımcı ksantofil, luteinizeaksantin, violaksantin, anteraksantin ve neaksantin içerir (van den Hoek, ve ark., 1995b). Hücre duvarı plazma lameli karşıtı bir tabaka şekli olan gömülü bir matrikste, fibril ve şekilsiz matriks bileşenlerinden oluşur. Şekilsiz kısım hücre duvarının dış kısmında yapışkan bir tabaka oluşturur fakat fibril tabakası bunun içindedir. Bazı yeşil alg türlerinde hücre

duvarı silika içerir. Yeşil alglerde küçük vakuoller ve yağ damlacıkları organellerin arasında yer almaktadır.

Chlorella variabilis

Yeşil algler içerisinde yer alan *Chlorella variabilis* tek hücreli kokoid yapılı hücrelerden oluşur. Tipik olarak 2-12 µm kadardır. Doğada yaygın olarak bulunmalarının yanı sıra, özellikle fizyoloji ve biyokimya laboratuvarlarında sıkça tercih edilirler (Schowanek ve ark., 1996). Son zamanlarda biyodizel üretiminde de kullanılmaktadır (Mata ve ark., 2010).



Şekil 1.2. *Chlorella* sp. hücresi. (Temli, 2013)

1.2. Su Arıtmada Kullanılan Bazı Temel Yöntemler

Sucul ortamda doğal veya antropojenik olarak meydana gelen kirliliğin ortadan kaldırılması amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler yıllar geçtikçe teknolojiyle birlikte doğaya daha az zarar verecek şekilde geliştirilmiştir. Yöntemlerden bazıları aşağıdaki gibidir:

- Ön arıtma: Temizleme yöntemlerinin ilk aşaması olan bu basamakta ayırma, havalandırma ve oksidasyon gibi aşamalar yer almaktadır. Arıtma yöntemlerine ön hazırlık niteliğindedir.

- Koagülasyon: Koagülantların suya ilave edilişini takiben hızlı bir şekilde karıştırılmalarını ve bu suyun bünyesindeki kolloidal ve askıda katı maddelerle birleşerek flok oluşturmaya hazır hâle getirilmesi için yapılan işlemlerdir.

- Flotasyon (Yüzdürme): Atık su içine hava kabarcıkları yollanması ve askıdaki partiküllerin kabarcık yüzeyine yapışması sonucu yoğunlukları azaltılarak su toplanması işlemidir.

- Nötralizasyon: Asidik ve bazik karakterdeki endüstriyel atık suların pH'ının ayarlanması işlemidir (Wu, 2010).

- Filtrasyon: Biyolojik ve kimyasal arıtma işlemlerinde giderilememiş olan askıda katı maddeleri ve kolloidlerin tutulması işlemidir.

- Dezenfeksiyon: Patojen organizmaların yok edilmesi veya etkisiz hâle getirilmesi işlemidir. Bu uygulamalarda kullanılan maddelere dezenfektan denir. Bunlara örnek olarak klor ve klor bileşikleri, brom, iyot, ozon, fenoller, boya maddeleri, sabunlar ve sentetik deterjanlar, hidrojen peroksit, potasyum permanganatlar verilebilir (Güler ve Akın, 2006).

- Kimyasal madde ilavesi: : Kimyasal maddeler (demir, kalsiyum ve alüminyum) su ortamı ya nutrientleri çöktürmek ya da biyolojik olarak daha zor kullanılabilen formlara çevirebilmek amacıyla katılmaktadır. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, ortamın pH'ında meydana getirecekleri değişiklikler ve ortamda birikecek olan iyon formlarının mevcut olmasıdır.

1.3. İleri Su Arıtma Teknolojileri

* Adsorbsiyon: Toz halindeki aktif karbon, biyolojik ve kimyasal arıtma çıkışındaki suya ilave edilmesi ve temas havuzunda çöktürülmesi işlemidir.

* İyon değiştirme: İstenmeyen anyonların ve katyonların uygun bir anyon ve katyon tipi iyon değiştirici kolonlar yoluyla tutulması işlemidir.

* Ozonlama: Ozon yaygın olarak kullanılan bir dezenfektandır. Aynı zamanda klora karşı üstünlüğü vardır. Kalıcı bir etkisi bulunmamaktadır. Sonrasında bakteriyostatik bir dezenfektan kullanılmasını gerektirmektedir.

* Ters ozmos: Çözünmüş anorganik ve organik maddeleri sudan uzaklaştırılmak

ya da geri kazanmak amacıyla yüksek basınç ile birlikte uygulanan işlemdir. Maliyeti oldukça yüksektir.

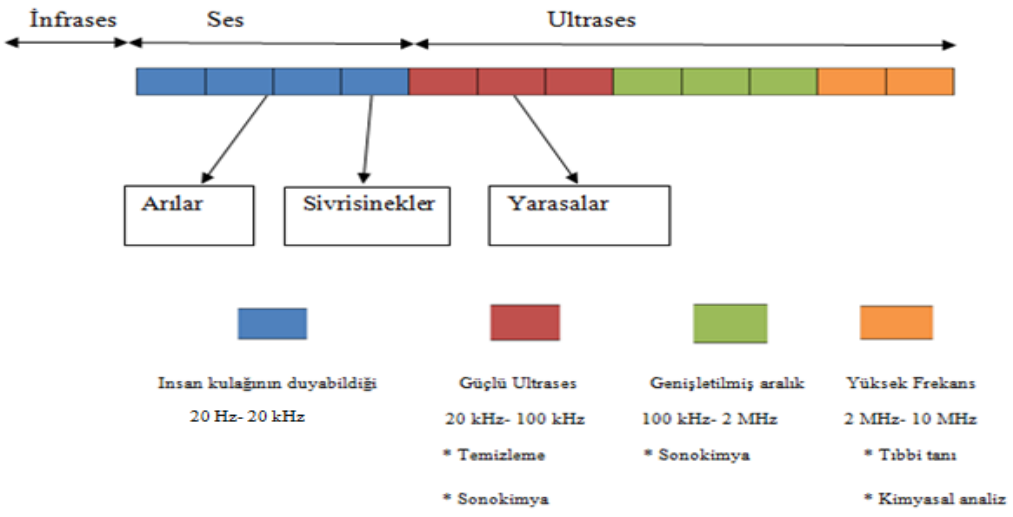
* Ultraviyole ışığı: 200-300 nm dalga boyundaki UV ışınların dezenfektan etkisinin kullanıldığı işlemdir. Kalıcı bulunmamakla birlikte maliyeti de yüksektir.

* Ultrases: Kavitasyon prensibine bağlı olan bu yöntem; ikincil bir kirliliğe neden olmaması ve nispeten daha düşük maliyetli olması sebebiyle önemlidir. Bu tez çalışmasında da ultrases kullanımı detaylı olarak çalışılmıştır.

Geleneksel kimyasal yöntemler alglerin ortadan kaldırılmasında etkilidir ancak bu yöntemler ikincil bir kirlenmeye yol açabilir (Wang ve ark., 2004). Aynı zamanda, alg patlamaları için kullanılan geleneksel fiziksel yöntemler ve biyoteknolojik yöntemler de uzun uygulama süresi, uygulama zorluğu ve yüksek maliyet gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Hu ve ark., 2006).

Sucul ortamlarda alg, bakteri gibi sayıca artması istenmeyen türlerin yok edilmesi amacıyla ultrases uygulaması, kullanılan yöntemlerden biridir. Son zamanlarda suları temizleme amacıyla kullanımı yaygınlaşan bu yöntemin sucul çevreye verdiği zarar merak konusu olmuştur. Bu tez çalışmamızda ultrasesin balıkların bazı organ ve dokuları üzerine biyokimyasal, histolojik ve davranışsal açıdan oluşturduğu etkiler ele alınmıştır.

1.4. Ses Dalgaları ve Ultrases

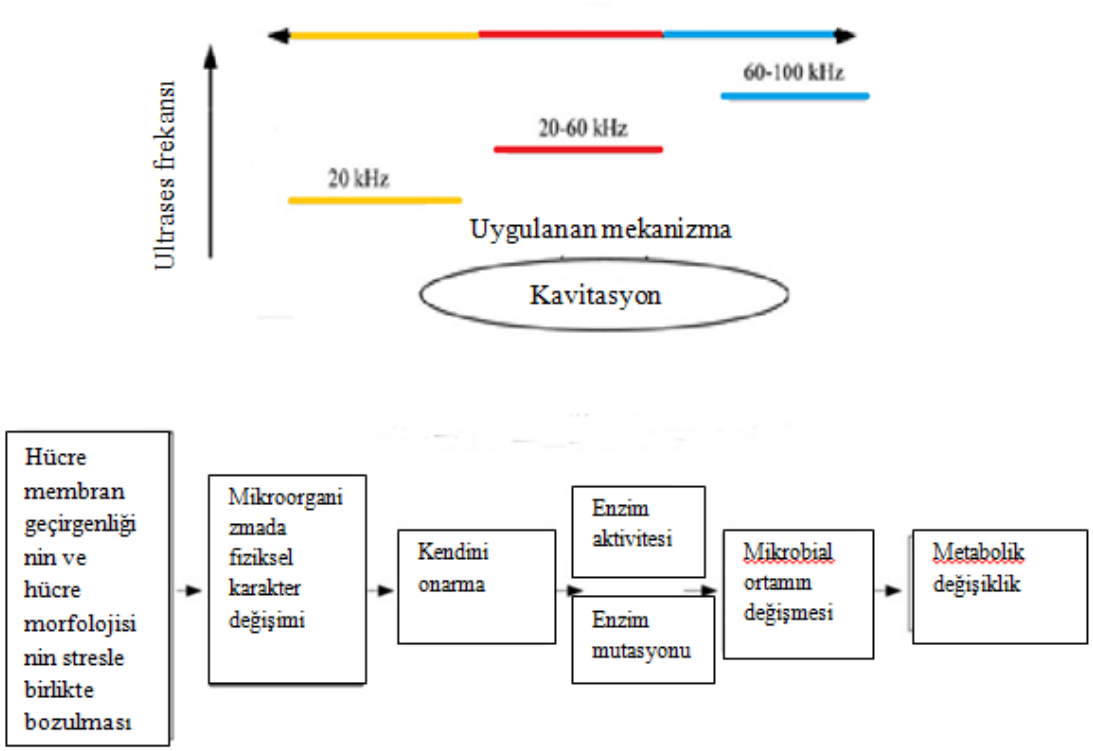


Şekil 1.3. Ses dalgalarına genel bakış (Mason ve ark., 2003).

Ses, denge durumunda bulunan bir ortamda taneciklerin mekanik titreşimleridir. Ses hakkında kullanılan terimler kısaca anlatılacak olursa:

- Ses kaynağı, ses verebilen herhangi bir sisteme;
- Ses titreşimleri, ses kaynaklarının ses vermekteyken yaptıkları hareketlere;
- Sesin frekansı da bu hareketlerde bir tam titreşim süresine ses titreşiminin periyodu ve saniyedeki devir sayısına verilen addır.

Ses bir titreşim hareketinden meydana gelir. Ses, frekans (hertz) ve yoğunluk (desibel) olarak ölçülür. Ses; infrases (0-20 Hz.), duyulabilir ses (20-20.000 Hz.), ultrases (20.000 Hz.- 1GHz.) ve hiperses (1 GHz.'den yukarı) olmak üzere dört kategoride sınıflandırılır. Ultrases, insan kulağının işitemeyeceği kadar yüksek frekanslı ses dalgalarına verilen addır. Ultrases, akustik bir dalgadır.



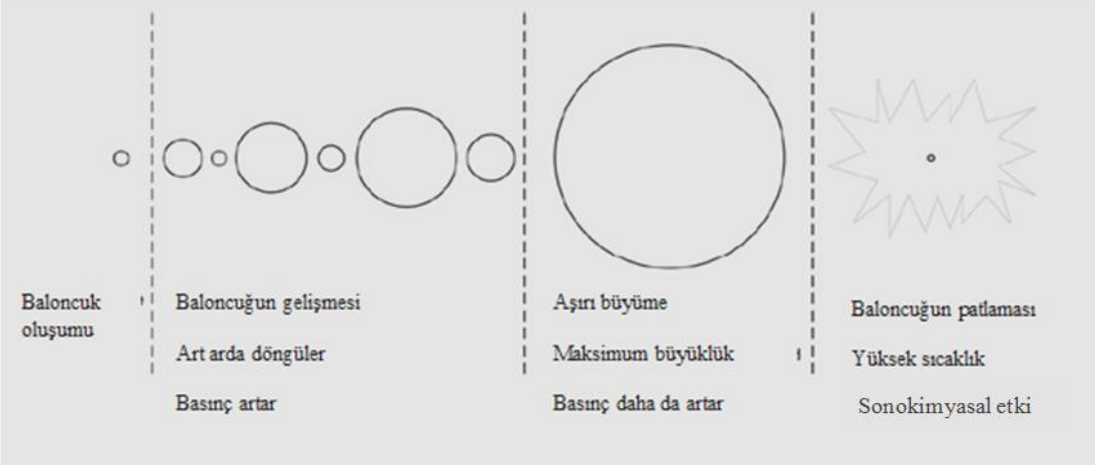
Şekil 1.4. Ultrasesin etki şekli.

Ultrases sucul kirliliği ortadan kaldırmakta kullanılan çeşitli yöntemlerden biridir (Gonzalez-Garcia ve ark., 2010; Paniwnyk ve ark., 2010). Bu sürecin büyük bir kısmı akustik kavitasyondan oluşur.

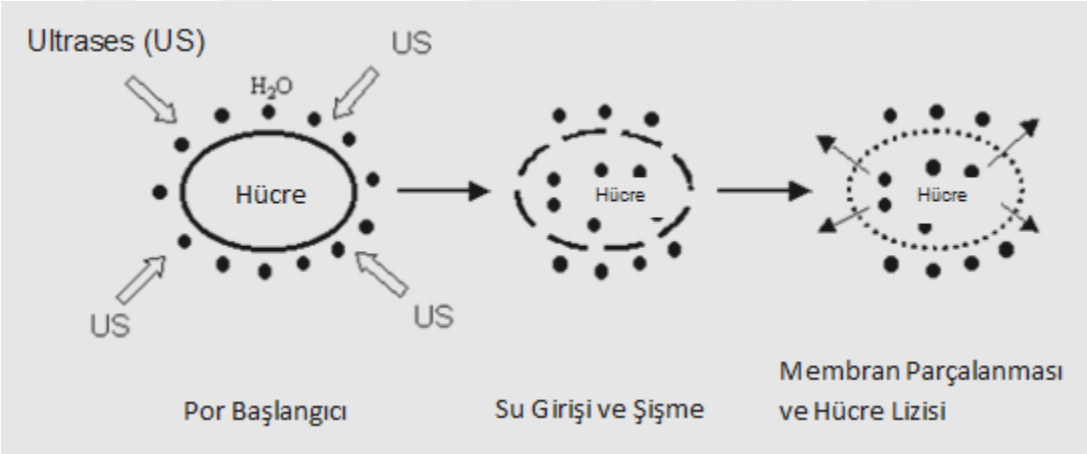
1.4.1. Kavitasyon

Kavitasyon prensibi kısaca; mikroskobik baloncukların büyümesi ile meydana gelen basınç değişikliği ve ses dalgalarının sıvı içinde yoğunluğunu azaltması şeklinde tanımlanabilir (Rivas ve ark, 2010; Pollet, 2014; Merouani ve ark., 2015a). Kavitasyon olayı iki yol izleyebilir. Birinci yolda; kavitasyon ultrasonik dalga geçidi tarafından oluşturulursa, bu akustik kavitasyon veya ultrasonikasyondur. İkinci yolda ise, sıvıdaki çeşitli basınç farklılıklarıyla oluşturuluyorsa hidrodinamik kavitasyon olarak adlandılır. Akustik kavitasyonun kimyasal etkisiyle doğrudan yüksek ısı (≈5000ºC) ve baloncukların çökmesine neden olan 500-10.000 atm'lik basınç oluşur (Suslick, 1989; Lifka ve ark., 2003; Patil ve ark., 2007). Bir hayli yüksek koşullarda gerçekleşen bu durum sonucunda, su buharı reaktif hidroksil radikalleri (·OH) ve hidrojen atomları (H·) meydana gelir (Ferkous ve ark., 2015; Merouani ve ark., 2015b). Bu radikaller su içine nüfuz eder ve çözünmüş organik bileşikleri okside ederler.

Ultrases bir sıvı çözelti içerisindeki ısının artması sayesinde küçük moleküllerin taşınmasını artırır, aksi durumda durgundur ya da yavaş hareket eder (Nyborg, 2001). Sıvıdaki ısı artışını iki mekanizmayla yapabilir. İlk mekanizma, mikroakış (mikro streaming) mekanizmasıdır. Kavitasyon, titreşimli kabarcıkları çevreleyen sıvıda dönen akımla ve yakındaki hücreler üzerinde bir bükülme ve dönme hareketi gösterip dönen akımı ayarlar. Titreşimli gaz kabarcıklarının çevresindeki hücre içi organeller de dönme kuvvetine ve stresine maruz kalırlar. Bu mikroskobik sıvı hareketine mikroakış denir. Mikroakışta düşük ve yüksek akustik basınç döngüleri oluşur çünkü titreşen baloncukların etrafında oluşan kırpma akışıyla gaz baloncukları sırasıyla genişler ve küçülür (Nyborg, 1982). Isı artışını sağlayan ikinci mekanizma ise yayılan sesin sıvının akış yönündeki ses dalgalarının hızla yayılmasını sağlayan akustik akışla ilgilidir (Starritt, 1989). Utrasesin ısı saçılmasının uygulanmasıyla, suda oluşturduğu akustik kavitasyon nedeniyle çok sayıda mekanik, akustik, kimyasal ve biyolojik değişimler meydana gelir (Laborde, 1998; Guzman ve ark., 2003; Chua ve ark., 2010; Uemura ve ark., 2015).



Şekil 1.5. Kavitasyon prensibine bakış (Purcell ve ark., 2013).



Şekil 1.6. Ultrases- uyarımlı hücre yıkımı mekanizması (Mason ve ark., 2003)

1.5. Ultrases ve Algler

Çalışmalarda alg patlamalarının kontrol altında tutulmasında ultrasesin kullanılması genel olarak siyanobakteriyel türlerden *Microcystis aeruginosa* üzerinde yoğunlaşmıştır. Ultrases ile 20 kHz-1.7 MHz arasındaki frekansta öldürme oranı genelde %90 civarında ölçülmüştür (Tang ve ark., 2003; Hao ve ark., 2004a; Hao ve ark., 2004b; Tang ve ark., 2004). Diğer siyanobakteri türlerindeki çalışmalar zincirli siyanobakteriyel türleri de içermektedir. *Spirulina (Arthrospira) platensis*, yüksek frekanslı ultrasese maruz bırakıldığında (1.7 MHz) %60 oranında biyokütlesel azalma göstermiştir (Tang ve ark., 2003). Büyüme durdurucu başka bir çalışmada frekansa göre azalma 200kHz > 1.7MHz >20kHz şeklinde olmuştur. Buna göre artan enerji biyokütle azalmasında anlamlı bir etkide bulunmamıştır. 20, 40, 60 ve 80 Watt (W)'lık

uygulamalarda biyokütle azalması sırasıyla %43, 43, 48 ve 48 olarak bulunmuştur (Hao ve ark., 2004a). Deneysel koşullar karşılaştırıldığında çalışmalar uygulama süresi, frekans, güç ve uygulama hacmi bakımından çok fazla çeşitlilik göstermektedir.

Tüm bu çalışmalara ek olarak yapılan bazı çalışmalarda ultrases uygulamasından sonra büyümenin de meydana geldiği rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2003; Inman, 2004; Luo ve ark., 2014; Li ve ark., 2015). Örneğin *Microcystis* türüyle yapılan bir araştırmada, 28 kHz'lik frekans ve 20 W'lık güçteki ultrases uygulaması süresince %67'lik bir artışı gözlenmiştir (Inman, 2004). Benzer şekilde *Spirulina platensis*'le yapılan 1.7 MHz'lik ultrasonik frekansta 11 gün boyunca 12 dakikalık durdurmalı uygulanan çalışmada artışın %60 olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde filamentli siyanobakteri olan *Spirulina maxima*'da da %5'lik bir artış söz konusu olmuştur (Al-Hamdani ve ark., 1998).

Önceki bulguları doğrulayan bir başka çalışma da filamentli *Anabaena flos-aquae* siyanobakterisindeki düşük frekanslı (20 kHz) ultrases uygulamasında hücre büyümesinde artış olduğu şeklindedir (Francko ve ark., 1990). *Chlorella* tek hücreli yeşil alg türlerinden biridir. 20 kHz frekanslı ultrases uygulamasından sonra hücre sayısında artış olduğu deneyler sonucu bulunmuştur (Zhang ve Chen, 2001). Bazı durumlarda ultrases uygulaması hiçbir etki göstermez. Örneğin bir çalışmada *Synechococcus sp.'*ye, 1.7 MHz frekansta 5 dakika boyunca ultrases uygulanmıştır ve büyüme oranı tüm süre boyunca aynı kalmıştır. Bunun nedeni *Synechococcus sp*'nin vakuolsüz bir deniz siyaobakterisi olmasıdır (Tang ve ark., 2004). Ultrasesin alg büyümesine etki mekanizması kavitasyon baloncuklarının çöküşü sırasında ortaya çıkan aşırı sıcaklık ve basınç olarak tespit edilmiştir (Suslick, 1988). Alg kontrolünün mekanizması gaz vakuollerinin parçalanması esasına dayanır (Jong Lee ve ark., 2000; Lee ve ark., 2001). Fotosistem II'nin yıkılmasıyla fotosentez durdurulur ve bunun sonucunda gaz vakuolleri parçalanır. Bu yüzden alg pigmentleri yüksek yoğunluktaki ultrasonik radyasyon sonucu gaz vakuollerine yakın olmaya başlar (Lee ve ark., 2001; Mason ve ark., 2003) ve serbest radikallerin üretimi akustik kavitasyonun ikincil etkisi olarak ortaya çıkar (Mason ve ark., 2003). Ultrasesin uygulanabilmesi, türe özgü gaz vakuolleri gibi karakteristik bir özellik sayesinde gerçekleşir.

Yakın zamanlarda yapılan iki araştırmada, ticari olarak ulaşılabilecek 20-40 kHz

frekans aralığında ve 20-40 W'lık güçler çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonunda rezervuarlardaki alg patlamalarının kontrolü, sahada ve pilot alanlarda test edilmiş ve kısmen başarıya ulaşılmıştır (Inman, 2004; Warnock, 2005). Karışık yeşil alg türleri, diatomlar ve siyanobakterilerin ultrasesle muamele edilen bir çalışmada 700 litrelik havuzda, 28 kHz frekans ve 20 W güçte ultrases uygulanmıştır. Çalışmada havuz kenarına eklenen kendiliğinden yüzen transdüserler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda diatomlar %60 ve yeşil algler %41 oranında azalmıştır. Ancak tek hücreli bir siyanobakteri türü olan *Microcystis sp.*'de %67'lik bir artış gözlenmiştir (Inman, 2004). Aynı pilot deneme aralığının ve aynı türlerin kullanıldığı bir başka çalışmada ise hacim 700 litreden 250 litreye azaltılmıştır. Daha küçük bir havuz kullanılması sonucunda biyokütle, filamentli siyanobakteri türü olan *Aphanizomenon sp.*'da %49 ve koloni oluşturan oval yeşil alg *Scenedesmus sp.*'da %60 azalma olarak gözlenmiştir (Warnock, 2005). Alan ölçekli bir çalışma yüzer transdüserle 28 kHz frekans ve 40 W güç, 5000 litrelik hacimdeki bir lagüne uygulanmıştır. İngiltere'deki bu lagünde klorofil a miktarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Inman, 2004). Diatom ve yeşil alglerle kıyaslandığında siyanobakterilerin daha önce parçalanması çeşitli seviyelerdeki hassasiyetin tür tipleriyle olan bağlantısını düşündürmüştür. Örneğin, Kore'de su altında, 22 kHz frekans ve 630 W güç uygulanan bir çalışmada sadece %13 siyanobakteri türü canlı bulunmuştur. Kontrol ortamının oluşturulduğu çevrelenmiş alanında ise bu durum %47'dir (Ahn ve ark., 2003). Japonların Senba gölü'nde yaptığı bir araştırmada üç yıl süreyle ultrases uygulaması kullanılmıştır. Bu göl, kent bölgesinde bulunmaktadır ve 365.000 litre hacme sahiptir. Ultrases transdüserleri 100 W güç ve 200 kHz frekansa sahiptir. İlk iki yıl olumlu sonuçlar gözlenmiştir ancak akış oranı son yıl göl açıldığında azalmıştır. Alg patlamaları tekrarlamış ve ultrasesin uzun süreli etkisinin hassasiyeti üzerinde endişe uyandırmıştır (Nakano ve ark., 2001; Lee ve ark., 2002).

Ultrases çalışmaları iki değişken üzerinde şekillenmektedir. Bunlar; frekans ve güç'tür. Güç seviyesi 1 W'ın altındayken *Spirulina platensis* üzerinde etkili olmuştur. Açıklamak gerekirse 1.7 MHz'lik yüksek frekans kullanılmış ve %50-60 arasında *Spirulina sp.*'nın ve %40 oranında *Microcystis sp.*'in ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir (Tang ve ark., 2003; 2004). Gücün etkilemesine yönelik 14-600 W arasında artan hücre yok edilmesi oranı %4-65 arasında değişmektedir. Yüksek güç deneyi boyunca frekans

düşük olarak kalmıştır.

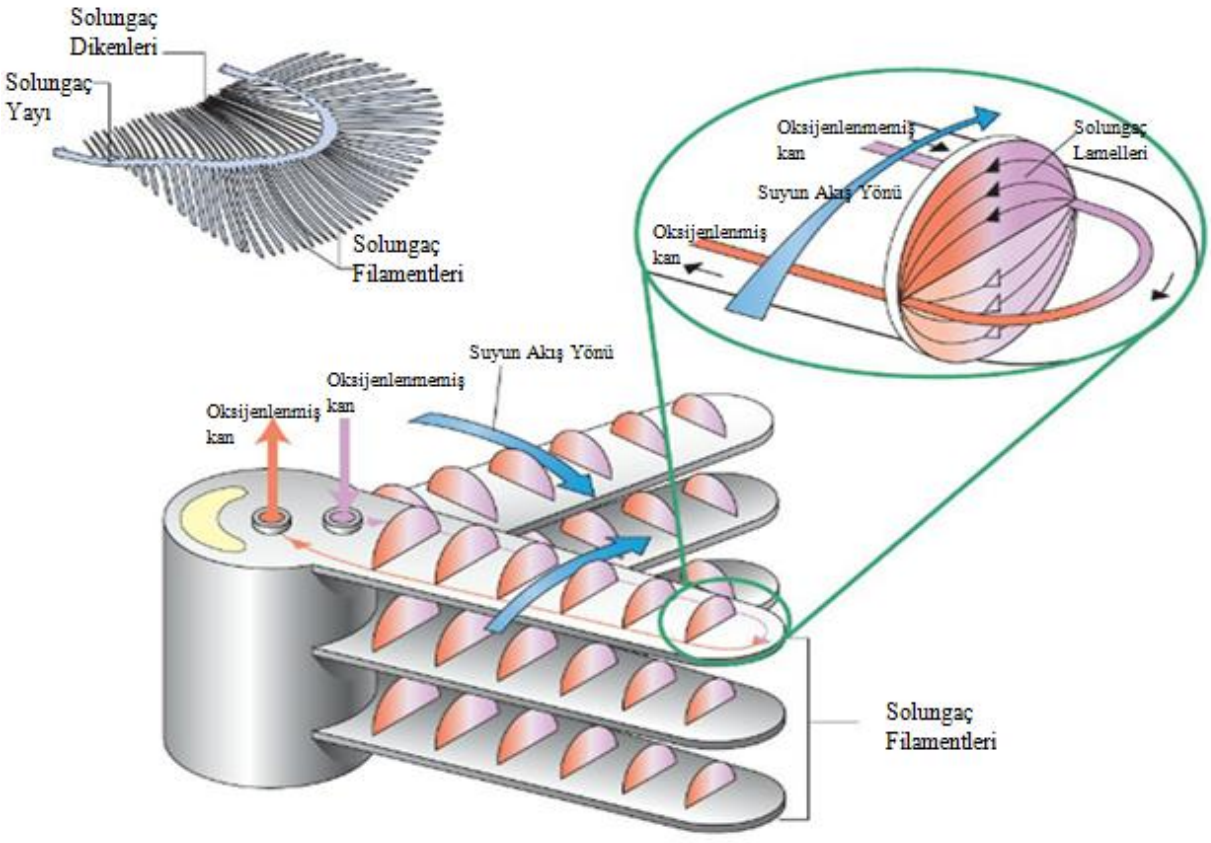
1.7 MHz frekans ve 14 W güç kullanılan bir ultrases çalışmasında %38-50 *Spirulina platensis* ortadan kaldırılmıştır. *Microcystis* türü yüksek güç, düşük frekans deneylerinde kullanılmış ve öldürülmesi zor bir tür olduğu kanıtlanmıştır. En yüksek ortadan kaldırma %65 olarak belirlenmiştir. *Microcystis* populasyonu en az %60 oranında ortadan kaldırılmalıdır ki aksi takdirde tür rejenerasyon özelliği kazanır. Gaz vakuolleri kısa sürede tekrardan oluşabilir ve büyümeleri devam eder (Jong Lee ve ark., 2000). Bu da birçok araştırmanın başarısız olarak adlandırılmasının sebebidir. *Microcystis*'in direnci içerdiği dar gaz vakuolleri nedeniyledir. Yüksek kritik basınç oranlarında 1 MPa'nın üstünde filamentli siyanobakterilerden daha yüksek direnç oluşturur (Walsby, 1992). Bu özellik *Microcystis sp.*'in gaz vakuollerinde daha zor patlamaya neden olur. Düşük frekanslı ultrases boyunca direnç gösterebilir (Zhang ve ark., 2006). Ultrases tek tip bakteriyal kültürlerde %100 öldürmeyi başarmıştır ve bir çalışmada siyanbakteriyal *Microcystis sp.*'i %90-100 arasında ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Ancak diğer çalışmalarda aynı seviyede *Microcystis sp.*'nin ortadan kaldırması gözlenmemiştir. Diğer çalışmalarda en başarılı olarak yaklaşık %60 öldürme oranı gözlenmiştir. Deney ölçekleri neredeyse tamamen laboratuvar ortamında yoğunlaşmıştır. Dolayısıyla olumsuz yönde etkileyen bu sonuçlar yeniden daha geniş ölçeklerde finansal ve ekipman düzeneğiyle gerçekleştirilmektedir. Ultrases ve alg üzerinde yapılan literatür çalışmalarında herhangi bir spesifik alg takımına bağlı hücrelerin ortadan kaldırılması için optimal frekansa yönelme açıkça gözlenmemiştir. Fakat güç kullanımına ilişkin önceki ultrases çalışmalarında, daha yüksek güçteki uygulamalarda alg türlerini daha fazla yok etme gözlenmiştir.

Bu tip arıtım amaçlı deneylere ek olarak biz çalışmamızda; ultrases uygulaması sırasında akuatik ortamda bulunan balıklarda meydana gelebilecek doku hasarı kaynaklı oksidatif stres, doku hasarı ve canlının davranış değişikliklerini incelemek istedik. Bu araştırma, sucul omurgalı türler açısından yapılan ilk çalışma olma özelliğindedir.

1.6. Teleost Balık Dokuları ve *Carassius auratus*'un Genel Özellikleri

1.6.1. Solungacın yapı ve işlevleri

Yutak bölgesinin her iki yanında uzanan yarıkların içindeki çift sıralı lameller şeklinde bulunan solungaçlar teleost balıklarda 4 solungaç kemerine sahiptir (Çelikkale, 1986). Solungaç kemeri kıkırdak dokuyla desteklenmektedir (Ekingen, 2001). Su ve kan arasındaki gaz değişimi temel olarak burada gerçekleşmektedir. Bu görevine ek olarak solungaçlarda elektrolitlerin aktif taşınması, osmoregülasyon, asit- baz dengesi ve azot atılması gibi olaylar da gerçekleşmektedir.



Şekil 1.7. Solungaç yapısı. (http://mstimm-asbiology.blogspot.com.tr/2013/02/structure-of-fish-gills)

Balıklarda solunum suyu genellikle ağız yoluyla girip solungaç yarıklarından çıkmaktadır. Sürekli olarak ağız boşluğu ile solungaç boşlukları arasında bir basınç farkı

mevcuttur. Alınan su solungaçların üzerinden tek yönlü akar. Solunumda kullanılacak olan oksijen de suda çözünmüş halde bulunur.

Balıklarda protein metabolizmasının son ürünü amonyak ve üredir. Amonyak karaciğerde parçalanır ve kan yoluyla solungaçlara taşınır. Büyük bir kısmı solungaçlardan atılır. Bütün bunlara ek olarak suyun vücuda alınması deniz balıkları ve tatlı su balıklarında birbirinden farklıdır. Tatlı su balıkları ihtiyaçları olan suyu ağız ile değil solungaçlar yoluyla alırlar. Deniz balıklarında ise bu su ağız yoluyla alınır. Tatlı su balıklarında kandaki iyon miktarı sudakine göre daha fazladır. Bu nedenle, su vücuda solungaçlardan geçebilme özelliğindedir ve ağızla su almaya ihtiyaç kalmamaktadır. Deniz balıklarındaysa bu durum tam tersidir, yani balıkların kanında bulunan iyon miktarı suya göre daha azdır. Böylece ağızdan da su alma ihtiyacı doğmuştur.

Solungaçlar bu oksijen alışı sırasında çevresel faktörlerden de etkilenmektedirler. Özellikle toksik maddeler ve fiziksel hasarlar bunların başında gelmektedir. Tüm stres yapıcılara karşı benzer savunma bariyeri oluşturmaktadır (Wood, 2001).

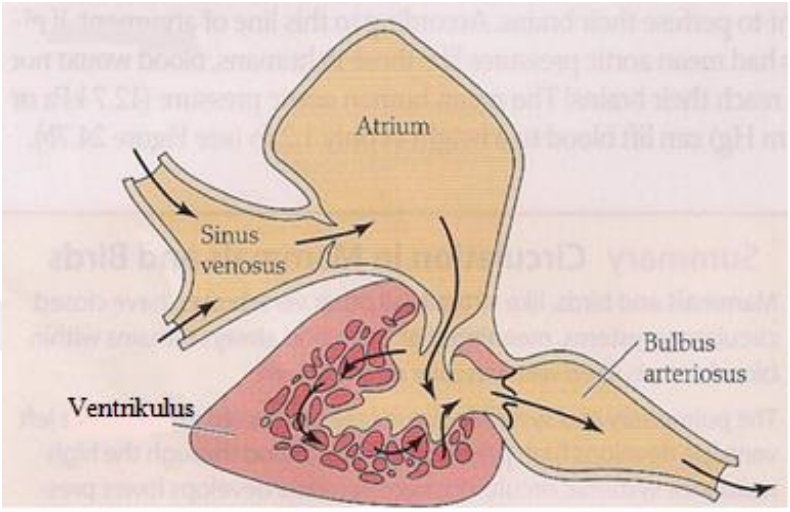
1.6.2. Karaciğerin yapı ve işlevleri

En önemli zehirsizleştirme merkezi olan karaciğer stres durumunda değişim gösteren önemli belirleyicilerdir. Çevresel değişimlere karşı hassas olduklarında dolayı bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılırlar (Hilton ve ark., 2001). Yapım ve yıkım işlemlerinin birlikte yapıldığı bu önemli organın safra sentezlenmesi; protein, karbohidrat ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi, kan hücrelerinin oluşturulması, azotlu atıkların atılması gibi görevleri de vardır (Hinton ve Couch, 1984; Bruslé ve Anadon, 1996). Safra yapım süreci şu şekildedir; safra hepatik hücrelerle intraselüler safra kanaliküllerine daha sonra da ekstraselüler safra kanaliküllerine taşınır. Safra kanalikülleri safra kanalını oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu kanal hepatik kanala bağlanır, bu sayede karaciğer duedonuma da bağlanmış olur. Karaciğer, hepatositler ve bağ dokusundan meydana gelmektedir (Van der Oost ve ark., 2003).

1.6.3. Kalbin yapı ve işlevleri

Solungaçların hemen gerisinde bulunan kalplerinde her zaman vena kanı bulunur. Tipik olarak bir balık kalbi dört ana kısımdan oluşur. Kanın akış yönüne göre bu

bölümler sırasıyla; *sinüs venosus, atrium, ventrikulus ve bulbus arteriosus*'tur. Ventrikulus kalbin en kalın çeperli bölgesidir. Kanın ventriküllere geri akışı *bulbus arteriyosus'ta* yer alan kapaklar tarafından engellenmektedir (Olson ve Farrell, 2006). Bu bölgede bulunan elastiki duvar solungaçlara giden kana büyük bir basınç yaratır (Demir, 1996; Ekingen, 2001).

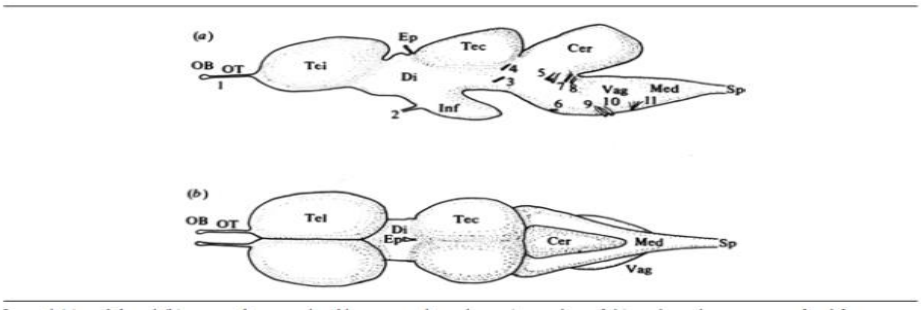


Şekil1.8. Teleost kalp yapısı. (http://www.bio.miami.edu)

1.6.4. Beynin Yapı ve İşlevleri

Omuriliğin genişlemiş anteriyor ucu olan beyin nörokraniyum boşluğunda bulunup kemik ve kıkırdak yapılarla korunmaktadır. Balık türleri arasında beyin büyüklükleri farklılık göstermektedir. Temel olarak üç bölümden oluşmaktadır. Embriyonik gelişmenin erken evrelerinden başlayarak önden arkaya doğru prozensefalon, mezensefalon ve rombensefalon olarak ayrılmıştır. Daha sonra bu bölümler farklılaşmıştır. Prozensefalonun ön bölgesi telensefalonu, arka bölgesi diyensefalonu; rombensefalonun ön bölgesi metensefalonu, arka bölgesi ise miyelensefalon ve medulla oblongatayı meydana getirmektedir. Telensefalon; koku impulslarını alma, değerlendirme, öğrenme ve üremeyle ilgili bölümlerin olduğu kısımdır. Diyensefalon; talamus, hipotalamus gibi beyin bölgelerinin olduğu kısımdır. Mezensefalon; görme merkezinin olduğu bölgedir, oldukça gelişmiştir. Metensefalon; serebellumun (beyincik) geliştiği kısımdır. Serebellumun işlevi; hareket, kas tonusu, duruş – denge arasındaki koordinasyonun sağlanmasıdır. Miyelensefalon; Beyni saran ve kan

damarlarını içeren kısımdır. Medulla oblongata; beyni ön bölgelerindeki merkezlerle omurilik arasında bilgi aktarımını sağlar. Bu bilgiler arasında solunum, renklenme, osmoregülasyon ve yüzgeç kontrolü vardır (Ekingen, 2001).



Şekil 1.9. Teleost balıklarda beyin yapısı; (a) lateralden, (b) dorsalden bakış (Laming, 1981'den uyarlanmıştır.)

1.6.4. *Carassius auratus*'un genel özellikleri

Carassius auratus (Linnaeus, 1758) türü balıklar beyazdan kırmızıya kadar değişen vücut renkleri ile dikkat çeken dünya çapında yaygın olan bir balık türüdür (Alpbaz, 1993). Genel olarak 5-30 derece arasında ve hafif asidik sularda yaşasalar da soğuk suları tolere edebilen yapıya sahiptirler. Hafif şiş bir vücut yapısına sahiptirler. Cinsiyet ayrımlarını yapabilmek için üreme dönemlerini beklemek gerekmektedir.

1.7. Oksidatif Stres

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikal ve reaktif oksijen türleri (ROT) gibi çeşitli radikallerin oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Abdollahi ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2005; Kaymak ve ark., 2014). Burada oksidanlar lehine bir kayma söz konusudur. Serbest radikaller, besinlerin oksijenli ortamda enerjiye dönüştürülmesi sırasında oluşan, bir veya daha çok paylaşılmamış elektron içermekte olan reaktif moleküllerdir ve bu paylaşılmamış elektronlar zayıf bir elektriksel alana sahip olmalarına neden olur.

Moleküler oksijen suya kadar indirgenirken ara basamaklarda reaktif moleküller oluşur. Bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleridir (Lledias ve ark., 1998; Piner, 2009). Elektron transferinin basamakları çizelgede gösterilmiştir.

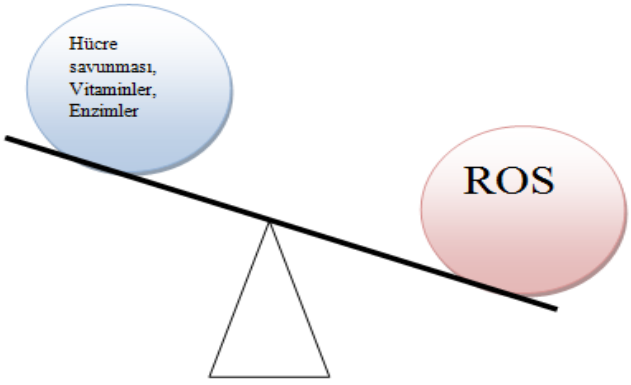
Tablo 1.2. Elektron transferi (Fridovic, 2001; Nordberg ve Arner 2001).

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$	**Hidroperoksil radikali**
$HO_2^{\bullet} \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet}$	**Süperoksit radikali**
$O_2^{\bullet} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	**Hidrojen peroksit**
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + {}^{\bullet}OH$	**Hidroksil radikali**
${}^{\bullet}OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

Tablo 1.3. Oksijenden oluşan başlıca reaktif türler (Stahl ve Sies, 2002; Yeh ve ark., 2005)

TÜR	**ADI**
$^1O_2$	Singlet Oksijen
$O_2^{\cdot}$	Süperoksit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$OH^{\cdot -}$	Hidroksil radikali
$ROO^{\cdot}$	Peroksi radikali
ROOH	Hidroperoksit
$RO^{\cdot}$	Alkoksil radikali
$ROOR^{\cdot}$	Endoperoksit
$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksi radikali

Serbest radikal oluşumu lipit peroksidasyonuna ve membran hasarına neden olur. Bununla birlikte serbest radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar enzim hasarına, bazmodifikasyonlarına veya iplik kırıklarına da neden olabilir. Bu reaksiyonların sonucunda mutajenite ve karsinojenite meydana gelebilir (Livingstone, 1991).



Şekil 1.10. Oksidatif stres oluşum şeması.

1.7.1. Antioksidan savunma sistemi

Serbest radikallerinin oluşumunu ve meydana getirdiği hasarı önlemek için geliştirilen savunma mekanizmaları "antioksidan savunma sistemleri" olarak adlandırılır. Kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engeller, serbest radikalleri etkisiz hale getirir veya oksidatif stresin sebep olduğu doku hasarlarını onarırlar (Willcox, 2004; Çaylak, 2006; Halliwell ve Gutteridge 2007; Akbulut ve ark., 2014). Antioksidan enzimler, oksidatif stres tarafından indüklenen anahtar bileşenlerdir (Oruç ve ark., 2004). Bu nedenle, antioksidan enzimler hücre homeostazisinin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptirler. Antioksidanlar serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlar ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek bu radikallerin oluşturacakları hasarı engellerler. En önemli antioksidan enzimlere örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) verilebilir.

1.7.2. Antioksidan etki tipleri

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya reaktif olmayan yeni bir moleküle çevirme işlemidir.
2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip aktivitelerini azaltan veya inaktif forma dönüştüren etkiye bastırıcı etki denir.
3. Onarıcı etki: DNA'daki hasarların tamir edilmesi için bu etki geçerlidir.
4. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

1.7.2.1. Total protein

Proteinlerin sülfidril grupları oksidatif strese oldukça duyarlıdır (Sen ve Packer, 2000). Lipitlerden daha az duyarlıdır ve oksidatif stresten etkilenmeleri amino asit dizilerine bağlı olarak gerçekleşir. Doymamış bağ ve sülfidrilce zengin proteinler daha çok etkilenir (Kelly ve ark., 1998). Proteinler radikallerle reaksiyona girdiklerinde sülfür radikalleri ve karbon merkezleri radikalleri oluştururlar. Karbon merkezli radikalelerden olan karboniller, oksidatif hasarın ölçülmesinde kullanılmaktadır. Serbest

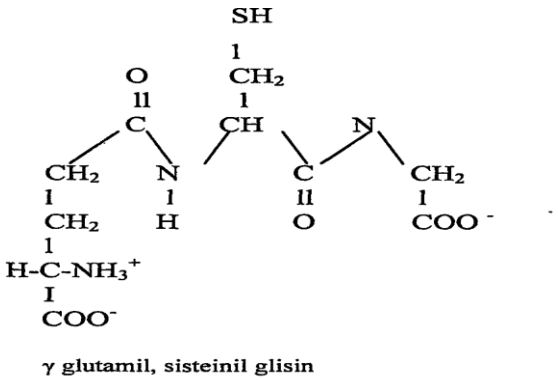
radikaller proteinler üzerinde çeşitli hasarlar meydana getirebilirler (Çakatay, 2004). Bu hasarlara parçalanma, protein agregasyonu ve çapraz bağlanmalar örnek olarak verilebilir. Bunlara ek olarak da enzim yapısında bozukluklar oluşturabilir.

1.7.2.2. Lipit peroksidasyonu (LPO)

Hücre membranında bulunan çeşitli yapılardaki yağların (fosfolipit, gliserit, glikolipit vb.) yapılarında bulunan çoklu yağ asitlerinin, serbest radikaller tarafından yıkılması reaksiyonu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır (Kaymak, 2011). Lipit peroksitlerin yıkılmasıyla birlikte biyolojik olarak aktif olan aldehitler metabolize edilir (Özden, 2006). Üç ya da daha çok çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyou sırasında, tiyobarbitürik asidin de kullanılmasıyla bir ara ürün olan malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA spesifik bir belirteç olmamasına rağmen, peroksidasyon ölçümlerinde sıklıkla kullanılır (Yemişen, 2008). Gerçekleşen bu peroksidasyon olayı biyolojik zarlarda önemli hasarlar meydana getirir. MDA sadece lipit peroksidasyonu ile birlikte üretilir. Peroksidasyonun artmasıyla birlikte GSH'ın konjuge bileşiklerinin oluşması ve glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin engellenmesi meydana gelir. Bunun sonucunda dokulardaki GSH düzeyinde azalma olur. Lipit peroksidasyonuna karşı geliştirilen savunma/korunma mekanizmasında glutatyon ve katalaz önemli rol oynamaktadır (Ören, 2009).

1.7.2.3. Glutatyon

Hücrelerde suda çözünebilir formdadır (Travacio ve ark., 2000). Yapısında γ-glutamil, sisteinil ve glisin bulunmaktadır.



Şekil 1.11. Glutatyonun yapısı.

Tüm hücrelerde milimolar (mM) düzeyinde bulunur, ancak hücre içi derişimi hücreden hücreye değişmektedir (Sen, 1997). Glutatyon önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidandır. Hücrenin oksido-redüksiyon dengesinin korunması, hücrelerin karşılaştığı endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların etkilerinin giderilmesi ve toksik etkilere karşı koruma görevini yerine getirmektedir. Yapısında bulunan serbest sülfidril grubu (-SH) ile serbest radikallerle etkileşime girip, hücreyi oluşturacakları hasarlara karşı korumaktadır (Meister ve Anderson, 1983). Bu reaksiyonların sonucunda oluşan okside glutatyon (GSSG)'un detoksifikasyon görevini sürdürebilmesi için indirgenmiş glutatyon formuna dönmesi gerekmektedir. NADPH'ın kullanıldığı bir reaksiyonla bu dönüşüm gerçekleştirilir (Akkış, 1995). Dokuda GSH azalması durumunda glikolitik bir enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin azaldığı ve bununla birlikte dokunun ATP içeriğinin de azaldığı görülmüştür. Bu bilgiler ışığında GSH'ın hücre içi enerji durumunda etkili olduğu savunulmuştur (Pullar ve ark., 1999). Aynı zamanda düşük glutatyon metabolizmada olumsuzluklar oluşturabilir.

Glutatyonun görevleri:

- Hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer proteinlerin tiol gruplarını indirgenmiş halde tutmak ve bunun sonucunda oluşacak hasarları önlemek,
- Hücre içerisinde sistein depolamak,
- Ağır metallerin ve elektrofilik karbon atomlarının vücuttan atılmasına yardımcı olmak,
- Serbest radikallerin ve reaktif türlerin inaktivasyonunu sağlamak,
- DNA ve protein sentezine katkıda bulunmak,
- Bazı proteinlerin disülfit bağlarını koparark konformasyonlarını değiştirmek,
- Enzim reaksiyonlarında görev almak.

Hücrelerde bulunan toplam glutatyon miktarının %5'i okside glutatyon (GSSG) şeklide bulunurken, %95'lik kısmı GSH şeklinde bulunmaktadır.

1.7.2.4. Katalaz (CAT)

CAT, H_2O_2'nin hiçbir konsantrasyonu ile doygunluğa ulaştırılamayan tek enzimdir (Lledias ve ark.,1998). Metabolizma tarafından oluşturulan H_2O_2'nin büyük bir kısmı, CAT tarafından H_2O ve O_2'ye dönüştürülür (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Bu reaksiyon iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, kompleks-I olarak ifade edilen ara ürün oluşur. Bu ara ürün, hidrojen peroksidin enzime bağlanması sonucu oluşur. Kompleks-I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyonu, su ve moleküler oksijen oluşumuyla sonuçlanır.

$$CAT + H_2O_2 \rightarrow CAT- H_2O_2 \text{ (Kompleks I)}$$

$$CAT- H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow CAT + 2\,H_2O + O_2 \text{ (Katalaz aktivitesi)}$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

Ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar.

Hücrelerde, H_2O_2 üretiminden sorumlu oksidazların birçoğu peroksizomlara yerleşmiştir. Bu sebeple CAT'ın büyük bir kısmı sitosol ve mitokondriye oranla peroksizomlarda bulunur (Kelly ve ark., 1998). Özellikle eritrositlerde ve karaciğer dokusunda bol bulunur.

1.7.2.5. Asetilkolinesteraz (AChE)

Asetilkolin, sinir ucu-organ ve sinir hücresi-sinir hücresi arasında impuls taşımasının yanı sıra, sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşturulmasında görev alan son derece önemli bir esterdir (Wilson ve Nachmansohhn, 1954; Kirby, 2000). Özgül olan ve sadece asetilkolini hidroliz eden ester, dış çevre ile lifin iç kısmı arasında oluşan konsantrasyon farklılığıyla sodyum iyon geçisini ve elektriksel akımın meydana gelmesini sağlar. Asetilkolin, asetikolinesteraz tarafından hidroliz edilir ve inaktif forma dönüştürülür. Hidrolizin sonucunda kolin ve asetik asit

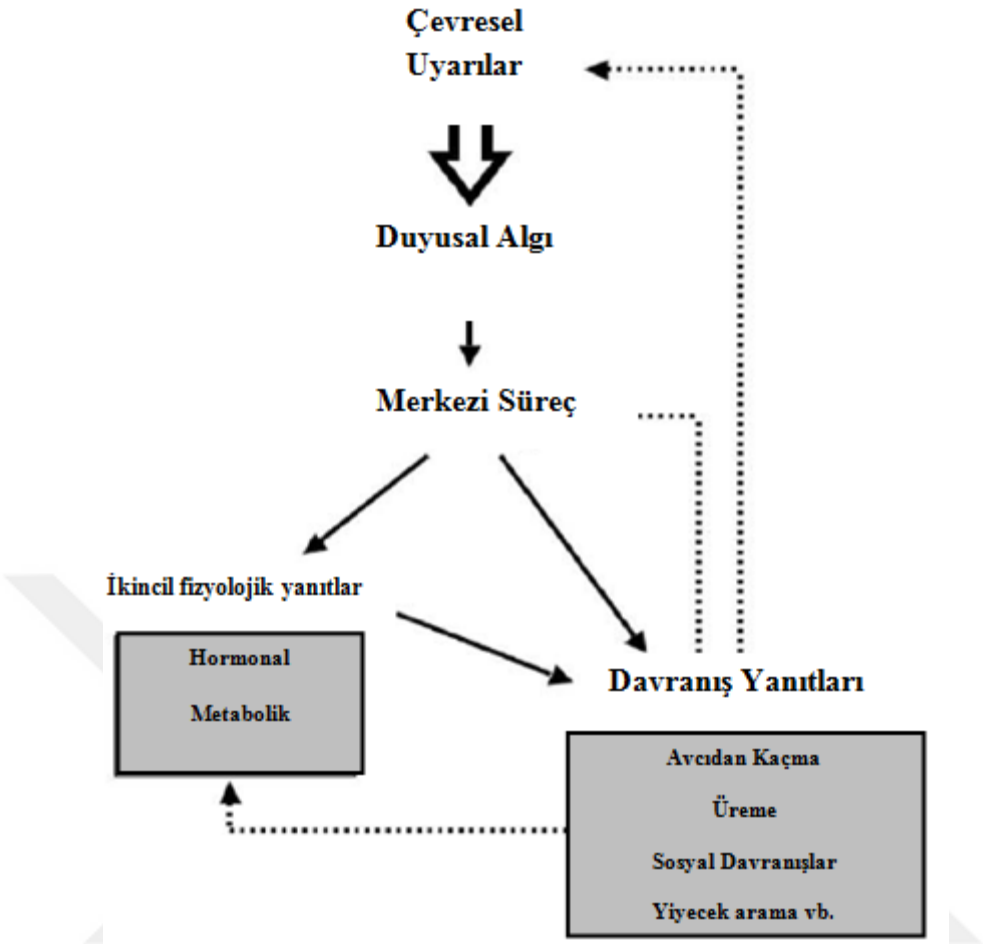
adını verdiğimiz iki inaktif kısım meydana gelir. Bir süre sonra inaktif formlar tekrardan aktif hale dönüşür ve impuls iletiminde görev alır. Formlar arası dönüşüm aşağıdaki şekilde gerçekleşir:



AChE, toksisite mekanizmasında ilk olarak inhibisyona uğrayarak indüklenir. Bu inhibisyon nörotrasmitterin doğal katabolizmasının engellenmesiyle oluşur (Klaassen, 2001; Barr ve Needham, 2002). Bu engellenmeyle birlikte sinapslarda aşırı asetilkolin birikmesi meydana gelir. Bu birikimin sonucunda nikotinik ve muskarinik reseptörlerin aktivasyonları artar, kolinerjik sistem sürekli uyarılır (Hazarika ve ark., 2003). AChE enziminin inhibisyonunun ölçülmesi, oksidatif stresten etkilenmenin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (Adams, 2002).

1.8. Davranış

Davranış organizmaların dış dünyaya karşı verdikleri fiziksel tepkiler olarak bilinir. Bu fiziksel tepkiler sinir sistemi ve endokrin sistemle kontrol edilir. Eğer stres yapıcılar su kütlesini etkilerse; balıklarda havalandırma, beslenme, büyüme, üreme, mukus salgılama ve yaşama oranları kötü anlamda etkilenir. Çünkü balıklar çevresel uyaranlara karşı oldukça duyarlıdır (Kane ve ark., 2005). Aynı zamanda fizyolojik hasarlar balıklarda davranış modellemesinde kullanılır, çünkü ekolojik stres oluşturucuların etkisi kolayca gözlenebilir ve kontrol altına alınabilir. Bu nedenle, uygun davranış testleri için farklı stres yapıcılar kullanılır, böylece sucul sistemle doğrudan ilişki kurulur. Scott ve Sloman fizyolojik ve çevresel faktörlerin balık davranışı üzerine olan etkisini göstermişlerdir (Scott ve Sloman, 2004).



Şekil 1.12. Davranışın oluşması.

Sucul ekosistemi gözlemleme ve kontrol altında tutmak önemlidir çünkü balıklar insanlar için önemli kaliteli protein ve yağ kaynağıdır. Örneğin, daha az lokomotor aktivite, denge kaybı, düzensiz yüzme, ters dönmüş abdomen, havadan solunum, zıplama gibi davranış bozuklukları stres olduğuna dair ipuçları yaratabilir. Aynı zamanda tüketilen balık hakkında sağlıklı olup olmadığını gösterir. Çünkü insan vücuduna yüksek miktarda toksik madde ilavesi besin zincirinin son halkalarından olan insanda birikir. Kirleticilerin etkisinde davranış anormallikleri ve tüketilen oksijen oranları çeşitli balık türlerinde rapor edilmiştir.

Balıklar çeşitli stres oluşturucular açısından davranışsal belirteçlerdir. Bunun sebebi sürekli ve doğrudan sucul çevreyle bağlantılı olmalarıdır. Davranış; fizyoloji ve inorganik çevre arasında doğrudan bir bağ kurmaktadır (Little ve Brewer, 2001). Davranışsal hareketler ölçülebilir hareketler dizisidir. Merkezi ve periferal sinir sistemi

tarafında yönetilir. Birikimli genetik belirteçler, biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerle yaşam içi gerekli olan beslenme üreme ve avcıdan kaçınma gibi davranışlar bulunmaktadır. Değişen çevrede hayatta kalabilmek adına en iyi yöntem, iç ve dış uyaranlara karşı düzenlenen çevreye adapte olmayı sağlayan davranıştır. Seçimli evrimsel süreçler morfolojik ve fizyolojik adaptasyonlarla uyumlu bir şekilde davranış kalıplarını muhafaza etmiştir (Little ve Brewer, 2001). Çünkü davranış gelişigüzel bir süreç değildir, bundan ziyade yüksek yapılı, tahmin edilebilir, bireysel hayatta kalmayı sağlayan hareketler dizisidir. Balıklar sudaki stres oluşturucuları aktif ya da pasif süreçlerle kavrayabilir. Sucul çevredeki subletal seviyelerdeki stresörlerin organizmalara etkisi ölümden çok yapısal ve fonksiyonel değişikliklerdir (Sancho ve ark., 2003). Davranışsal modifikasyonlar yaşama etki eden birçok çevresel stres ve etki adına kullanılabilecek en hassas belirteçlerden biridir (Byrne ve O'Halloran, 2001). Balık davranışlarındaki değişiklikler, özellikle göç etmeyen türlerde, çevresel değerlendirmeler için önemli bilgiler sağlar. Bu çalışmada ultrasesin balık davranışlarında neden olduğu bazı önemli değişiklikleri (hiperaktif hareket, yavaşlamış hareket, vertikal pozisyon ve denge kaybı) gözledik ve değerlendirdik.

Bu çalışmanın amacı; sucul kirliliğin ortadan kaldırılması sırasında, ikincil bir kirliliğe sebep olmayan bir temizleyicinin kullanılması durumunda ortamda yaşayan canlı türlerinin nasıl etkilendiğinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda temizleyici olarak ultrases, kirlilik belirteci olarak *Chlorella variabilis* ve ortamda yaşayan canlı grubunu temsilen de *Carassius auratus* seçilmiştir. Ultrases uygulaması iki farklı cihazla (bath tipi sonikatör: 28 kHz, 800 W ve 3.10^{-4}- $7.\ 10^{-4}$ özgül enerji aralığında; horn tipi sonikatör: 30 kHz, 100 W $8.\ 10^{-2}$- $2.\ 10^{-1}$ özgül enerji aralığında), 7 gün boyunca farklı sürelerde (bath tipi sonikatör hergün 10sn., horn tipi sonikatör hergün 1saat) devam etmiştir. Kirlilik belirtecinin ortadan kaldırılmasını belirlemek amacıyla mikroskobik gözlemlere, balıkların dokularında meydana gelen hasarların belirlenmesinde ise biyokimyasal ve histolojik yöntemlere, aynı zamanda balıkların ortamda yaptıkları davranış değişikliklerine yer verilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Absolut Alkol

Amonyum Molibdat Tetrahidrat ($(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) MERCK

Asetil Kolin İyodür MERCK

Bakır (II) Sulfat Pentahidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) MERCK

Borik Asit (H_3BO_3) MERCK

Bradford Reaktifi SIGMA

Çinko Sulfat Heptahidrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) MERCK

DTNB (5,51-Dithio-bis(2-nitrobenzoic asid) ALDRICH

E.D.T.A. Disodyum % 35 MULTICELL

Ferrik Amonyum Sitrat MERCK

Glasial Asetik Asit MERCK

Hidrojen Peroksit % 35 (H_2O_2) MERCK

Hidroklorik Asit %37 (HCl) MERCK

Kalsiyum Klorid ($CaCl_2$) MERCK

Ksilen PROLABO

Magnezyum Sulfat Heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) MERCK

Manganez (II) Sulfat Monohidrat ($MnSO_4 \cdot H_2O$) MERCK

Meta – Phosforik Asit MERCK

N-Butanol ($CH_3(CH_2)_3OH$) MERCK

Parafin MERCK

Pikrik Asit MERCK

Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) MERCK

Potasyum Fosfat (K_2HPO_4) MERCK

Sığır Serum Albumin (BSA) SIGMA

Sitrik Asit (Trisodyum Dihidrate) BIOMATIK

Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$) MERCK

Sodyum Fosfat Dibazik (Anhydrous, Na_2HPO_4) MOLYCHEM

Sodyum Fosfat Dihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$) MERCK

Sodyum Hidrosit (NaOH) MERCK

Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) MERCK

Sodyum Klorür (NaCI) MERCK

Sodyum Nitrat ($NaNO_3$) MERCK

Tiobarbiturik Asit ($C_4H_4N_2O2S$) MOLYCHEM

Trikloroasetik Asit (TCA) (CCI_3COOH) PANREAC

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı (Profilo)

Çeker ocak (Özge)

Dispenser (Isolab)

Etüv (Binder)

Homojenizatör (Scientific Industries- Disruptor Genie)

Isıtıcı Tabla (Elektro-mag)

Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)

Mikro Santrifüj (Herolab- Micro Gen 16)

Mikroskop (Leica)

Mikrotom (Leica RM 2125RT)

Multimod Okuyucu (Biotek – Cytation 3)

Otomatik Pipetler (Rainin)

Sonikatör (Heilscher UP100H)

Sonikatör (Ultrasonic)

Soğutmalı Santrifüj (Hermle Z326K)

Spektrofotometre (Beckman Coulter DU® 730 Life Science UV/Vis)

Su Banyosu (Nüve bath- nb9)

Terazi (Kern)

Vorteks (Biosan)

2.1.3. *Carassius auratus*'un sistematikteki yeri



Şekil 2.1. *Carassius auratus*'un dış görünüşü.

Ekingen (1988)'e göre:

ALEM : Animalia

ALT ALEM : Metazoa

BÖLÜM : Chordata

ALT BÖLÜM : Vertebrata

ÜST SINIF : Gnathostamata

SINIF : Osteichthyes

ALT SINIF : Actinopterygii

ÜST TAKIM : Teleostei

TAKIM : Cypriniformes

ALT TAKIM : Cyprinoidei

AİLE : Cyprinidae

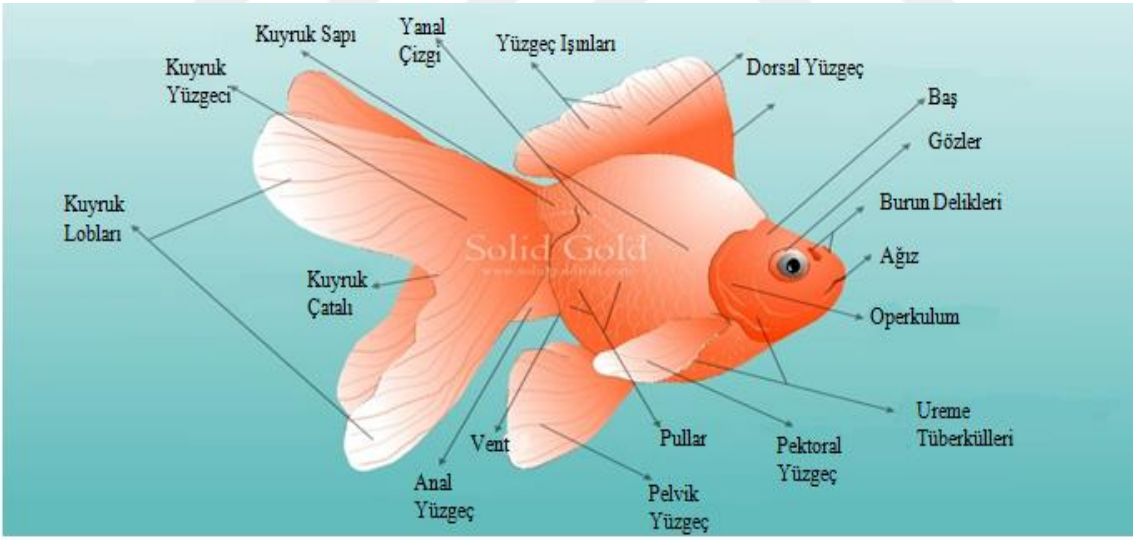
CİNS : *Carassius*

TÜR : *Carassius auratus*,

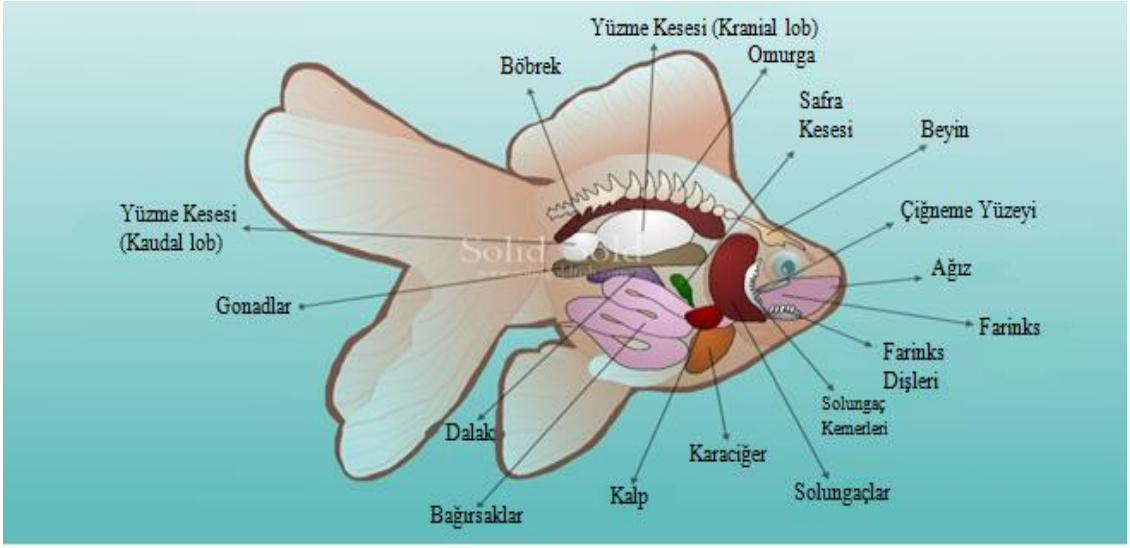
Linnaeus,1758

2.1.3.1. *Carassius auratus*'un biyolojisi

Doğal yaşam alanlarının arasında nehir, göl, havuz ve su birikintileri gibi tatlı sular bulunan *C.auratus* türü balıklar, yumurtalarını su bitkileri üzerinde bırakırlar ve larvaları pelajiktir. Küçük krustaseler, böcek larvaları ve su bitkileri gibi çok çeşitli organizmalarla beslenirler. Boyları en fazla 30 cm, ağırlıklarıysa en fazla 3 kg'a kadar ulaşabilmektedir. Yanal çizgide 27-31 pulları vardır. Dorsal yüzgeçleri dış bükeydir ve bu yüzgecin ilk ışını kuvvetlidir (Demirsoy, 1993). Üreme zamanı yaklaşan erkek bireylerinde, solungaç kapaklarının yakınında küçük tüberküller oluşur, ürogenital açıklıkları da içeriye doğru çöküktür. Üreme zamanı yaklaşan dişilerde ise vücut normal halinden daha geniş ve şiş durumdadır. Yumurtaların ve larvaların gelişebilmesi için en uygun sıcaklık 22ºC'dir (Alpbaz, 2001). Üreme olgunluğuna 2-4 yaşlarında erişirler (Çelikkale, 1986; Altınköprü, 1987; Mertlich, 1987; Demirsoy,1993). Üremeye başlamadan önce erkek balık, karnı şişmiş olan dişiyi takip eder ve sürekli rahatsız eder (Hekimoğlu, 2008). Çalışmalarımızda *C.auratus* türü balıklar ticari balık yetiştiricilerinden satın alınmıştır.

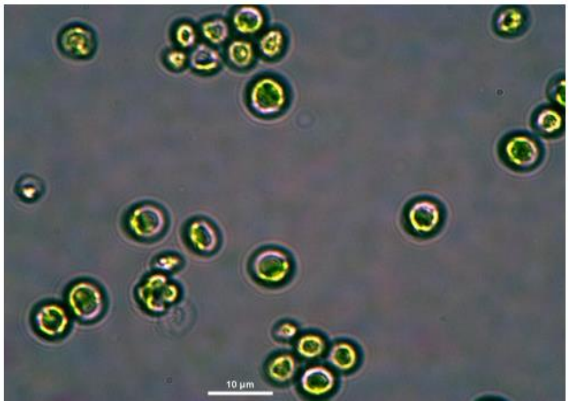


Şekil 2.2. *Carassius auratus* balığının morfolojisi (www.solidgoldfish.com)



Şekil 2.3. *Carassius auratus* balığının anatomisi (www.solidgoldfish.com)

2.1.4. Yeşil alg *Chlorella varibilis*'in sistematikteki yeri



Şekil 2.4. *Chlorella variabilis*'in ışık mikroskobundaki görünüşü.

Beijerinck (1890)'e göre:

ALEM: Plantae

BÖLÜM: Chlorophyta

SINIF: Chlorophyceae

TAKIM: Chlorococcales

FAMİLYA: Chlorellaceae

TÜR: *Chlorella variabilis* (Beijerinck, 1890)

2.1.4.1. Yeşil alg *Chlorella variabilis*'in biyolojisi

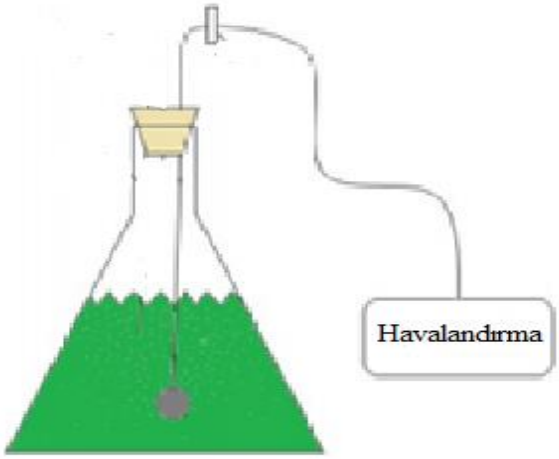
C. variabilis Chlorophyta şubesinde, Chlorophyceae sınıfında yer alır. Chlorophyta 10 algal bölümden biridir. Genel olarak yeşil algler olarak bilinirler. Klorofil a ve b'yi içeren yeşil kloroplastları vardır. Ek olarak β- ve γ- karoten ve birkaç ksantofil içerir. Özellikleri gelişmiş bitkilerle oldukça benzerdir. Depolama ürünü nişastadır. Yeşil algler hareketsiz tek hücreliler, kamçılılar ve çok hücreli koloniler gibi çeşitli grupları barındırır. Bitki evrimcileri karasal bitkilerin doğrudan yeşil alg sınıfından evrildiğine inanırlar (Trentepohliophyceae). Chlorophyceae sınıfının birçoğu tatlı sularda bulunur. Yaklaşık 355 cins, 2650 tür bulunur. Tatlı sularda veya toprakta yaşarlar, çabuk büyürler. Bu yüzden deneysel çalışmalarda sıkça tercih edilirler. 1950'lerin sonlarından beri kültürü yapılmaktadır.

2.1.4.2. *Chlorella variabilis*'in kültür ortamının hazırlanması

Alglerin yetiştirilmesi için BG11 (besi yeri) hazırlanmıştır. Fosfor; çeşitli hücresel süreçler (enerji transferi gibi) ve DNA biyosentezi için gereklidir. Besi yerinde algler için fosfatı sağlamanın en iyi yolu ortofosfattır (PO_4^2). Lipit içeriği ve karbohidratlar da fosfor tarafından etkilenir (Richmond, 2004). S, K, Na, Fe, Mg ve Ca gibi diğer elementler de alg beslenmesi açısından önemlidir. B, Cu, Mn, Zn ve Mo gibi iz elementler de enzim reaksiyonlarında önemli rol oynamaktadır (Richmond, 2004). Su, besi yerinde genellikle distile olarak kullanılır. *Chlorella sp.* için farklı besi yerleri kullanılabilir. En yaygın olarak BG-11 besi yeri kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010; Yoo ve ark., 2010). BG-11 besi yerinde $NaNO_3$ en fazla miktarda kullanılan nütrienttir ve bunu K_2PO_4 takip eder. Algin büyümesi için gerekli olan azot ve fosfor temel olarak bu iki bileşikten sağlanmış olur (Keffer ve Kleinheinz, 2002; Widjaja ve ark., 2009).

Tablo 2.1. *Chlorella variabilis'*in kültür ortamı olan BG11 besi yerinin hazırlanışı.

Stok Çözelti (SÇ)	**Hacim**	**Bileşik**	**SÇ'deki konsantrasyon**	**Final konsantrasyonu**
SÇ 1	60 ml	$NaNO_3$	2.50 g.100 ml^{-1}	1.76 $.10^{-2}$ M
SÇ 2	10 ml	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.75 g.100 ml^{-1}	3.04 $.10^{-4}$ M
SÇ 3	20 ml	Na_2CO_3	0.10 g.100 ml^{-1}	1.89 $.10^{-4}$ M
SÇ 4	5.3 ml	K_2HPO_4	0.75 g.100 ml^{-1}	2,28 $.10^{-4}$ M
SÇ 5	14 ml	$CaCl_2$	0.25 g.100 ml^{-1}	2H2O 2.38 $.10^{-4}$ M
SÇ 6	6 ml	Sitrik asit	0.10 g.100 ml^{-1}	3.12 $.10^{-5}$ M
SÇ 7	10 ml	Ferrik amonyum sitrat	0.06 g.100 ml^{-1}	2,26.10^{-5}M
SÇ 8 Mikronütrient (Kuhl ve Lorenzen, 1964)	1 ml	H_3BO_3 $MnSO_4 \cdot H_2O$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $(NH_4)_6 Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	61.0 mg.1 l^{-1} 169.0mg. 1l^{-1} 287.0 mg.1 l^{-1} 2.5 mg.1 l^{-1} 12.5 mg.1 l^{-1}	9.87 $.10^{-7}$ M 1.00 $.10^{-6}$ M 9.98 $.10^{-7}$ M 1.00 $.10^{-8}$ M 1.01 $.10^{-8}$ M



Şekil 2.5. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilme ortamı (Şematik).

2.1.4.3. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilmesi

Bu çalışmada *C. variabilis* saf kültürü kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan *C.variabilis* alg kültürü İstanbul Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikroalg Laboratuarı'ndan temin edilmiştir. *C. variabilis* yarı-sürekli kültür yöntemi ile 3'er litrelik cam kavanozlarda kültüre alınmıştır. 3'er kez tekrarlanmıştır. Kültürlerin yer aldığı ortamın sıcaklığı 22 ºC olarak ayarlanmış ve gün ışığına eş değerde ayarlanmış olan led aydınlatma uygulanmıştır. Kültürler bir kompresör aracılığı havalandırılmıştır.



Şekil 2.6. *Chlorella variabilis*'in yetiştirilme ortamı.

2.1.5. Ultrasonik uygulama

Horn tipi sonikatör olarak 30 kHz frekansta ve 100 W gücündeki UP100H (Hielscher GmbH, Teltow, Germany) kullanılmıştır. Bir transdüser ve metalik bir probdan oluşmaktadır. Mekanik kuvvet bu prob aracılığıyla ultrasonik basıncı oluşturur. Uygulandığında suda ses dalgalarının meydana gelmesi sağlanmış olur. Bu ses dalgaları da daha önce bahsettiğimiz kavitasyon kabarcıklarını oluşturur. Yüksek ısı ve basınç açığa çıkar. Bu da serbest radikal oluşmasını uyarır. Uygulama 20 litrelik hacimde 7 gün süreyle, her gün 60 dakika olarak tasarlanmıştır. Uygulamaya 30 balıkla başlanmıştır.



Şekil 2.7. Horn tipi sonikatör.

Bath tipi sonikatör olarak da, Ultrasonic marka 28 kHz frekansta, 800 W güçteki cihaz kullanılmıştır. Uygulama 50 litrelik hacimde 7 gün süreyle, her gün 10 sn. olarak tasarlanmıştır. Uygulamaya 63 balıkla başlanmıştır



Şekil 2.8. Bath tipi sonikatör ve deney ortamı.

Deneyde kullanılan sonikatörlerle uygulanan ultrasesin özgül enejisi, W.sn/ml şeklinde hesaplanarak toplam birey hacmine bölünerek, balık başına düşen enerji miktarı tanımlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Biyokimyasal analizler

2.2.1.1. % 10 gramlık doku homojenatı hazırlanması

1ml serum fizyolojik ile cam boncuk yardımıyla dismembranatörde homojenize edilir. Doku homojenatı ependorf tüpleri içinde, gerekli bilgiler üzerlerine yazılarak derin dondurucuda çalışılacağı güne kadar saklanır. Aynı gün çalışılacaksa da +4°C buzdolabında bekletilir. % 10 gramlık doku homojenatı için gerekli olan serum fizyolojik hacmi, nemli doku tartımı (mg)/ 100 formülü ile hesaplanır.

2.2.1.2. Dokularda protein tayini (Bradford yöntemi)

Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'deki absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır (Bradford, 1976). Gereken çözeltilerin hazırlanması:

• % 10 mg albümin stok çözeltisi: 10 mg albümin bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

• Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 20, 40, 60, 80 µg albumin içerecek şekilde distile suyla seyreltilerek hazırlanır.

• Bradford reaktifi: Stok çözeltiden kullanılır.

Deney yöntemi:

6 deney tüpü alınır, numune (N), standart 1 (S1), standart 2 (S2), standart 3(S3), standart 4 (S4) ve kör (K) olmak üzere işaretlenip ve aşağıdaki gibi çalışılır.

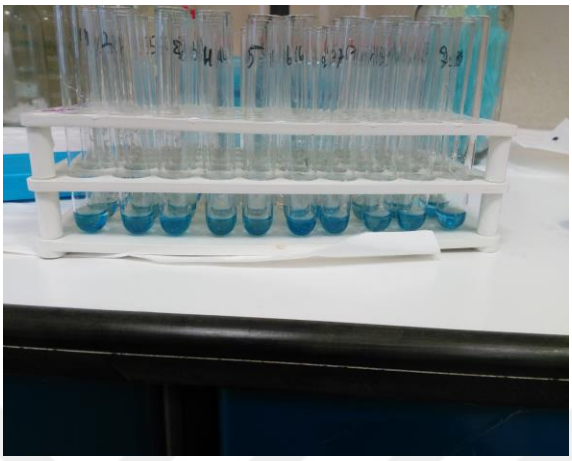
Tablo 2.2. Dokulardaki protein tayininin Bradford yöntemine göre yapılışı.

	Numune	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**Kör**
Albumin (%10 mg)	-	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	-
Doku homojenatı	25 µl	-	-	-	-	-
Distile su	775 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl	800 µl
Vorteks ile karıştırılır ↓						
Bradford reaktifi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Vortekste karıştırılıp, oda sıcaklığında 15 dk. boyunca bekletilir. 15 dk. sonunda 595 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama :

Protein standart grafiği ile miktarı hesaplanır.



Şekil 2.9. Protein tayini yapılmak üzere Bradford reaktifi eklenmiş doku tüpleri ve kör tüp.

2.2.1.3. Dokularda malondialdehit (MDA) tayini (Ledwozyw yöntemi)

Lipit peroksidasyonu ürünü olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasında meydana gelen tepkime sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesidir (Ledwozyw ve ark., 1986).

Gereken çözeltilerin hazırlanması:

• TBA çözeltisi (0.047 M) : 500 mg TBA ile 6 ml 1 M'lık NaOH karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su eklenir.

• NaOH (1 M) : 4 gram NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür, hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

• Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M; 0.6 M HCl'deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1.19 g/dl'lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml' ye tamamlanır.

• n-butanol: Stok çözeltiden kullanılır.

Deney yöntemi:

2 tane deney tüpü alınır, kör-numune olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

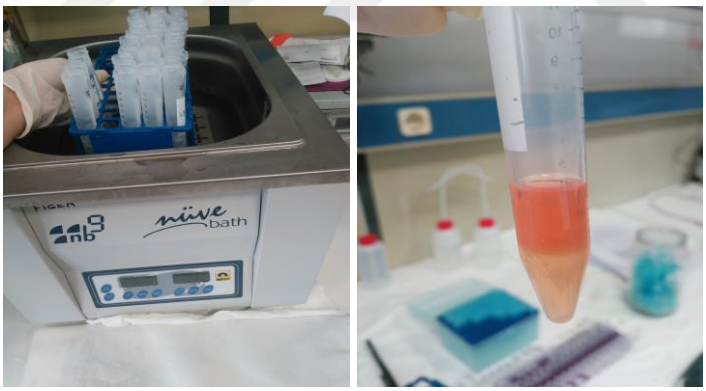
Tablo 2.3. Dokulardaki MDA tayininin Ledwozyw yöntemine göre yapılışı.

	Numune	**Kör**
Doku homojenatı	0.25 ml	-
Distile su	-	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 15 dk. bekletilir ↓		
TBA	0.75 ml	0.75 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk. kaynar su banyosunda inkübe edilir ↓		
n-Bütanol	2 ml	2 ml

Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedilir.

Hesaplama:

Doku homojenatında LPO düzeyleri MDA için saptanmış ekstinksiyon katsayısı (1.56.105 M^{-1} cm^{-1}) kullanılarak nmol MDA/ mg protein cinsinden hesaplanır.



Şekil 2.10. Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan deneyin aşamaları. Su banyosu (sağda) ve faz farkı (solda).

2.2.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini (Beutler yöntemi)

Ellman ayıracı, DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Beutler, 1975).

Gereken çözeltilerin hazırlanması:

• Sodyum sitrat çözeltisi (% 1 g) : 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz distile suda çözülür, hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır

• Ellman ayıracı (% 40 mg DTNB) : 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözülür. Hacim %1g'lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

• Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA-Na (etilen diamintetra asetik asit sodyum) tuzu ve 30 g sodyum klorür ayrı ayrı olarak bir miktar distile suda çözülür. Hepsi birleştirilir ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

• Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (0.3 M) : 4.26 gram Na_2HPO_4 biraz distile suda çözüldükten sonra ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deney yöntemi :

Bir deney tüpüne 0.2 ml doku homojenatı konur. Üzerine 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisi ilave edilir. Vorteksle karıştırılır. 5dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Pelet atılıp süpernatant alınır. İki tane deney tüpü alınır. Kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 2.4. Dokularda GSH miktarı tayininin Beutler yöntemine göre yapılışı

	Numune	**Kör**
Distile su	-	0.2 ml
Süpernatant	0.2 ml	-
Na_2HPO_4	0.8 ml	0.8 ml
Ellman ayıracı	0.1 ml	0.1 ml

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk. bekletilir. Köre karşı 412 nm'deki absorbansta ölçümler kaydedilir.



Şekil 2.11. GSH miktarının belirlenmesi için yapılan santrifüj aşaması.

Hesaplama:

Homojenatta GSH düzeyleri, seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm'de ekstinksiyon katsayısı ($13600/M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak GSH µg /mg protein cinsinden hesaplanır.

2.2.1.5. Dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini (Aebi yöntemi)

CAT enzimi; H_2O_2'nin, H_2O'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'deki absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk.'daki absorbansta azalması katalaz aktivitesinin belirtecidir (Aebi, 1974).

Gereken çözeltilerin hazırlanması:

• Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0) :

a) 6.81 g KH_2PO_4

b) 8.90 g $Na_2HPO_4.2H_2O$ tartılıp ayrı ayrı bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanılacağı zaman a'dan 1 hacim b'den 1.5 hacim alınarak karıştırılır (pH=7.0'de).

• H_2O_2 çözeltisi (30 mM, d=1.11) + Fosfat tamponu: % 30 g'lık H_2O_2 çözeltisinden 0.31 ml alınır. 50 mM lık fosfat tamponu (pH=7.0) ile 100 ml'ye seyreltilerek hazırlanır. Deneyler sırasında taze olmalıdır.

• Doku homojenatı: Doku serum fizyolojik ile homojenize edilip seyreltilir. Ön denemelerle dokunun ne kadar seyreltileceği önceden tespit edilir.

Deney yöntemi:

% 10 gramlık doku homojenatı 10 dk. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/10, 1/20 veya 1/50 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır.

Süpernatant seyreltildikten sonra edildikten sonra 5-10 dakika içinde mutlaka çalışılmalıdır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpü alınır. Aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 2.5. CAT enzim aktivitesinin Aebi yöntemine göre belirlenmesi.

	Numune	**Kör**
Fosfat tamponu	-	0.2 ml
Dilüe süpernatant	0.4 ml	0.4 ml
H_2O_2 çözeltisi + fosfat tamponu	0.2 ml	-

1 dk. sonra 240 nm'de absorbansları okunarak kaydedilir.

Hesaplama :

Süpernatantta katalaz aktivitesi bu deney için belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı 0.004 (0.00394) mM^{-1}/ mm^{-1} kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınmalıdır. Ü/mg protein dk. cinsinden hesaplaması yapılır.

2.2.1.6. Dokularda asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) tayini (Ellman yöntemi)

AChE enzimi; dokularda asetilkolinin inhibe edilmesini sağlayan bir enzimdir.

Gereken çözeltilerin hazırlanması:

DTNB belirteci: 8.75 g sodyum fosfat ve 1.5 g $NaHCO_3$ yaklaşık 950 ml distile suda çözülür, pH 7'ye ayarlanır. 3.96 g DTNB çözülerek hacim destile su ile 1 litreye tamamlanır (Ellman ve ark., 1961).

Sodyum tamponu: 8.75 g sodyum fosfatdihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 900 ml distile suda çözülür ve 1N NaOH çözeltisiyle pH 8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Asetilkolin iyodür: 0.50868 g asetiltiyokolin iyodür alınır ve bir miktar 0.05 M (pH=8) sodyum fosfat tamponu içinde çözüldü. Hacim bu sodyum tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Deney yöntemi: Her numunenin kendi körü olacak şekilde aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 2.6. AChE enzim aktivitesi tayininin Ellman yöntemine göre yapılışı.

	Numune	**Kör**
DTNB Belirteci	100 µl	100 µl
Doku Homojenatı	100 µl	100 µl
Vorteks ile karıştırılır ve sadece kör 65ºC'de 3 dk. bekletilir ↓		
Sodyum tamponu	2.7 ml	2.7 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 37ºC'de 5 dk. beklenir ↓		
Asetilkolin iyodür	100 µl	100 µl
37ºC'de 10 dk. beklenir		

Bu aşamadan 10dk. sonra 412 nm.'de absorbans ölçümü yapılır.

2.2.2. Histolojik analizler

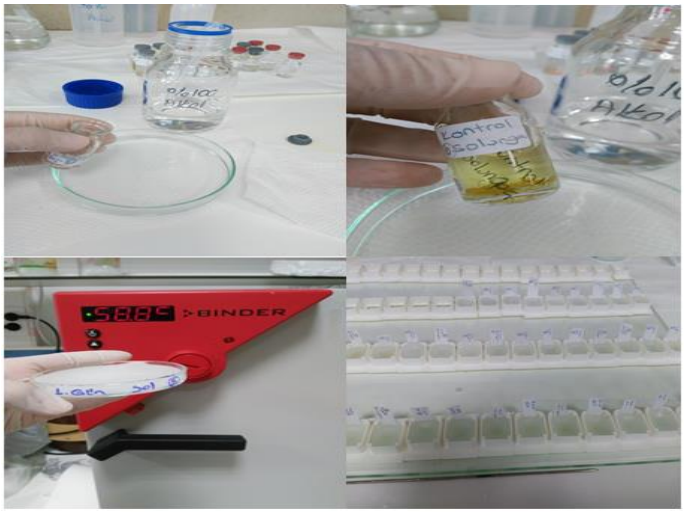
Deney sonunda balıklardan alınan doku örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik metotlarla parafin bloklar hazırlandı. Daha sonra bu bloklardan 3-5 mm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin boyama yöntemiyle boyanıp histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobunda incelendi.

Doku takibi aşağıdaki düzende gerçekleştirildi (Luna, 1968).

Tablo 2.7. Alkol serisi ve parafin emdirme işlemi.

Dehidrasyon	
%70 lik alkol	1 gece
%80'lik alkol	1 gece
%90'lık alkol	1 gece
%96'lık alkol	1 gece
Absolüt alkol	1 gece
Parlatma	
Ksilol I	1 gece
Ksilol:Parafin(1:1) karışımında	1 gece (59 °C' deki etüvde)
Parafin	1 gece (59 °C' deki etüvde)

Parafin emdirme işleminden sonra doku örnekleri parafin kalıplara konulur ve bu kalıplardan mikrotom için bloklar hazırlanır.



Şekil 2.12. Alkol serileri, parafin emdirme, parafin blokları.



Şekil 2.13. Mikrotomda parafin blokların kesilmesi.

Mikrotomda kesilen dokular lamlara yerleştirilir. 1 gece kuruması beklenir. Kuruduktan sonra boyama işlemi aşağıdaki düzende gerçekleşir:

Tablo 2.8. H&E boyama prosedürü.

Ksilol	3 dk.
Ksilol	3 dk.
%100 Etanol	3 dk.
%90 Etanol	30 sn.
%70 Etanol	30 sn.
Akan suyun altında	30 sn.
Hematoksilen	1 dk.
Distile su	4 dk.
%95 Etanol	30 sn.
%95 Etanol	30 sn.
Eozin	1 dk.
%100 Etanol	1.5 dk.
%100 Etanol	1.5 dk.
Ksilol	45 sn.

Boyaması gerçekleşen preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılır. 1 gün sonra görüntüleme işlemi ışık mikroskobunda gerçekleştirilir.

2.2.3. Davranış analizleri

Davranış değişiklikleri her uygulamadan önce, uygulama anında ve sonrasında yapılan video çekimlerinin kayıtlarının incelenmesiyle belirlenmiştir.

2.2.4. İstatistiksel analizler

Biyokimyasal analiz bulguları SPSS 23.0 paket programında Shapiro-Wilk testi ile $P < 0.05$ önem derecesinde değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

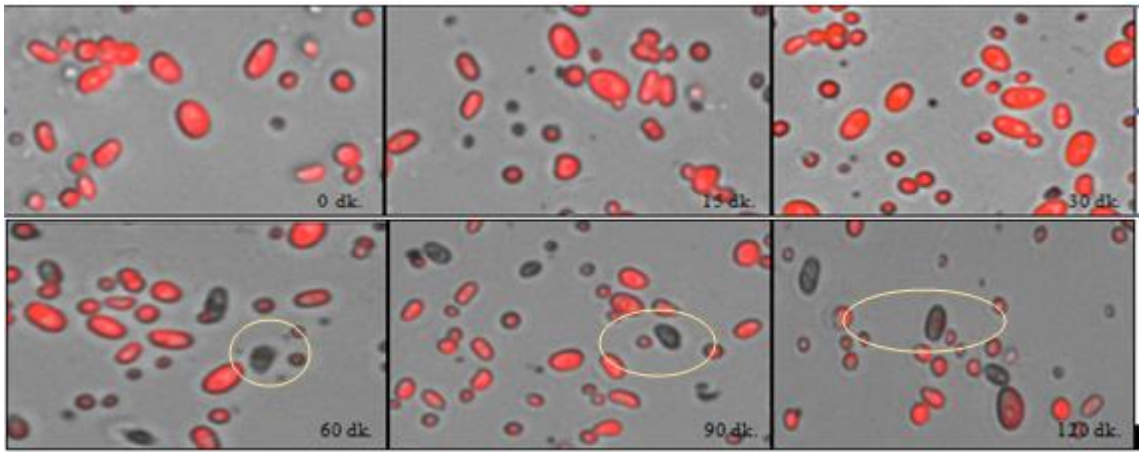
3.1. Bulgular

Ultrasesin etkisi çalışmalarda ilk olarak yeşil alg olan *C.variabilis* üzerinde gözlemlenmiştir. Farklı hacim ve cihazlarda yapılan çalışmaların alglere etkisi Cytation-3 ile görüntülenmiştir. Bu çalışmalar ışığında, ultrasesin balıklar üzerine olan etkisine bakılmıştır. Uygulamalar sırasında horn tipi sonikatörde uygulamalar sonrası ölüm gözlenmezken, bath tipi sonikatörde uygulamanın 1.günü 3, 2.gün 4, 3.gün 5 ve 6.gün 1 adet balığın öldüğü gözlenmiştir. Ultrases uygulaması ile oluşan özgül enerji aralığı bath tipi sonikatörde 3.10^{-4}- $7.\ 10^{-4}$; horn tipi sonikatörde ise $8.\ 10^{-2}$- $2.\ 10^{-1}$ olarak bulunmuştur. Etkiler sırasıyla; biyokimyasal, histolojik ve davranış açısından değerlendirilmiştir. Biyokimyasal parametre olarak total protein, MDA, GSH CAT ve AChE kullanılmıştır. Histolojik boyamalarda H&E boyamasından yararlanılmıştır. Davranış değişikliğini belirlemek için ise gözlemler yapılıp videolar çekilmiştir.

3.1.1. Ön çalışma

3.1.1.1. *Chlorella variabilis* ve ultrases

C. variabilis üzerine uygulanan ultrases uygulamasında artan hacimle birlikte alglerin ortadan kaldırılmasının azaldığı gözlenmiştir. Uygulamalar sonucunda horn tipi cihaz ile birlikte 300 ml'lik hacimde gözlemler yapılmasına karar verilmiştir. Uygulamalar 2 saat boyunca devam edilmiş ve ölçümler Cytation-3 ile alınmıştır.



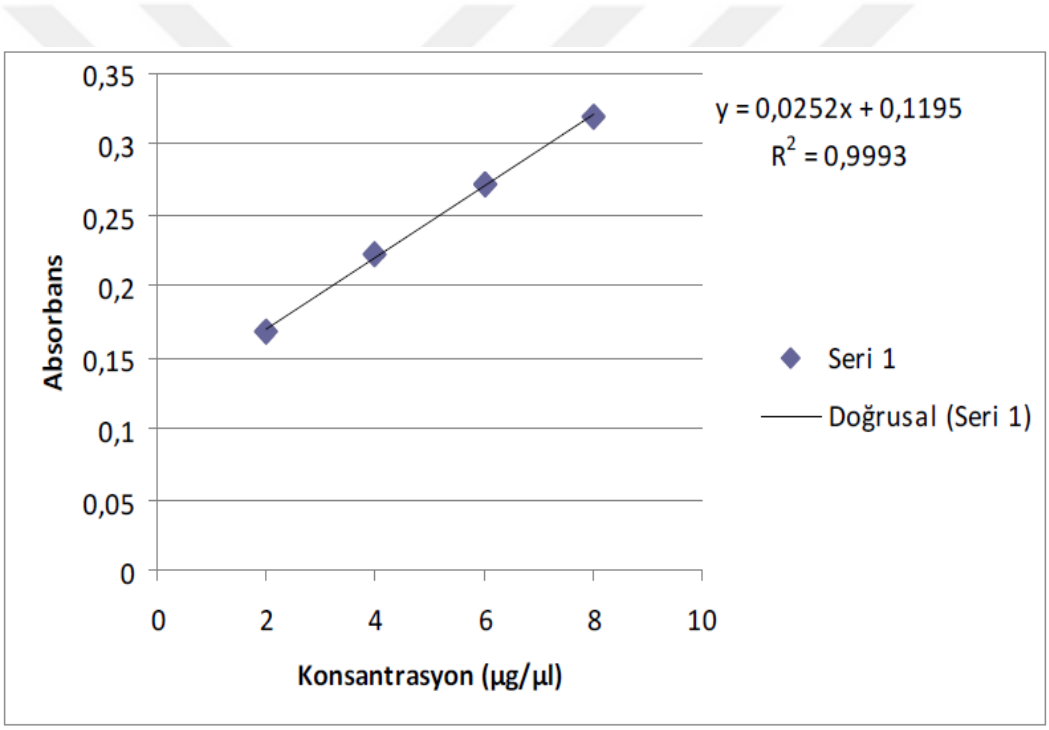
Şekil 3.1. 0-120 dk boyunca Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış *C.variabilis* hücrelerinin Cytation-3 ile görüntülenmesi.

Deneyin sonucunda artan süreyle birlikte hücrelerde deformasyonlar ve parçalanmalar, hücre ölümleri görülmüştür (Şekil 3.1).

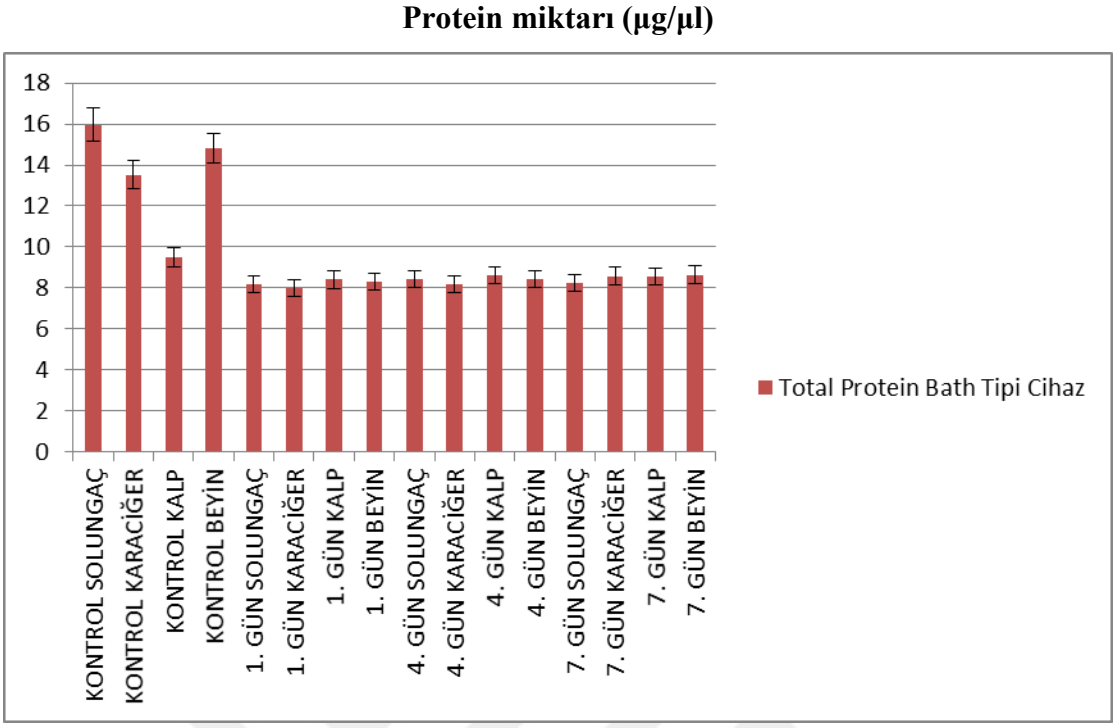
3.1.2. Biyokimyasal bulgular

3.1.2.1. Dokularda total protein tayini

Ultrasesin *C.auratus* balıklarının çeşitli dokularındaki antioksidan sistemler üzerine etkisini belirlemek için total protein miktarları hesaplanmıştır. Dokulardaki total protein tayini, Sığır Serum Albümin'i (BSA) kullanılarak hesaplandı.

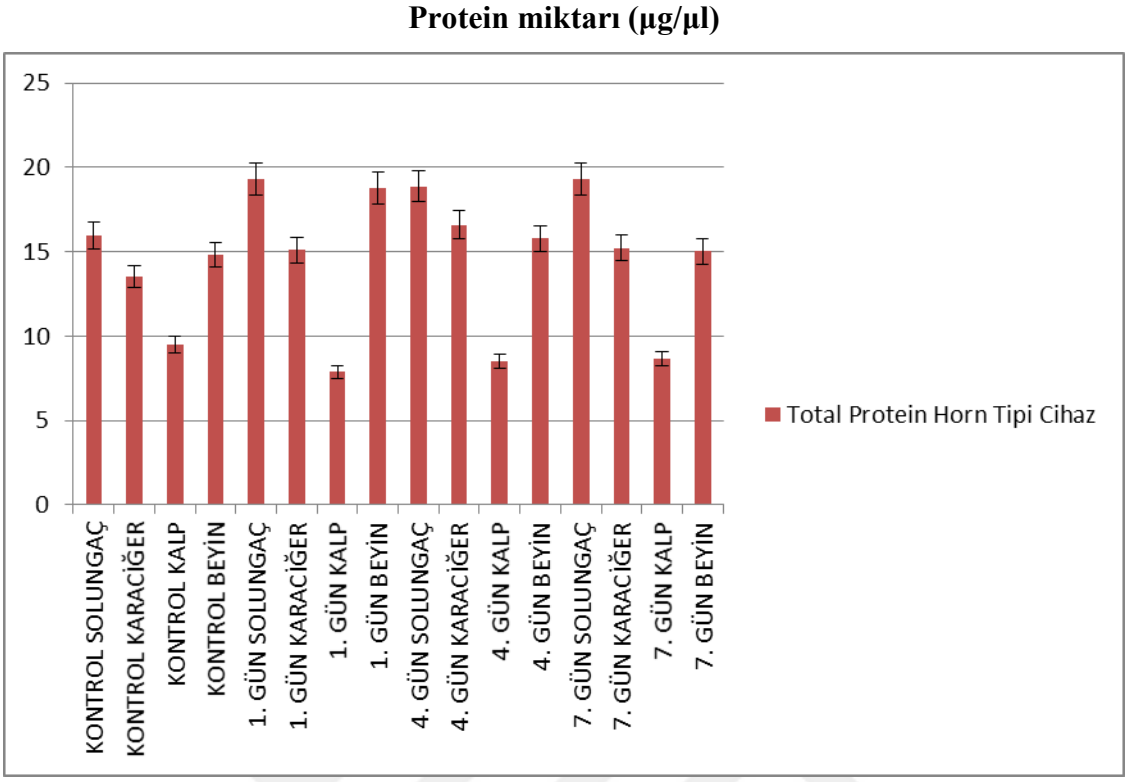


Şekil 3.2. Protein Standart Grafiği



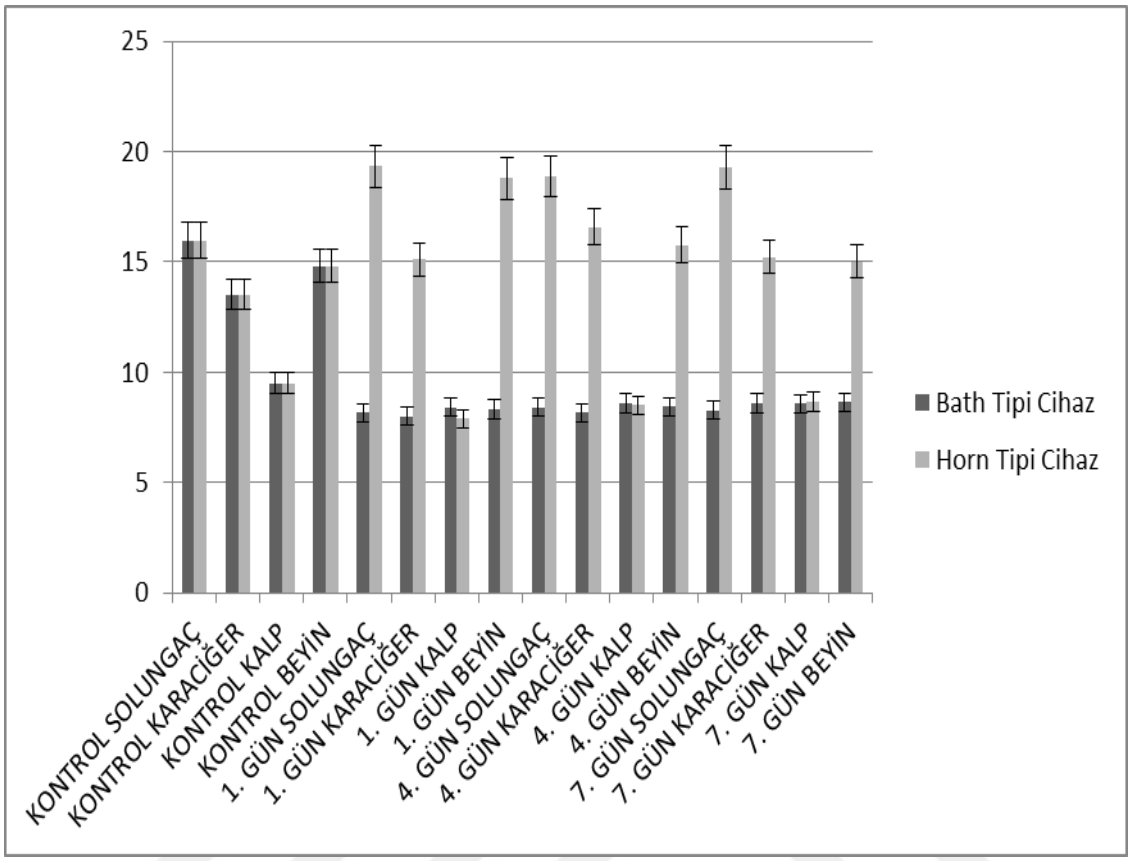
Şekil 3.3. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında total protein miktarları.

Bath tipi cihazla yapılan 10 sn.'lik uygulama sonucunda total protein miktarına solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Total protein miktarı solungaçlarda kontrole göre; 1.gün %49, 4.gün %47 ve 7.gün %48 oranında azalmıştır. Kontrole göre karaciğer total protein miktarlarına bakıldığında; 1.gün %41, 4.gün %40 ve 7.gün %37 azalma görülmüştür. Kontrole göre kalp protein miktarı; 1.gün %12, 4.gün %9 ve 7.gün %10 azalmıştır. Kontrole göre beyindeki total protein miktarı; 1.gün %44, 4.gün %43 ve 7.gün %42 oranında azalmıştır.



Şekil 3.4. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında total protein miktarları.

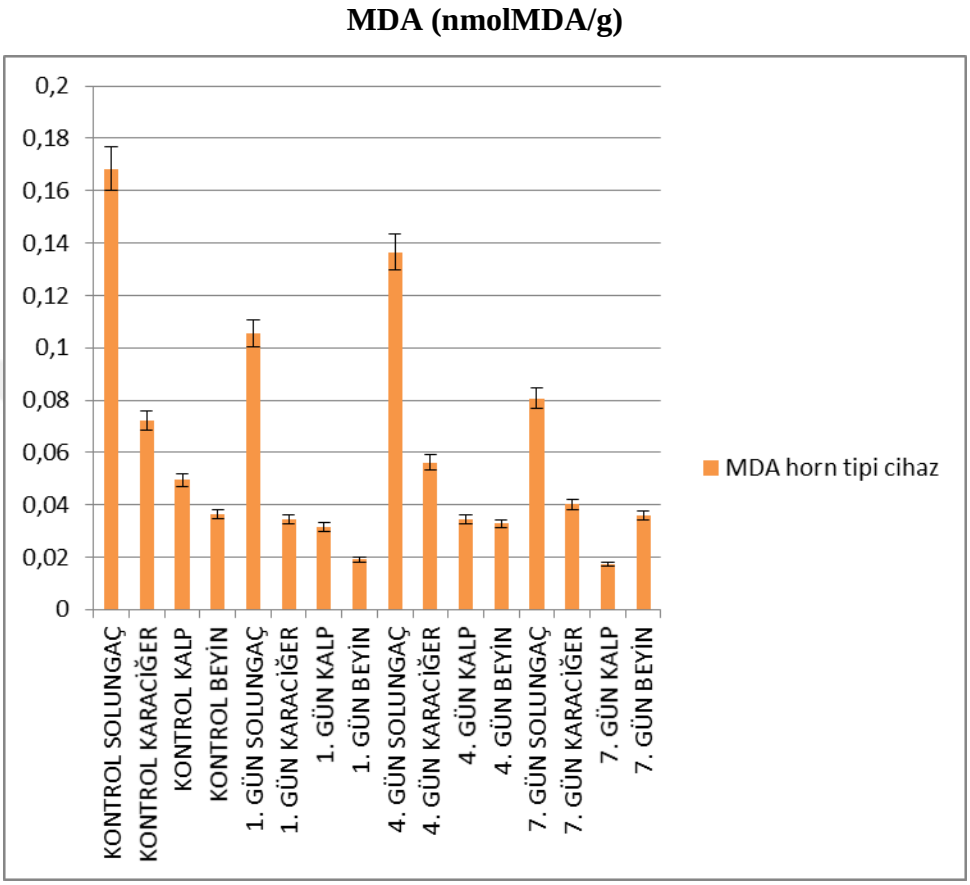
Horn tipi cihazla yapılan 1 saatlik uygulama sonucunda total protein miktarına solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Total protein miktarı solungaçlarda kontrole göre; 1.gün %21, 4.gün %18 ve 7.gün %21 oranında artmıştır. Kontrole göre karaciğer total protein miktarlarına bakıldığında; 1.gün %12, 4.gün %23 ve 7.gün %12 artış görülmüştür. Kontrole göre kalp protein miktarı; 1.gün %17, 4.gün %11 ve 7.gün %9 azalmıştır. Kontrole göre beyindeki total protein miktarı; 1.gün %27, 4.gün %6 ve 7.gün %1 oranında artmıştır.



Şekil 3.5. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus'*un çeşitli dokularındaki total protein miktarlarının karşılaştırılması.

3.1.2.2. Dokularda MDA tayini

Ultrases stresine maruz kalmış *C.auratus* balıklarının çeşitli dokularındaki lipid peroksidasyonlarını belirlemek için malondialdehit (MDA) miktarları hesaplanmıştır.

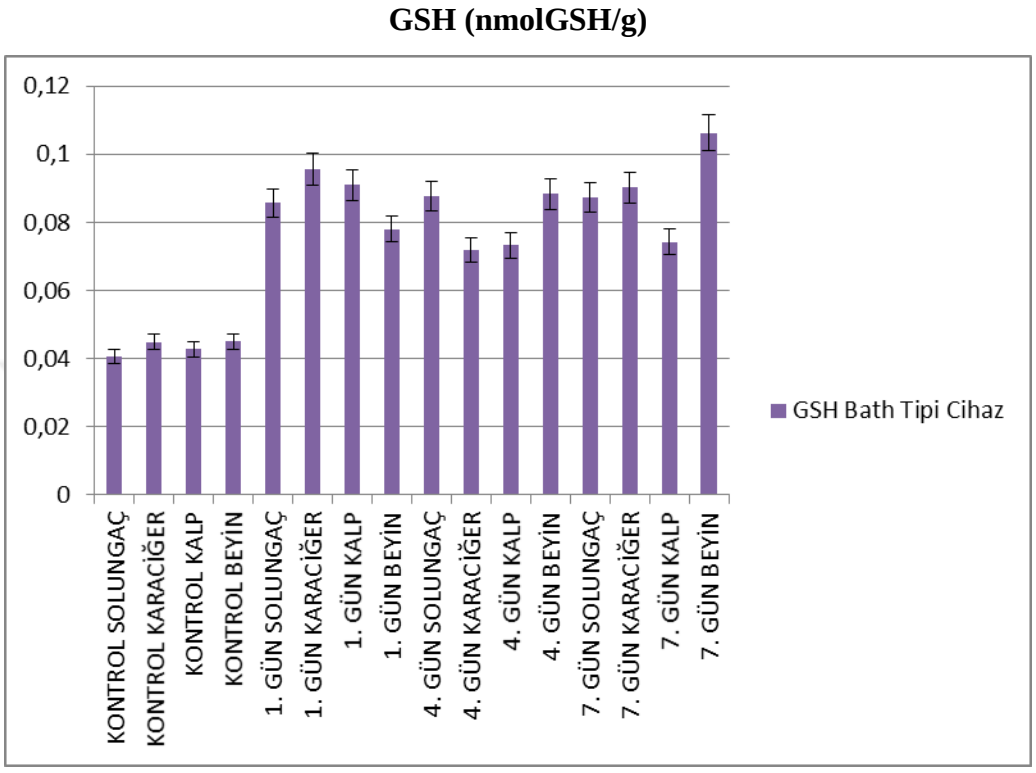


Şekil 3.6. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında Malondialdehit (MDA) miktarları.

Horn tipi cihazla yapılan 1 saatlik uygulama sonucunda MDA miktarına solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır ve bütün dokularda belirli oranlarda azalma gözlenmiştir. Kontrole göre solungaçlarda MDA miktarı; 1.gün %37, 4.gün %19 ve 7.gün %52 azalmıştır. Kontrole göre karaciğerdeki MDA miktarı; 1.gün %52, 4.gün %22 ve 7.gün %44 azalma göstermiştir. Kontrole göre kalpte MDA miktarı; 1.gün %36, 4.gün %30 ve 7.gün %65 azalmıştır. Kontrole göre beyinde ise; 1.gün %47, 4.gün %10 ve 7.gün %1 oranında azalma meydana gelmiştir.

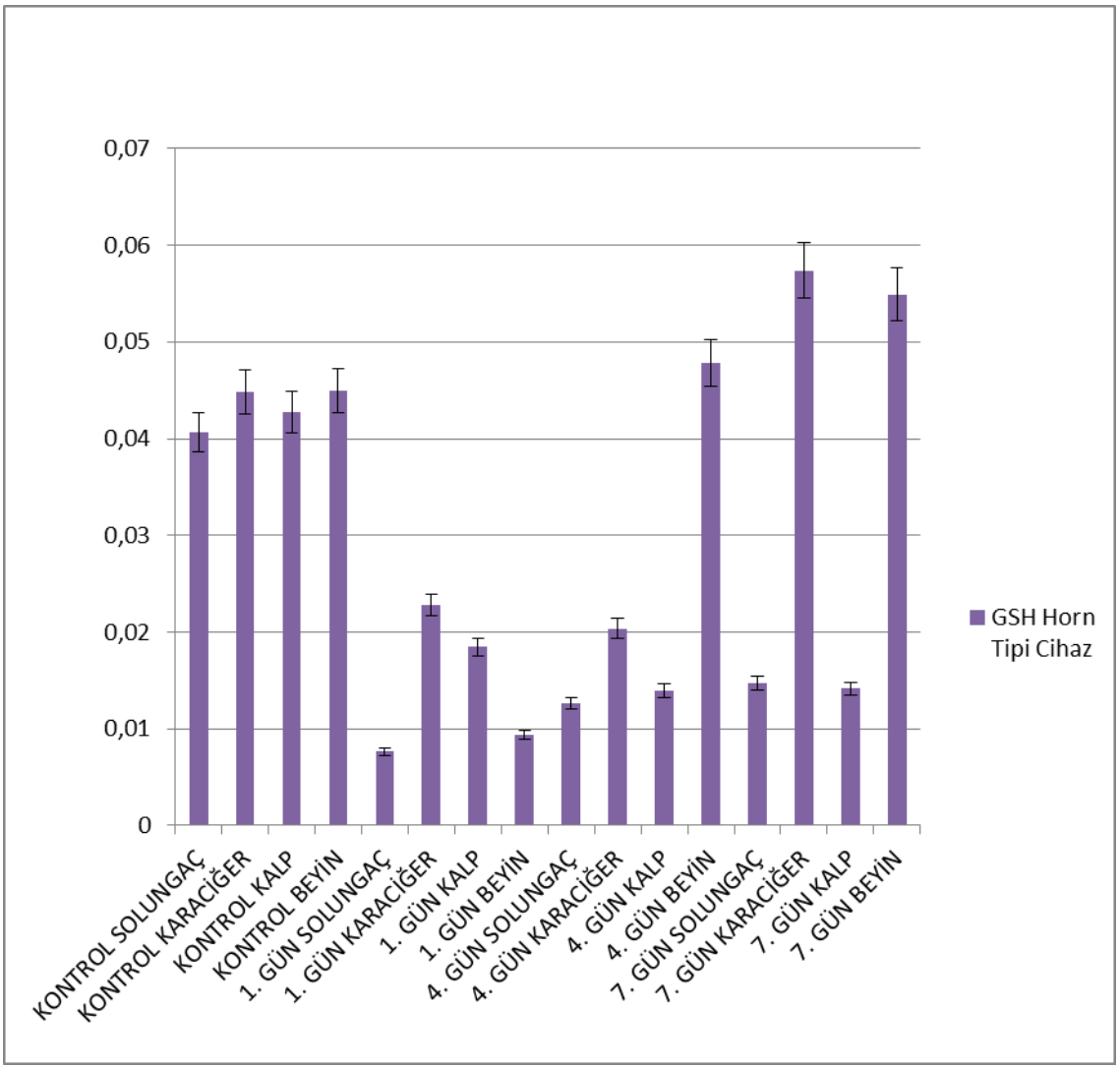
3.1.2.3. Dokularda GSH tayini

Ultrasesin *C.auratus* balıklarının çeşitli dokularındaki antioksidan sistemler üzerine etkisini belirlemek için indirgenmiş glutatyon miktarları hesaplanmıştır.



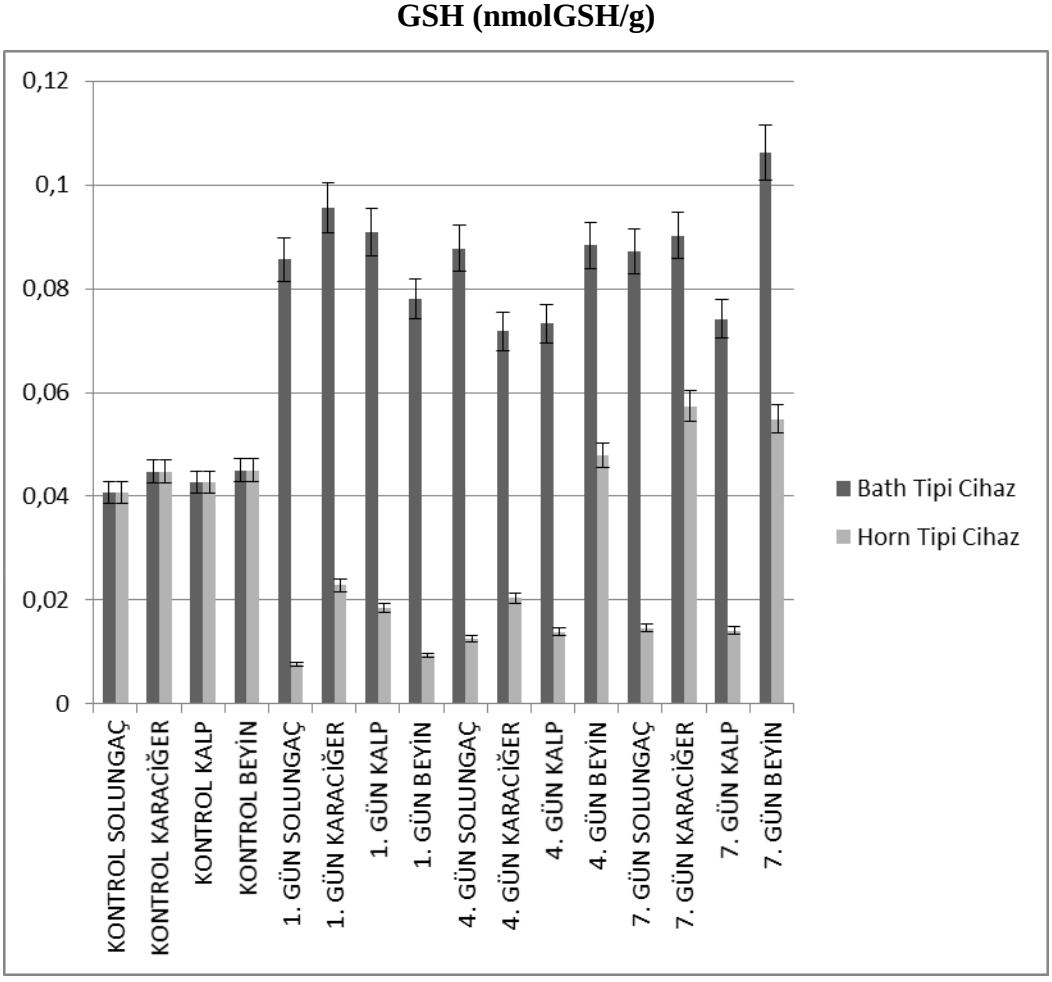
Şekil 3.7. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında GSH miktarları.

Bath tipi cihazla yapılan 10sn.'lik uygulama sonucunda GSH miktarına solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Kontrole göre solungaçlardaki GSH miktarında 1.gün %110, 4.gün %115 ve 7.gün %114 artış görülmüştür. Kontrole göre karaciğer GSH miktarında 1.gün %113, 4.gün %60 ve 7.gün %101 artış meydana gelmiştir. Kontrole göre kalpteki GSH miktarı 1.gün %113, 4.gün %72 ve 7.gün %74 olarak artış göstermiştir. Kontrole göre beyinde ise GSH miktarı 1.gün %74, 4.gün %96 ve 7.gün %136 artmıştır.



Şekil 3.8. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında GSH miktarları.

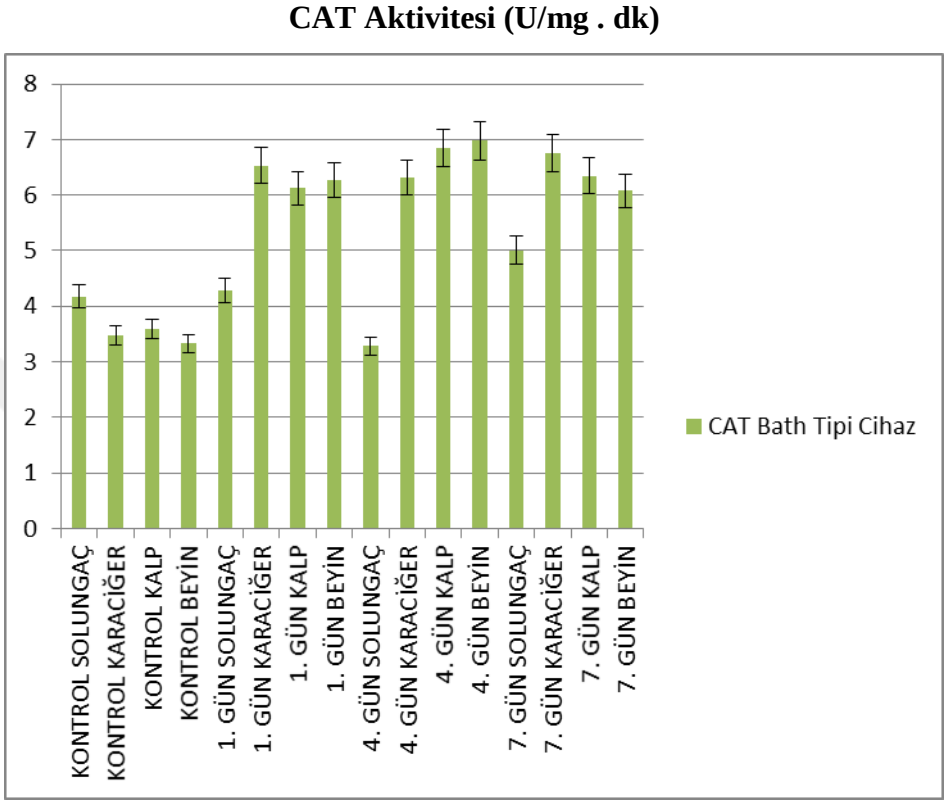
Horn tipi cihazla yapılan 1 saatlik uygulama sonucunda GSH miktarına solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Kontrole göre solungaç dokularında GSH miktarı 1.gün %81, 4.gün %69 ve 7.gün %64 azalma göstermiştir. Kontrole göre karaciğerdeki GSH miktarı 1.gün %49 ve 4.gün %55 oranında azalırken, 7.gün %28 artış göstermiştir. Kontrole göre kalpte GSH miktarın 1.gün %57, 4. ve 7. günlerde %67 azaldığı belirlenmiştir. Kontrole göre beyinde GSH miktarı 1.gün %79 oranında azalırken, 4.günde %6, 7.günde ise %22 artmıştır.



Şekil 3.9. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularındaki GSH miktarlarının karşılaştırılması.

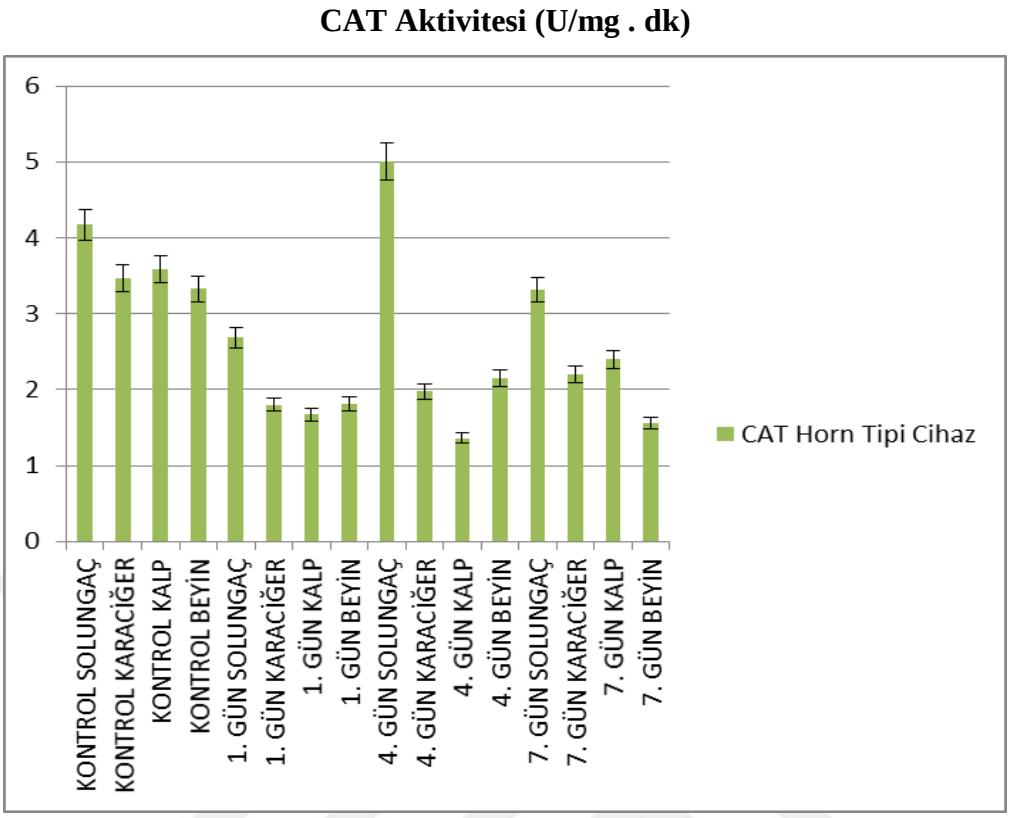
3.1.2.4. Dokularda CAT aktivite tayini

Ultrasesin *C.auratus* balıklarının çeşitli dokularındaki antioksidan sistemler üzerine etkisini belirlemek için CAT enzim aktivitesi hesaplanmıştır.



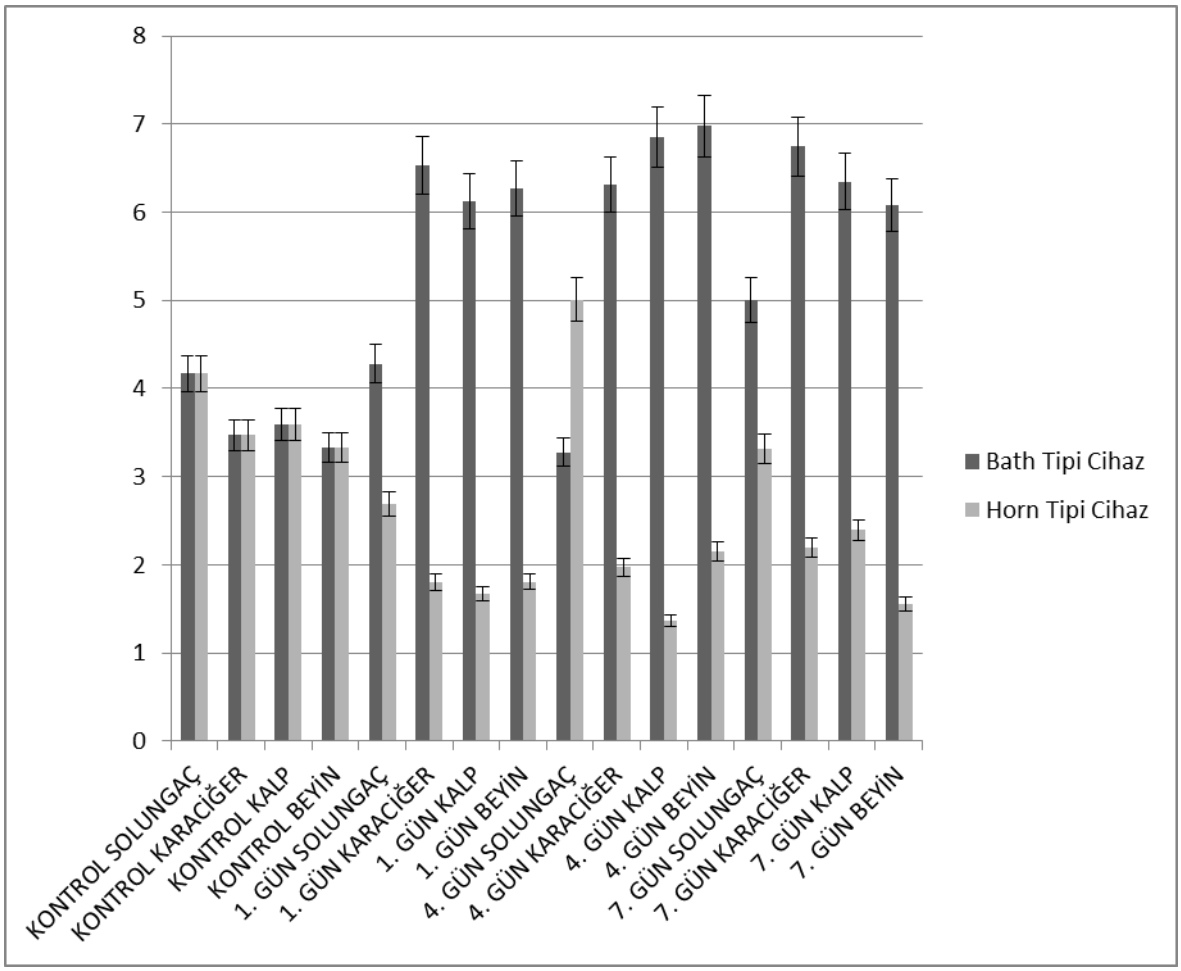
Şekil 3.10. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında CAT enzim aktivitesi tayini.

Bath tipi cihazla yapılan 10sn.'lik uygulama sonucunda CAT enzim aktivitesine solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Kontrole göre solungaçlarda; 1. gün %3 artmış, 4. gün %21 azalmış ve 7. gün % 20 artmıştır. Kontrole göre karaciğer CAT enzim aktivitesine bakıldığındaysa tüm günlerde artış görülmüştür. Bu artışlar; 1. gün %88, 4. gün %82 ve 7. gün %95 olarak belirlenmiştir. Kontrole göre kalbe bakıldığında CAT enzim aktivitesinde; 1. gün %71, 4. gün %91 ve 7. gün %77 artış görülmüştür. Kontrole göre beyinde de aynı şekilde tüm günlerde enzim aktivitesi sırasıyla; 1. gün %88, 4. gün %110 ve 7. gün %83 olarak artmıştır.



Şekil 3.11. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus'*un çeşitli dokularında CAT enzim aktivitesi tayini.

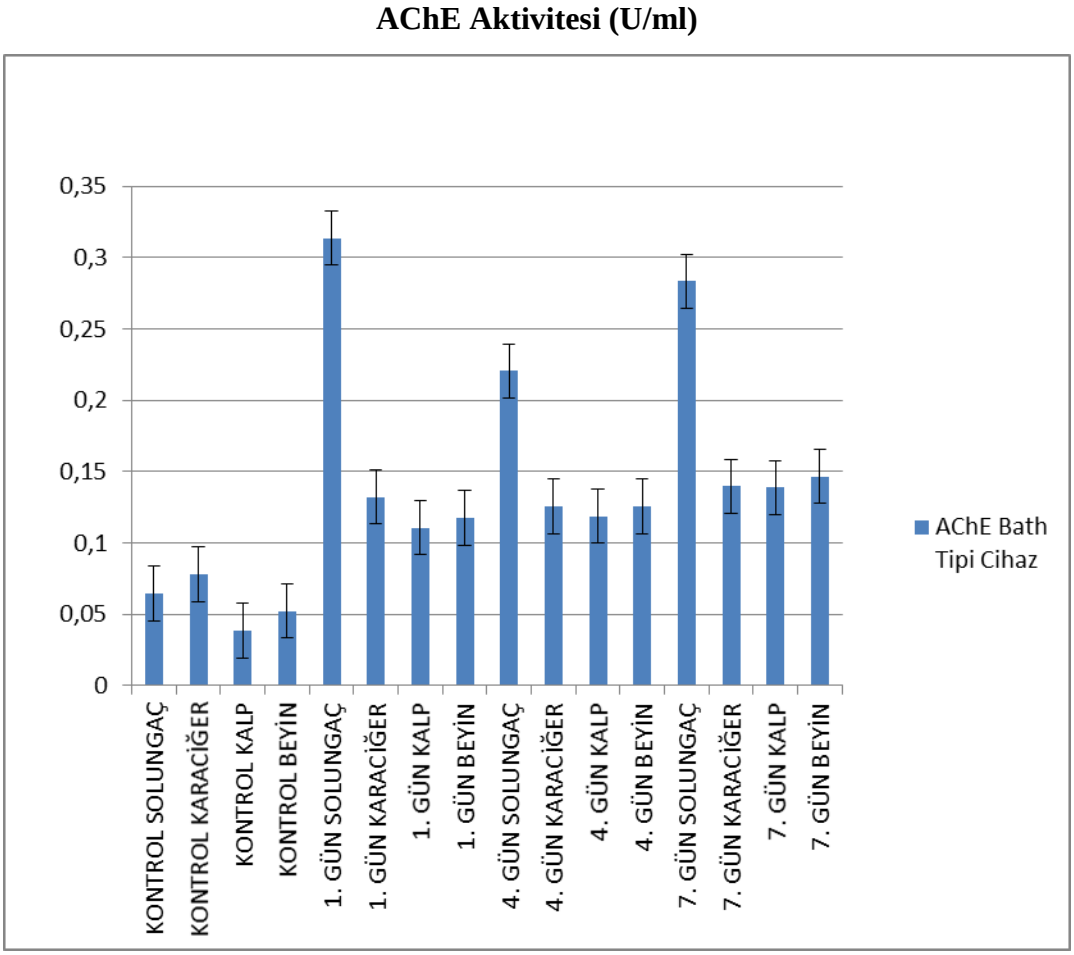
Horn tipi cihazla yapılan 1 saatlik uygulama sonucunda CAT enzim aktivitesine solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Kontrole göre solungaçlardaki enzim aktivitesi; 1.gün %36 azalmış, 4.gün %20 artmış ve 7.gün %21 azalmıştır. Kontrole göre karaciğerde enzim aktivitesi tüm günlerde yaklaşık oranlarda azalmıştır; 1.gün %48, 4.gün % 43 ve 7.gün %37 azalmıştır. Kontrole göre kalbe bakıldığında enzim aktivitesi; 1.gün %53, 4.gün %62 ve 7.gün %33 azalmıştır. Kontrole göre beyinde CAT enzim aktivitesi ise; 1.gün %46, 4.gün %45 ve 7.gün %54 oranında azalmıştır.



Şekil 3.12. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus'*un çeşitli dokularındaki CAT enzim aktivitesinin karşılaştırılması.

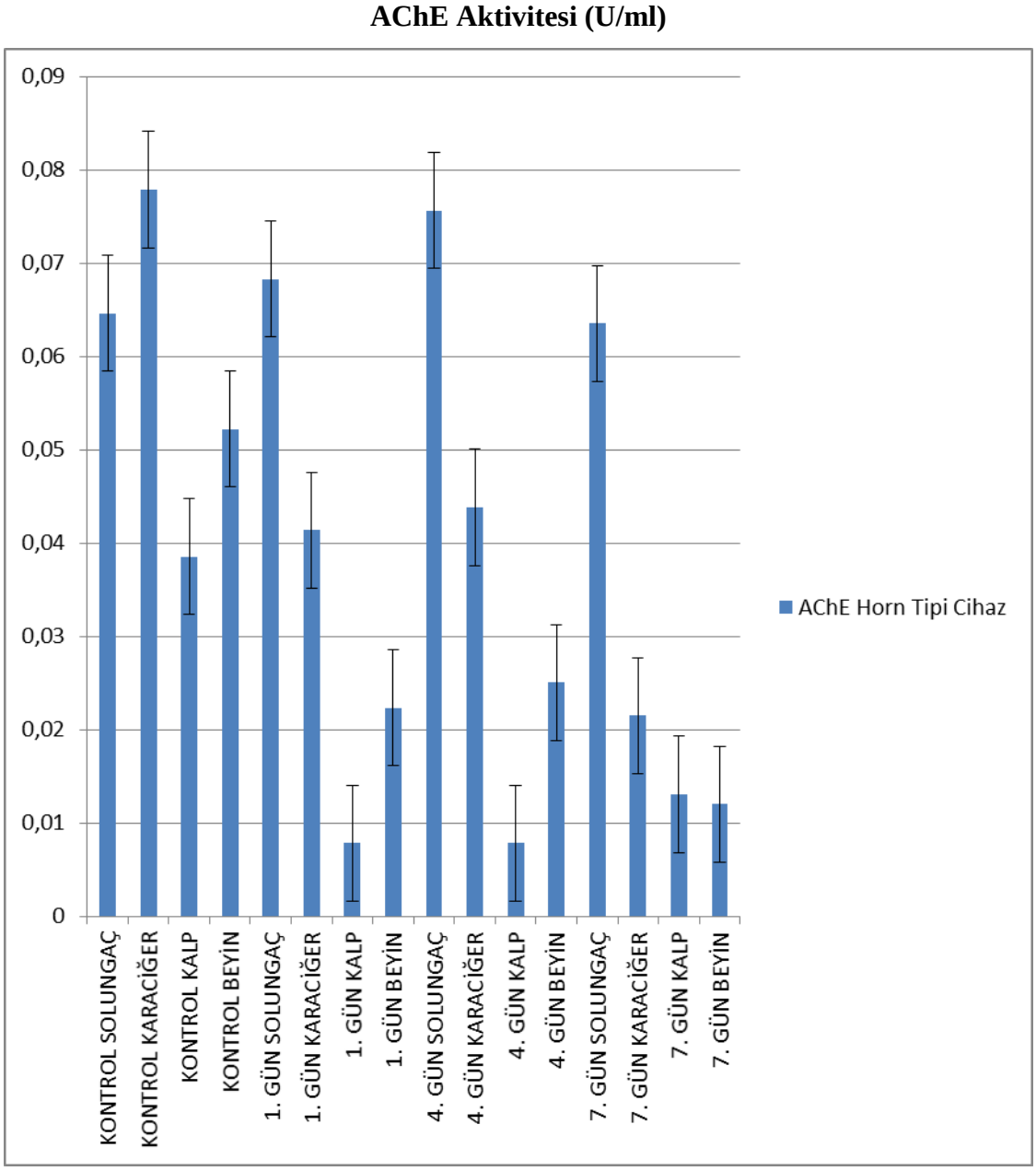
3.1.2.5. Dokularda AChE aktivitesi tayini

Ultrasesin *C.auratus* balıklarının çeşitli dokularındaki antioksidan sistemler üzerine etkisini belirlemek için AChE enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Çeşitli dokularda AChE tayini, Sığır Serum Albumini kullanılarak hazırlanan standart grafik üzerinden hesaplandı.



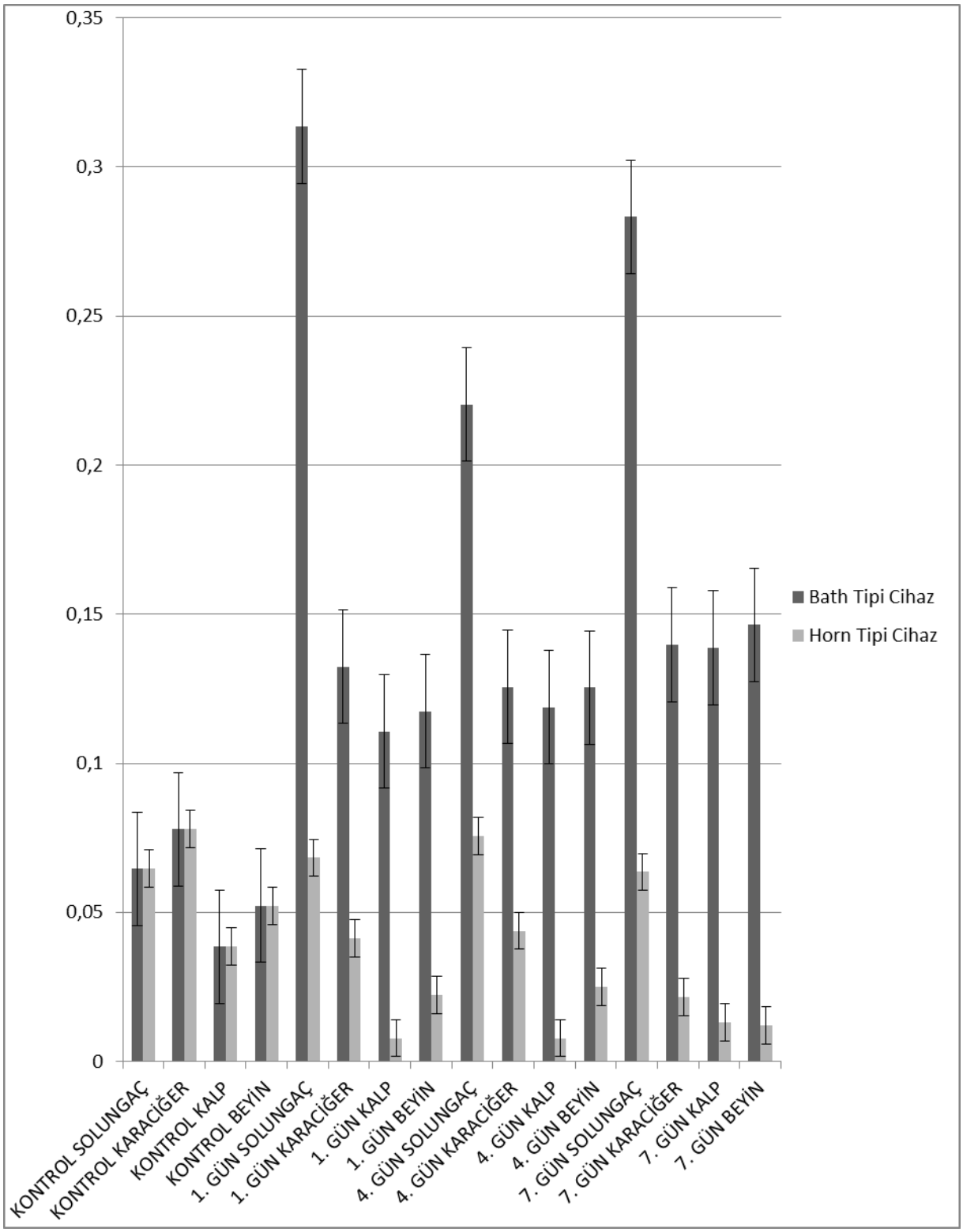
Şekil 3.13. Bath tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında AChE enzim aktivitesi tayini.

Bath tipi cihazla yapılan 10sn.'lik uygulama sonucunda AChE enzim aktivitesine solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Enzim aktivitesi kontrole göre solungaçlarda; 1.gün %385, 4.gün %241 ve 7.gün %338 oranında artmıştır. Kontrole göre karaciğerde AChE enzim aktivitesi; 1.gün %69, 4.gün %61 ve 7.gün %79 oranında artmıştır. Kontrol göre kalpte enzim aktivitesi; 1.gün %187, 4.gün %208 ve 7.gün %260 artış göstermiştir. Kontrole göre beyinde de; 1gün %125, 4.gün %140 ve 7.gün %180 artış meydana gelmiştir.



Şekil 3.14. Horn tipi cihazla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus*'un çeşitli dokularında AChE enzim aktivitesi tayini.

Horn tipi cihazla yapılan 1 saatlik uygulama sonucunda AChE enzim aktivitesine solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında bakılmıştır. Kontrole göre solungaçtaki enzim aktivitesinde; 1.gün %5 ve 4.günde %17 artış gözlenirken, 7.günde %2 azalma meydana gelmiştir. Kontrole göre karaciğerde enzim aktivitesi; 1.gün %47, 4.gün %44 ve 7.gün %72 oranında azalmıştır. Kontrole göre kalpte AChE enzim aktivitesi; 1.gün ve 4.gün %80, 7.günde ise %66 azalmıştır. Kontrole göre beyin AChE enzim aktivitesi; 1gün %57, 4.gün %52 ve 7.gün %77 azalmıştır.

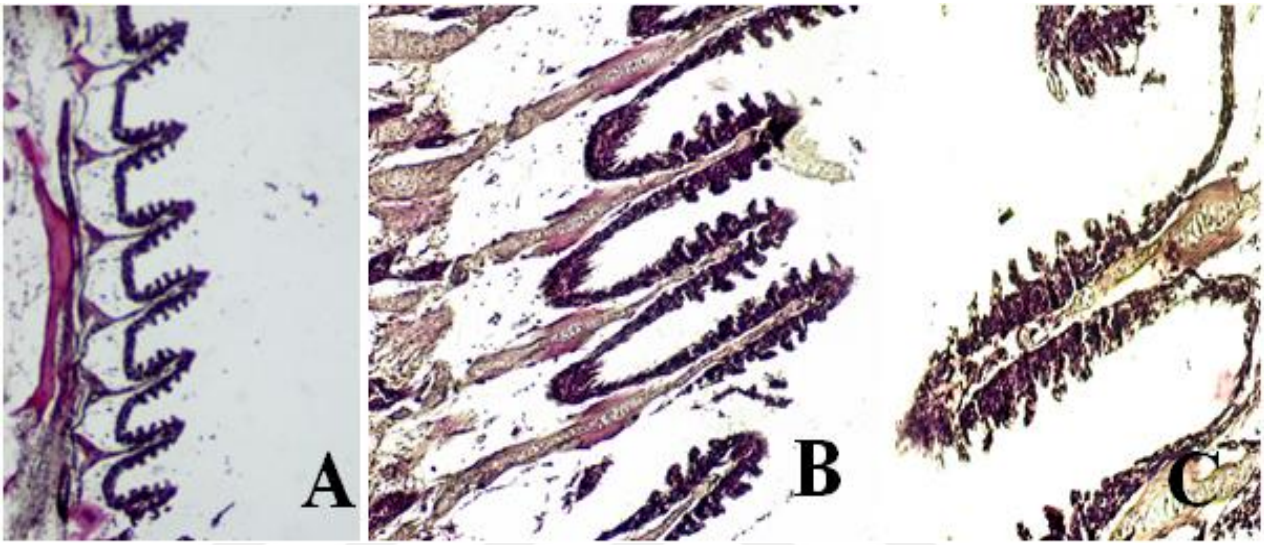


Şekil 3.15. Bath tipi - Horn tipi cihazlarla oluşturulan ultrases stresindeki *C.auratus'*un çeşitli dokularındaki AChE enzim aktivitesinin karşılaştırılması.

3.1.3. Histolojik bulgular

Histolojik çalışmalarda; horn tipi ve ya bath tipi cihaz ile ultrases uygulanmış *C. auratus* balıklarından alınan solungaçlar kullanılmıştır.

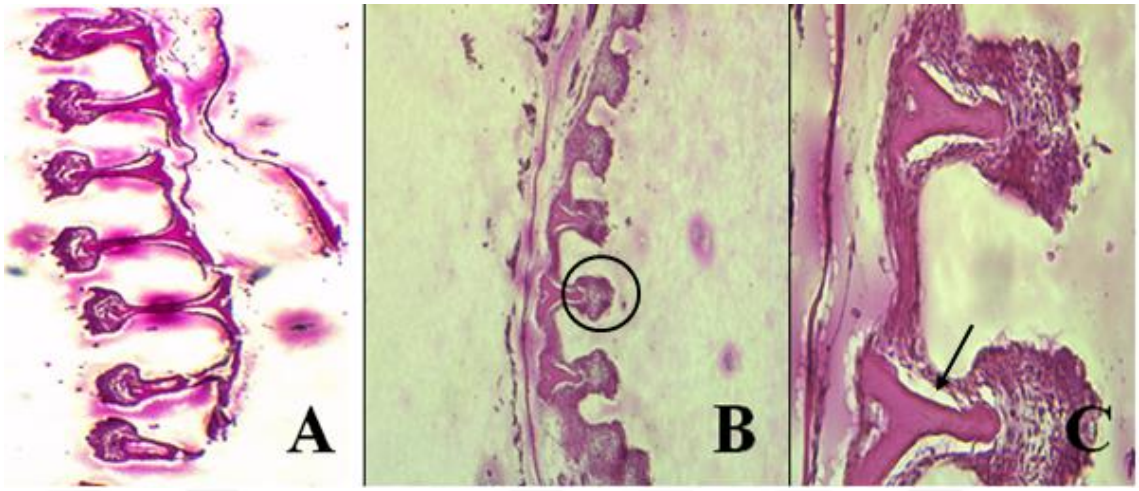
3.1.3.1. Kontrol grubu solungaç histolojisi



Şekil 3.16. Kontrol grubu solungaç yapısı. **A)** 4x; **B)** 20x; **C)** 40x (H&E)

C. auratus türü balıkların solungaç dokularına bakıldığında çeşitli yapılar görülür. Bu yarılar primer lamel ve sekonder lameller üzerine yerleşmişlerdir. Yapıyı oluşturan dokular bağ dokusu, kıkırdak doku; hücreler ise epitelyum, destek, mukus ve mitokondriyum zengin hücrelerdir. Bunların görüntülemesi H&E boyama ile yapılmış, fotoğraflar ise ışık mikroskobunda 4x, 10x, 20x ve 40x büyütmeler ile kaydedilmiştir.

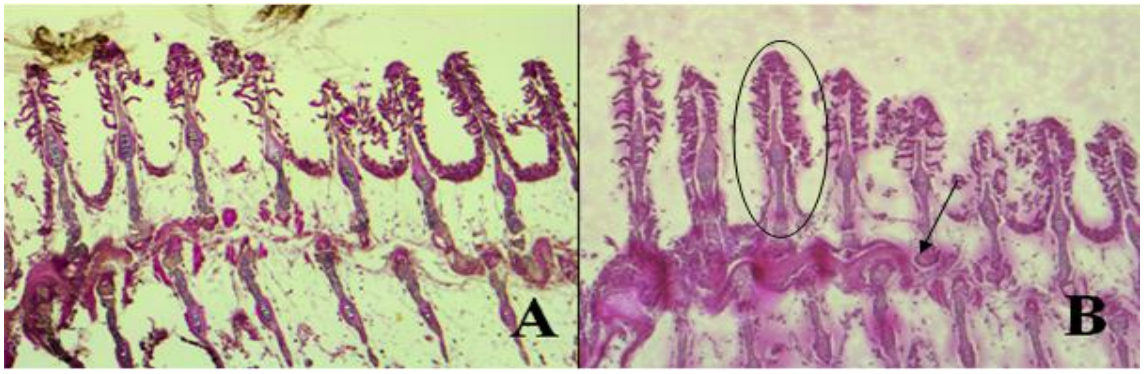
3.1.3.2. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 1. gün etkisi



Şekil 3.17. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 1. gün solungaç yapısı. **A)** 4x; **B)** 10x; **C)** 40x (H&E)

Bath tipi cihazla her gün yapılan 10 saniyelik uygulamanın sonrasında 1. gün örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda primer ve sekonder lamellerde anormallikler gözlenmiştir. Primer lamellerde ödem meydana gelirken (Şekil 3.17. C); sekonder lamellerde hiperplazi görülmüştür (Şekil 3.17. B). Destek hücrelerinde hipertrofi oluşmuş ve tüm bunlara ek olarak mukus hücreleri de zarar görmüştür.

3.1.3.3. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 4. gün etkisi

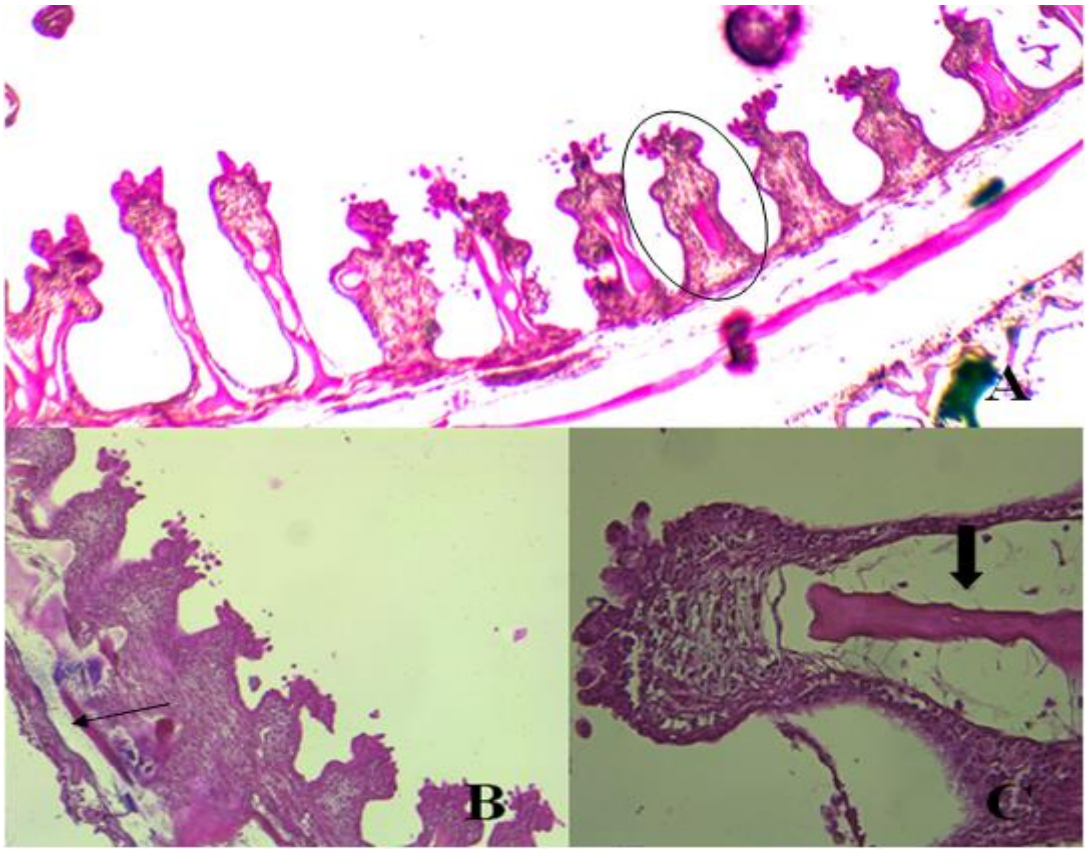


Şekil 3.18. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 4. gün solungaç yapısı. **A)** 10x; **B)** 10x (H&E)

Bath tipi cihazla her gün yapılan 10 saniyelik uygulamanın sonrasında 4. gün

örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda merkezi venada bozulmalar meydana geldiği kaydedilmiştir. Primer ve sekonder yapılarda bozulmalar oluştuğu saptanmıştır. Sekonder lamellerde hiperplazi ve destek hücrelerinde hipertrofi meydana gelmiştir (Şekil 3.18. B).

3.1.3.4. Bath tipi cihazın solungaç histolojisine 7. gün etkisi



Şekil 3.19. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış, 7. gün solungaç yapısı. **A)** 4x; **B)** 10x; **C)** 40x (H&E).

Bath tipi cihazla her gün yapılan 10 saniyelik uygulamanın sonrasında 4. gün örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda merkezi venada bozulmalar meydana geldiği kaydedilmiştir (Şekil 3.19. B). Primer ve sekonder yapılarda bozulmalar oluştuğu saptanmıştır. Primer lamelde kıkırdak yapısıyla epitel doku arasındaki boşluk artmıştır (Şekil 3.19. C). Sekonder lamellerde hiperplazi ve destek hücrelerinde hipertrofi meydana gelmiştir (Şekil 3.19. A). Bazı noktalarda ise primer ve sekonder lamel kaybolmaya başlamıştır.

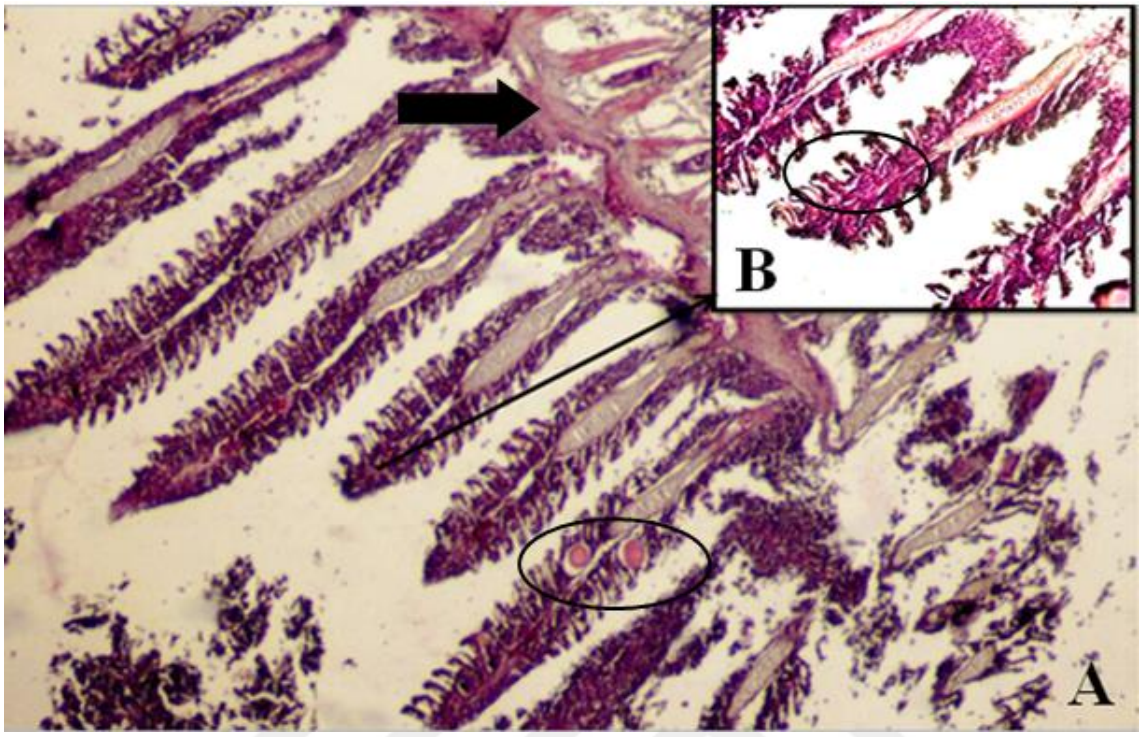
3.1.3.5. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 1. gün etkisi



Şekil 3.20. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 1. gün solungaç yapısı. **A)** 10x; **B)** 40x (H&E)

Horn tipi cihazla her gün yapılan 1 saatlik uygulamanın sonrasında 1. gün örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda sekonder lamellerin kalınlaşıp birbirlerine yaklaştığı (Şekil 3.20.B) ve hiperplazi meydana geldiği kaydedilmiştir. Aynı zamanda sekonder lamellerde ödem meydana gelmiştir (Şekil 3.20.A).

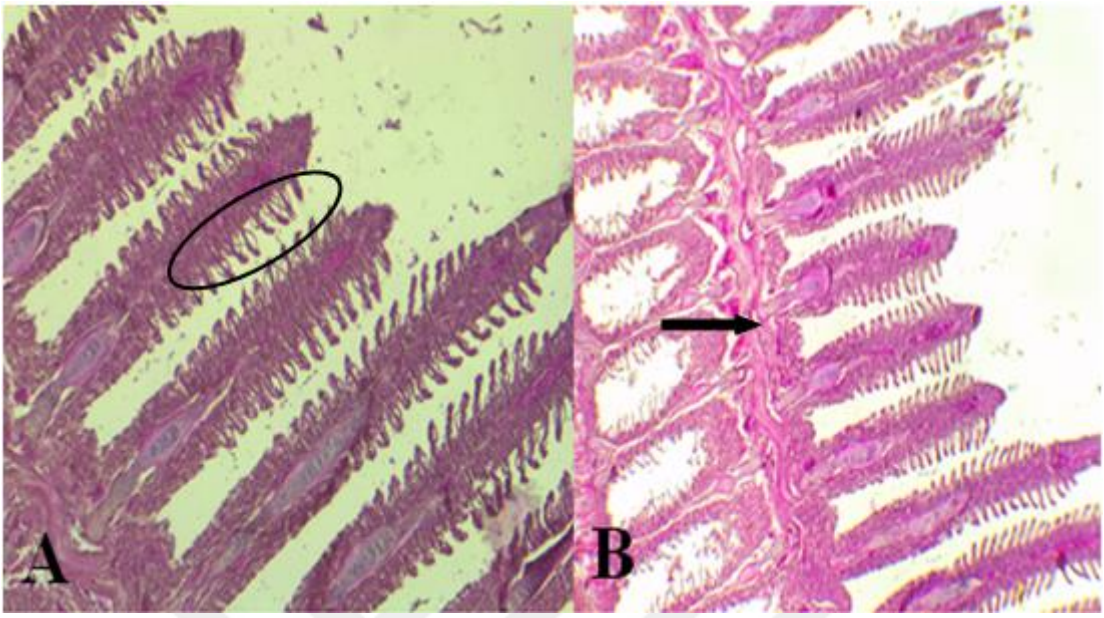
3.1.3.6. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 4. gün etkisi



Şekil 3.21. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 4. gün solungaç yapısı. **A)** 4x; **B)** 20x (H&E)

Horn tipi cihazla her gün yapılan 1 saatlik uygulamanın sonrasında 4. gün örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda lamellerde anevrizma meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 3.21.A). Sekonder lamellerde ödem meydana gelmiştir (Şekil 3.21.B). Merkezi vena ise daralmıştır (Şekil 3.21.A).

3.1.3.7. Horn tipi cihazın solungaç histolojisine 7. gün etkisi



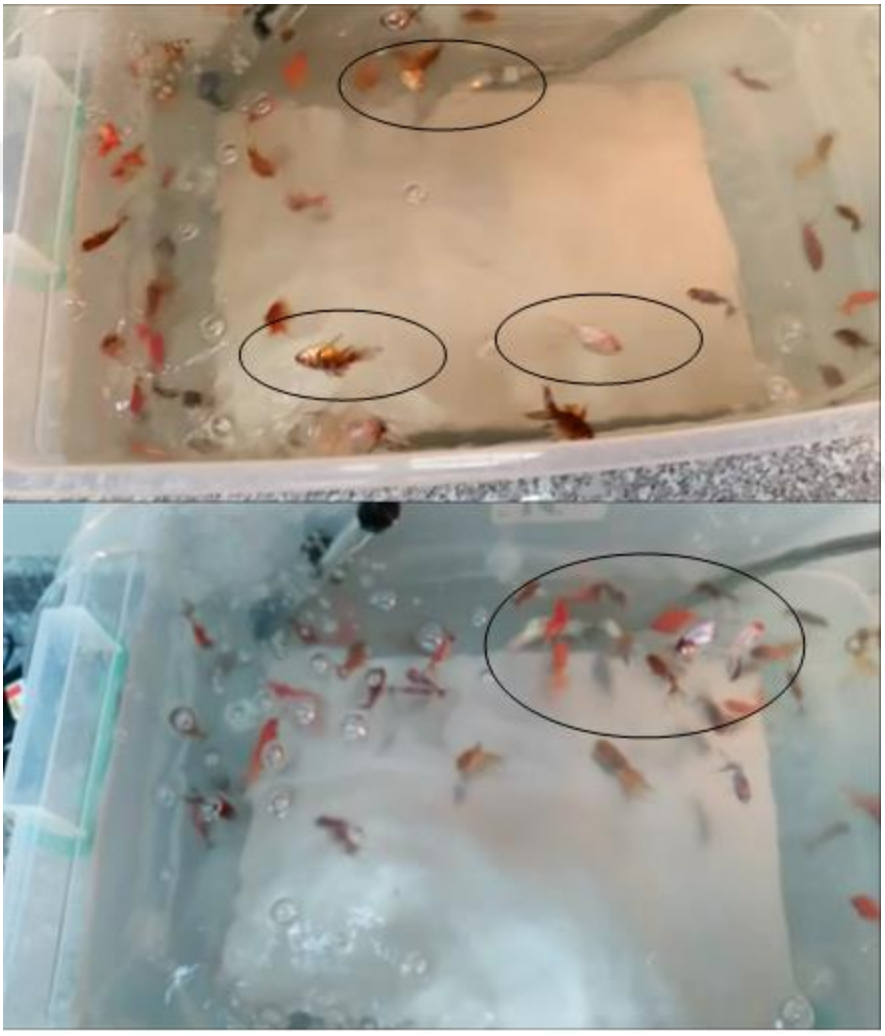
Şekil 3.22. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış, 7. gün solungaç yapısı. **A)** 10x; **B)** 4x (H&E)

Horn tipi cihazla her gün yapılan 1 saatlik uygulamanın sonrasında 7. gün örneklerinden alınan solungaçlar incelenmiştir. Bu incelemelerin sonucunda sekonder lamellerde ödem meydana geldiği ve bu lamellerin inceldiği saptanmıştır (Şekil 3.22.A). Bunlara ek olarak merkezi venada daralma gözlenmiştir (Şekil 3.22.B).

3.1.4. Davranış bulguları

3.1.4.1. Bath tipi cihazın davranış üzerine etkisi

Bath tipi cihazla her gün yapılan 10 sn.'lik uygulamanın ilk saniyelerinde aniden artan yüzme hızını takiben bayılma ve ters dönmüş abdomen gözlenmiştir. Bayılmanın ardından ise yüzmeyi durdurma, tepki vermeme; aradan zaman geçmesiyle birlikte de yüzme hızında yavaşlama gibi çeşitli davranışlar gözlenmiştir.



Şekil 3.23. Bath tipi cihazla ultrases uygulanmış *C. auratus* türü balıklar. Ters dönmüş abdomen, duran ve yavaşlayan yüzme.

3.1.4.2. Horn tipi cihazın davranış üzerine etkisi

Horn tipi cihazla her gün yapılan 1 saatlik uygulamanın sonrasında *C. auratus* türü balıklarda; yüzme hızını yavaşlatma, akvaryumun en alt veya en üst kısmında gruplar halinde durma, tepki vermeme gibi davranışlar gözlenmiştir.



Şekil 3.24. Horn tipi cihazla ultrases uygulanmış *C. auratus* türü balıklar. Dipte ve yüzeyde gruplar halinde sabit durmaktadır.

3.2. Tartışma

Antioksidan savunması, reaktif oksijen türlerine karşı olan savunmada oldukça önemlidir (Orbea ve ark., 2002). Normal şartlar altında antioksidanlar, hücre ve dokuları oksidatif stres sonucu oluşan yıkıma karşı korurlar. Oksidatif stres ilk olarak Sies tarafından 1985'te "Prooksidan ve antioksidanların arasındaki dengenin bozulması" olarak tanımlanmıştır (Sies, 1985). Bu tez çalışmasının sonuçlarında, ultrases tarafından indüklenen antioksidan savunması ve oksidatif stres oluşumu değerlendirilmiştir. Ultrases sonucunda çeşitli fizyolojik ve metabolik değişiklikler histolojik, biyokimyasal ve davranışsal olarak belirlenmiştir. Deneylerde ultrasonikasyon uygulama süresi cihazların vermiş olduğu güçler göz önüne alınarak balıkları öldürücü dozun altında olacak şekilde ayarlanmıştır. Uygulanan doz aynı zamanda alglerin belirtilen şartlar altında etkilenerek yapısal özelliklerinin bozulduğu ön çalışmalar ışığında belirlenmiştir.

Ultrasesin meydana getirdiği etkilerin belirlendiği çalışmalar genel olarak algler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak ultrasesin ortamda yaşayan bentik ve pelajik canlılar üzerine olan etkileri gözardı edilmiştir. Bu sebeple deneylerimizi karşılaştırabileceğimiz ultrasonik temizleme ile ilgili pelajik canlılardan balık dokularını içeren çalışmalara rastlanmamıştır. Yapılan tez çalışmasının ultrasonik ile yapılacak olan diğer çalışmalara referans olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde daha temiz ve ucuz olan arıtım yöntemi arayışında nano parçacıklar ilgi odağı olmuşlardır. Yarı iletken olan TiO_2 karalı bir yapıya sahip olması nedeniyle fotokatalitik alanda çok fazla tercih edilmektedir (Barbe ve ark., 1997). İyon ve nano parçacığın çözeltideki davranışları birbirinden farklıdır. Nano parçacıklar doğada oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunur, sucul ortamda genelde agregatlar halindedir ve canlı vücuduna alımı görece zordur. Bu yüzden insan yapımı nano parçacıkların doğal ortamlara ilavesi kaygı uyandırmaktadır. Yapılan bir çalışmada TiO_2 nano parçacıklarının gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), solunum güçlüğü ve subletal toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Lipit peroksidasyonunun arttığı; solungaç, karaciğer, bağırsak ve beyin dokularında hasar meydana geldiği belirlenmiştir (Federici ve ark., 2007). Bu çalışmaya benzer başka çalışmalarda da, araştırmacılar balıkların TiO_2'e maruz kalması sonucunda biyokimyasal ve histopatolojik olarak karaciğer, solungaç ve bağırsaklarda değişikliklerin meydana geldiğini belirtmişlerdir (Hao ve ark., 2009; Johnston ve ark., 2010; Palaniappan ve Pramod, 2010). Xiong ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, TiO_2 nano parçacıkları uygulanmış zebra balıklarında oluşan toksik etkinin, nano parçacık hücreye girmeden meydana geldiğini tespit etmişlerdir. TiO_2 nano parçacıklarının indüklediği oksidatif yıkım sonucu açığa çıkan hücre dışı hidroksil radikalleri, solungaç dokusunun hücre zarına zarar verdiği gözlenmiştir (Xiong ve ark., 2011). Aynı zamanda TiO_2 nano parçacıklarına maruz kalan zebra balığı beyin dokularında majör değişiklikler (proteinler, lipitler ve nükleik asitlerdeki değişiklikler) belirlenmiştir (Palaniappan ve Pramod, 2011) .

MDA, lipid peroksidasyon ile birlikte ortaya çıkan ara ürünlerden biridir. Dolayısıyla oksidatif hasarın varlığının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir parametredir. MDA miktarının yüksek bulunması lipid peroksidasyonun meydana geldiğini göstermektedir. Lipid peroksidasyonu meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması antioksidan enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir. Bu tez

çalışmasında iki ayrı cihazla ultrases uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamaların sonucu olarak, MDA miktarı horn tipi cihazda 7.gün kalpte en şiddetli artışı göstermiştir.

Perasetik asit ve hidrojen peroksit ile oluşturulan bir dezenfektanın uygulandığı *Oncorhynchus mykiss*'in solungaç, kalp ve karaciğer dokularında lipit peroksidasyonunun anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir (Tkachenko ve ark., 2014). Yapılan farklı bir çalışmada dezenfektan olarak kloramin-T kullanılmış; lipit peroksidasyonu ve protein türlerinin karbonil içeriğinde oksidatif stres kaynaklı bir farklılık oluşmadığı bulunmuştur (Tkachenko ve ark., 2015).

Glutatyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidant savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörüdür. Hücresel GSH miktarı hücresel işlevlerin korunmasında önemlidir ve detoksifikasyon ve oksidatif stres durumunda azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artmaktadır (Cheung ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005). Bu nedenle de GSH kirlilik boyutunun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Bu tez çalışmasında GSH miktarı; ultrases uygulanan cihazlardan bath tipi cihazda 7.gün beyin dokularında en büyük artışı gösterirken, horn tipi cihazda azalma kaydetmiştir. En belirgin azalma 1.gün solungaç dokularında ve 1.gün beyin dokularında gözlenmiştir.

2006 yılında yapılan bir çalışmada, perasetik asitin 2 saat boyunca hepatosit hücrelerine uygulanmasıyla birlikte GSH miktarının azalmasına; oksijen radikallerinin ise artmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışma 24 saate uzatıldığındaysa; GSH miktarının arttığı ancak reaktif oksijen radikalerinin sabit kaldığı belirtilmiştir (Marabini ve ark., 2006). Dezenfektan olarak perasetik asit ve hidrojen peroksitin birlikte kullanıldığı başka bir çalışmada *Oncorhynchus mykiss*'in karaciğer ve kalp dokularında glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda kas, karaciğer ve kalp dokularında CAT aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Tkachenko ve ark., 2015) .

Katalaz (CAT), savunma mekanizmasında yer alan önemli intrasellüler antioksidan enzimlerdendir ve oluşan H_2O_2 substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalayarak H_2O_2 detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardandır. Aşırı $O_2\cdot$ üretiminin CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliği ile CAT aktivitesini azaltabileceği

belirtilmiştir (Pandey ve ark., 2003). Bu tez çalışmasında ultrases iki ayrı cihazla oluşturulmuş ve etkileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler doğrultusunda; bath tipi cihazda 4.gün beyin dokusunda önemli bir artış meydana gelirken, CAT aktivitesi horn tipi cihazda 4.gün kalp dokusunda en çarpıcı azalmayı göstermiştir.

Perasetik asit ve hidrojen peroksit ile oluşturulan bir dezenfektanın uygulandığı *Oncorhynchus mykiss*'in kalp ve kas dokularında CAT enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (Tkachenko ve ark., 2014). Klordioksit ve formalin uygulanan bir çalışmada alabalık kalp dokusunda CAT enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak da oksidatif strese bağlı olarak artan H_2O_2 miktarı gösterilmiştir.

Sucul ortamda meydana gelen fiziksel, kimyasal veya biyolojik değişiklik; ortamda yaşayan canlıları da etkilemektedir. Balıklarda meydana gelen ilk ve en belirgin değişiklikler solungaç dokusunda ortaya çıkmaktadır. Solungaçlar çözünmüş oksijenin alındığı, dış ortamla bağlantıda olan bir dokudur. Bu çalışmada balıklara ultrases uygulanmasının ardından solungaçlarda; ödem, hiperplazi, hipertrofi, anevrizma gibi farklılıklar meydana gelmiştir.

Balıkların TiO_2 nano parçacığına maruz kalması sonucunda solungaç histolojisinde değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerden bazıları hücre zarının ve yapısının bozulması, epiteliyal hiperplazi, lamellar füzyon ve mukus hücrelerindeki morfolojik farklılaşmadır (Federici ve ark., 2007; Hao ve ark., 2009; Xiong ve ark., 2011; Chen ve ark., 2011). 2010 yılında yapılan bir araştırmada *Oryzias latipes* 48 saat boyunca gümüş nano parçacıklarına maruz bırakılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda gelişimsel, morfolojik ve histopatolojik değişiklikler (ödem oluşumu; omurga, kalp, beyin ve gözlerde anomaliler) gözlemlenmiştir (Wu ve ark., 2010).

4. SONUÇLAR

Ultrasese maruz kalan *C. auratus* türü balıklarda meydana gelen biyolojik ve biyokimyasal değişimler; oksidatif stres parametreleri, davranış parametreleri ve histolojik açıdan incelenmiştir. Bunun sonucunda ultrases uygulanan iki cihaz birbiriyle karşılaştırılmıştır. Balıklarda meydana gelen biyolojik değişikliklerin sebebinin cihazların ürettiği farklı özgül enerjilere bağlı olduğu tahmin edilmektedir.

Bulgularımızın sonucunda;

- Ultrases uygulamasının, *C.auratus* türü balıkların solungaç, karaciğer, kalp ve beyin dokularında meydana getirdiği oksidatif stres parametreleri belirlenmiştir. Bu parametreler sırasıyla; GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu, MDA miktarı, CAT ve AChE enzim aktiviteleridir.
- Bu bilgiler ışığında, benzer alanlarda çalışacak araştırmacılara yol göstermek hedeflerimizden biridir.
- Elde ettiğimiz bulgularda, ülkemizde ve yurt dışında uygulamaları görülen ultrases çalışmalarının sucul çevre arıtılması sırasında canlılarda stres oluşturabileceği gözlenmiştir. Ancak tartışmada yer alan yöntemler de dikkate alındığında, yapılacak tüm temizleme yöntemlerinde ortamda yaşayan canlılarda biyolojik, histolojik ve davranışsal çeşitli hasarlar meydana gelebildiği belirlenmiştir. Bu nedenle arıtma işlemleri sırasında ultrasonik ya da diğer yöntemler kullanıldığında hedef olmayan organizmaların olumsuz etkilenebileceği göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K. (2003) Increasing Intracellular cAMP and cGMP Inhibits Cadmium-Induced Oxidative Stress in Rat Submandibular Salivary Comparative. Biochemistry and Physiology ,135, 331-336.

Adams, M.S. (2002) Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, Bethesda, Mayland, 644.

Aebi, H. (1974) Catalase Invitro. In: Methods of Enzymatic Analysis, Ed: Bergmeyer HU, 2nd ed, FL, 121-126.

Ahn, C.Y., Park, M.H., Joung, S.H., Kim, H.S., Jang, K.Y., Oh, H.M. (2003) Growth Inhibition of Cyanobacteria by Ultrasonic Radiation: Laboratory and Enclosure Studies. Environmental Science and Technology, 37, 3031-3037.

Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H.E., Yön, N.D., Kayhan, F.E. (2014) Oxidative Stress Mechanisms Induced by Heavy Metals and Pesticides in Fish. Ege J Fish Aqua Sci, 31(3): 155-160. doi: 10.12714/egejfas.2014.31.3.07

Akkış, İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, Türkiye**.**

Al-Hamdani, S., Burnett, C., Durrant, G. (1998) Effect of Low-dose Ultrasonic Treatment on Spirulina maxima. Aquacultural Engineering, 19, 17-28.

Alpbaz, A. (1993) Akvaryum Tekniği ve Balıkları. Mas Ambalaj Sanayi ve Ticaret A.Ş. İzmir. 403.

Alpbaz, A. (2001) Akvaryum Balıkları Ansiklopedisi. Alp Yayımcılık. İzmir. 214.

Altınköprü, T. (1987) Renkli Akvaryum Dünyası, Güçlü Yayıncılık, İstanbul, 127.

Barr, D.B., Needham, L.L. (2002) Analytical Methods for Biological Monitoring of Exposure to Pesticides: A Review. Journal of Chromatagraphy B, 778: 5-29.

Bauer, M.J., Bayley, R., Chipps, M.J., Eades, A., Scriven, R.J., Rachwal, A.J. (1998) Enhanced Rapid Gravity Filtration and Dissolved Air Flotation for Pre-Treatment of River Thames Reservoir Water. Water Science and Technology, 37, 35-42.

Beijerinck, M.W. (1890) Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Botanische Zeitung, 47; 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.

Bernhardt, H. (1984) Treatment Disturbances With Water Out of Eutrophic Reservoirs as A Consequence of Algal Development. Water Supply, 2, SS4-7-SS4-15.

Beutler, E. (1975) Glutathione in Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. 2nd ed., Grune and Stratton, NY, 112-114.

Bracken, M.E.S., Helmut Hillebrand, S., Borer, E.T., Seabloom, E.W., Just Cebrian, J., Cleland, E.E., Elser, J.J., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Ngai J.T., Smith, J.E. (2015) Signatures of Nutrient Limitation and Co-Limitation: Responses of Autotroph Internal Nutrient Concentrations to Nitrogen and Phosphorus Additions. OIKOS 124 (2): 113-121. doi: 10.1111/oik.01215

Bradford, M.M. (1976) A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analitical Biochemistry, 72, 248-254.

Bruslé, J., Anadon G.G. (1996) The Structure and Function of Fish Liver, In: Fish Morphology: Horizon of New Research. A. A. Balkema Publishers, 305, USA.

Byrne, P.A., O'Halloran J. (2001) The Role of Bivalve MolluscsasT in Estuarine Sediment Toxicity Testing: A review. Hydrobiol. 465, 209-217.

Carmichael, W. (2013) The Water Environment: Algal Toxins and Health. Springer Science & Business Media.

Chen J, Dong X, Xin Y, Zhao M. (2011) Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. Aquat Toxicol, 101,493–9.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009) A HighT Nile Red Method for Quantitative Measurement of Neutral Lipids in Microalgae. Journal of Microbiological Methods, 77(1), 41-47.

Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S. (2001) Relationships Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels *Perna viridis*. Aquatic Toxicology, 52,

189-203.

Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., Wilson, A. E. (2013) Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems. Nature Education Knowledge, 4(4), 10.

Chua, S.Y., Latif ,P.A., Ibrahim, S., Rosli, N., Aziz, S. (2010) Effect of Ultrasonic Irradiation on COD and TSS in Raw Rubber Mill Effluent. Environment Asia, 3(special issue): 32-35.

Çakatay, U., Kayalı, R. (2004) Protein oksidasyonunun klinik önemi. Cerrah Paşa Tıp Derg. 35**,** 140-149.

Çaylak, E. (2006) Kurşun Asetat ile Oksidatif Stres Oluşturulmuş Sıçanların Çeşitli Dokuları Üzerine Bazı Kükürtlü Bileşiklerin Antioksidatif Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilimdalı, Elazığ.

Çelikkale, M.S. (1986) Balık Biyolojisi, Karadeniz Üniversitesi, Genel Yayın No.1, Trabzon, 387.

Çelikkale, M.S. (1986) Balık Biyolojisi, KTÜ, Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Y.O., Yayın No: 1, KTÜ Basımevi, Trabzon, 387.

Demir, N. (1996) İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi Yayınları Sayı: 3903, Fen Fakültesi No: 236. 160-166. ISBN: 975-404-391-4

Demirsoy, A. (1993) Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar/Anamniyota, Cilt III Kısım I, Meteksan A.Ş. Baskı Tesisleri, Ankara, 684.

Dodds, W.K., Welch, E.B. (2000) Establishing Nutrient Criteria in Streams. J. North Am. Benthological Soc., 19(1),186–196.

Ekingen, G. (1988) Balık sistematiği. Tolga Ofset, Elazığ, 225.

Ekingen, G. (2001) Balık anatomisi. Mersin Üniversitesi yayınları no:1, Su Ürünleri Fakültesi yayınları no: 1. 125-128. ISBN: 975-6900-03-2

Ekvall, M.K., Urrutia-Cordero, P., Hansson, L.A. (2014) Linking Cascading Effects Of Fish Predation And Zooplankton Grazing To Reduced Cyanobacterial Biomass And Toxin Levels Following Biomanipulation. PloS ONE, 9(11), e112956.

doi:10.1371/journal.pone.0112956

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andes, V., Featherstone, R.M. (1961) A New Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem Pharmacol, 7, 88-95.

Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D. (2007) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. Aquat Toxicol, 84(4), 415–30.

Ferkous, H., Hamdaoui, O., Merouani, S. (2015) Sonochemical Degradation of Naphthol Blue Black in Water: Effect of Operating Parameters. Ultrasonics Sonochemistry, 26: 40–47. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.03.013

Ferreira, J.G., Andersen, J.H., Borjac, A., Bricker, S.B., Camp, J., Cardoso da Silva, M., Garcése, E., Heiskanen, A.S., Humborg, C., Ignatiades, L., Lancelot, C., Menesguen, A., Tett, P., Hoepffner, N., Claussen, U. (2011) Overview of Eutrophication Indicators to Assess Environmental Status within the European Marine Strategy Framework Directive. Estuarine, Coastal and Shelf Science 93, 117-131. doi:10.1016/j.ecss.2011.03.014

Firth, P., Fisher, S. G. (2012). Global Climate Change and Freshwater Ecosystems. Springer Science & Business Media.

Fortin, N., Munoz-Ramos, V., Bird, D., Lévesque, B., Whyte, L. G., Greer, C. W. (2015) Toxic Cyanobacterial Bloom Triggers in Missisquoi Bay, Lake Champlain, as Determined by Next-Generation Sequencing and Quantitative PCR. Life, *5*(2), 1346-1380.

Francko, D.A., Taylor, S.R., Thomas, B.J., McIntosh, D. (1990) Effect of Low-dose Ultrasonic Treatment on Physiological Variables in *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum*. Biotechnology Letters, 12, 219-224.

Fridovich, I. (2001) Oxidative Stres. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.

Gkelis, S., Papadimitriou, T., Zaoutsos, N., Leonardos, I. (2014) Anthropogenic and Climate-Induced Change Favors Toxic Cyanobacteria Blooms: Evidence from Monitoring a Highly Eutrophic, Urban Mediterranean Lake. Harmful Algae 39, 322–

333. doi:10.1016/j.hal.2014.09.002

González-García, J., Sáez, V., Tudela, I., Díez-Garcia, M.I., Esclapez, M.D., Louisnard, O. (2010) Sonochemical Treatment of Water Polluted by Chlorinated Organocompounds. Water, 2, 28-74. doi:10.3390/w2010028

Guzman, H.R., McNamara, A.J., Nguyen, D.X., Prausnitz, M.R. (2003) Bioeffects Caused by Changes in Acoustic Cavitation Bubble Density and Cell Concentration: A Unified Explanation Based On Cell-To-Bubble Ratio and Blast Radius. Ultrasound in medicine and biology, 29(8), 1211-1222.

Güler, Ç., Akın, L. (2006) Halk Sağlığı Temel Bilgiler, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. (1997) Su Kalitesi. Çevre Sağlığı Temel Kaynaklar Dizisi, No:43, Birinci Baskı, Ankara.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine., 36-245, Oxford Universty Press, London.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. 4th Edition, Clarendon Press, Oxford, UK.

Hao, H., Wu, M., Chen, Y., Tang, J., Wu, Q. (2004a) Cavitation Mechanism in Cyanobacterial Growth Inhibition by Ultrasonic Irradiation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 33, 151-156.

Hao, H., Wu, M., Chen, Y., Tang, J., Wu, Q. (2004b) Cyanobacterial Bloom Control by Ultrasonic Irradiation at 20 kHz and 1.7 MHz. Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 39, 1435-1446.

Hao, L., Wang, Z., Xing, B. (2009) Effect of sub-acute exposure to TiO2 nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). J Environ Sci, 21(10), 1459–66.

Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K. (2003) Influence of Malathion Pretreatment on the Toxicity of Anilofos in Male Rats: A Biochemical Interaction Study. Toxicology, 185: 1-8.

Hekimoğlu, M.A. (2008) Akvaryum Teknolojisi, E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi, 465. ISBN:978-975-483-798-8.

Hilton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T. (2001) Toxic Responses of the Liver. In: Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Taylor & Francis, 1: 224-268, London.

Hinton, D.E., Couch, J.A. (1984) Pathological Measures of Marine Pollution Effects. In: Concepts in Marine Pollution Measurements, White, H. (Ed), University of Maryland, Sea Grant College, College Park, 7-32.

http://mstimm-asbiology.blogspot.com.tr/2013/02/structure-of-fish-gills.html

http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil360/grayson17apr12/1-fish%20heart.jpg

Hu, H.Y., Men, Y.J., Li, F.M. (2006) Review on Inhibition of Plant Allelopathy of Algae Reproduction. Ecology and Environment, 15(1), 153–157.

Hu, M., Wu, F., Yuan, M., Liu, Q., Wang, Y. (2016) Combined Effects of Toxic Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and Hypoxia on the Physiological Responses of Triangle Sail Mussel Hyriopsis cumingii. Journal of hazardous materials, *306*, 24-33.

Hutson, R.A. (1987) Algal Interference with Water Treatment Processes. Progress in Phycological Research, 5, 265-299.

Inman, D. (2004) The use of ultrasound in the treatment of algae. Master Thesis, Cranfield University.

Izaguirre, G., Hwang, C.J., Krasner, S.W., McGuire, M.J. (1982) Geosmin and 2-methylisoborneol from Cyanobacteria in Three Water Supply Systems. Applied and Environmental Microbiology, 43, 708-714.

Johnson, D., Farley, M.R., Youngman, R.E., Yadav, N.P., West, J.T. (1977) Removal of Algae by Various Unit Processes. Swindon, UK, Water Research Centre.

Johnston, B.D., Scown, T.M., Moger, J., Cumberland, S.A., Baalousha, M., Linge, K. (2010) Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO, CeO2, and ZnO to fish. Environ Sci Technol, 44,1144–51.

Jong Lee, T., Nakano, K., Matsumura, M. (2000) A New Method for the Rapid Evaluation of Gas Vacuoles Regeneration and Viability of Cyanobacteria by Flow Cytometry. Biotechnology Letters, 22, 1833-1838.

Kane, A.S., Salierno, J.D., Brewer, S.K. (2005) Fish Models in Behavioral Toxicology: Automated Techniques, Updates and Perspectives. Methods in aquatic Lewis Publishers, Boca Raton, FL., 32 (2), 559-590.

Kayhan, F.E., Kaymak, G., Tartar, Ş., Akbulut, C., Esmer, H.E., Yön Ertuğ, N.D. (2015) Küresel Isınmanın Balıklar ve Deniz Ekosistemleri Üzerine Etkileri, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(3), 1-7.

Kaymak, G. (2011) Farklı Dozlarda Deltametrin ve Kadmiyum Uygulanan Kılıçkuyruk (*Xiphophorus hellerii*) Balıklarında Oluşan Oksidatif Stres Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Çevre Bilimleri A.B.D, İstanbul, Türkiye.

Kaymak, G., Akbulut, C., Esmer, H.E., Kayhan, F.E., Yön, N.D. (2014) Sucul Organizmalarda Çevresel Şartlara Karşı Geliştirilen Oksidatif Stres Mekanizmaları ve Adaptif Yanıtlar. Marmara Fen Bilimleri Dergisi 4, 154-169. doi: 10.7240/mufbed.42520

Keffer, J.E., Kleinheinz, G.K. (2002) Use of *Chlorella vulgaris* for CO_2 Mitigation in a Photobioreactor. Journal of Microbiology & Biotechnology, 29(5), 275-280. doi: 10.1038/sj.jim.7000313

Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D. (1998) Oxidative Stres in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. Environmental Health Perspectives, 106:1-24.

Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A. (2000) The use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flexus*) Muscle as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. Marine Pollution Bulletin, 40: 780-791.

Klaassen, C.D. (2001) Cassarett and Doull's Toxicology. The McGraw-Hill Compaines, Inc., United States of America, 1236.

Kuhl, A., Lorenzen, H. (1964) Handling and culturing of *Chlorella*. In: Preston, D.M. (ed.): Methods of cell physiology, Vol. 1: p. 159-187, Academic Press, London.

Laborde, J.L. (1998) Acoustic Cavitation Field Prediction at Low and High Frequency Ultrasounds. Ultrason Sonochem, 36: 581-587.

Laming, P.R. (1981) Brain Mechanisms of Behavior in Lower Vertebrates. Cambridge:

Cambridge University Press.

Ledwozyw, A., Michalak, D., Stepien, A., Kadziolka, A. (1986) The Relationship Between Plasma Triglycerides, Cholesterol, Total Lipids and Lipid Peroxidation Products During Human Atherosclerosis. Clin Chim Acta, 155(3), 275-283.

Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y, Oh, H.M. (2010) Comparison of Several Methods for Effective Lipid Extraction from Microalgae. Bioresource Technology, 101(1), 75-77.

Lee, T.J., Nakano, K., Matsumara, M. (2001) Ultrasonic Irradiation for Blue-green Algae Bloom Control. Environmental Technology, 22, 383-390.

Lee, T.J., Nakano, K., Matsumura, M. (2002) A Novel Strategy for Cyanobacterial Bloom Control by Ultrasonic Irradiation. Water Science and Technology, 46, 207-215.

Lewis, W.M., Wurtsbaugh, W.A., Paerl, H.W. (2011) Rationale for Control of Anthropogenic Nitrogen and Phosphorus to Reduce Eutrophication of Inland Waters. Environ Sci Technol.; 45(24),10300-5. doi: 10.1021/es202401p.

Li, P., Song, Y., Yu, S., Park, H.D. (2015) The Effect of Hydrodynamic Cavitation on *Microcystis aeruginosa*: Physical and Chemical Factors. Chemosphere, 136, 245-251.

Lifka, J., Ondruschka, B., Hofmann, J. (2003) The Use of Ultrasound for the Degradation of Pollutants in Water: Aquasonolysis – A Review .Eng. Life Sci., 3 (6), 253–262.

Little, E., Brewer, S.K. (2001) Neurobehavioural Toxicity in Fish. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts New Perspectives. Toxicology and the Environment. Taylor and Francis, London and NewYork. 139-174.

Livingstone, D.R. (1991) Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertabretes. Advances in Comparative and Environmental Physiology, 7, 46-162, Germany.

Lledias, F., Rangel, P., Hansbergt, W. (1998) Oxidation of Catalase by Singlet Oxygen. The Journal of Biological Chemistry, 273, 10630-10637.

Luna, L.G. (1968) Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York.

Luo, J., Fang, Z., Smith, R.L. (2014) Ultrasound-Enhanced Conversion of Biomass to

Biofuels. Progress in Energy and Combustion Science, 41, 56-93.

Marabini L., Frigerio S., Chiesara E., Radice S. (2006) Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. Water Res., 40, 267-272.

Mason, T., Paniwnyk, L., Chemat, F., (2003) Ultrasound as a Preservation Technology. In: Food Preservation Techniques. Wood Head Publishers, Cambridge, UK, 303–337. doi: 10.1533/9781855737143.3.303.

Mata, T., Martins, A., Caetano, N. (2010) Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, 217-232.

Meister, A., Anderson, M.E. (1983) Glutathione. Annual Review of Biochemistry, 52,711-760.

Merouani, S., Ferkous, H., Hamdaoui, O., Rezgui, Y., Guemini, M. (2015a) A Method for Predicting the Number of Active Bubbles in Sonochemical Reactors. Ultrasonics Sonochemistry, 22, 51–58. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.07.015

Merouani, S., Hamdaoui, O., Rezgui, Y., Guemini, M. (2015b) Sensitivity of Free Radicals Production in Acoustically Driven Bubble to the Ultrasonic Frequency and Nature of Dissolved Gases. Ultrasonics Sonochemistry, 22, 41–50. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.07.011

Mertlich, R. (1987) Exotic Goldfish T.F.H., Canada, 123.

Morbidelli, A., Chambers, J., Lunine, J.I., Petit, J.M., Robert, F., Valsecchi, G.B., Cyr, K. E. (2000) Source Regions and Timescales for the Delivery of Water to the Earth. Meteoritics & Planetary Science, 35(6), 1309-1320.

Moss, B. (2010) Ecology of Fresh Waters: A View for the Twenty-First Century. John Wiley & Sons.

Nakano, K., Lee Jong, T., Matsumura, M. (2001) In Situ Algal Bloom Control by the Integration of Ultrasonic Radiation and Jet Circulation to Flushing. Environmental Science and Technology, 35, 4941-4946.

Nordberg, J., Arner, E.S.J. (2001) Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology and Medicine, 31(11), 1287-

1317

Nyakairu, G.W.A., Nagawa, C.B., Mbabazi, J. (2010) Assessment of Cyanobacteria Toxins in Freshwater Fish: A Case Study of Murchison Bay (Lake Victoria) and Lake Mburo, Uganda. Toxicon, *55*(5), 939-946.

Nyborg, W.L. (1982). Ultrasonic Microstreaming and Related Phenomena. British Journal of Cancer, 45, 156-160

Nyborg, W.L. (2001) Biological Effects of Ultrasound: Development of Safety Guidelines. Part II: General Review. Ultrasound in Medicine and Biology, 27(3), 301-333.

Olson, K.R., Farrell, A.P. (2006) The Cardiovascular System. The Physiology of Fishes. CRC press, 119-152, USA.

Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Sole, M., Porte, C., Cajaraville, M.P. (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish form the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquatic Toxicology, 58, 75–98.

Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Üner, N. (2004) Tissue-Spesific Oxidative Stres Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. Comparative Biochemistry and Physiology, 137, 43-51.

Ören, P. (2009) Malathion'un *Oreochromis niloticus*'ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Adana.

Özden, S. (2006) Bazı Pestisitlerin Oksidatif Stres Oluşturma Potansiyellerinin ve Antioksidan Sistemler Üzerine Etkilerinin Sıçanlarda Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji A.B.D, İstanbul, Türkiye .

Özen, A.S., Korkmaz, Ö. (2005) Yedigöller (Kütahya) Ekosisteminde Biyolojik Çeşitlilik ve Kirlilik Üzerine Bir Araştırma. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, (9), 15-26.

Palaniappan, P.L.R.M., Pramod, K.S. (2010) FTIR study of the effect of nTiO2 on the

biochemical constituents of gill tissues of zebrafish (*Danio rerio*). Food Chem Toxicol , 48(8–9), 2337–43.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez Raisuddin, S. (2003) Biomarkers of Oxidative Stress: A Comparative Study of River Yamuna Fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). The Science of The Total Environment, 309 105-115.

Paniwnyk, L., Larpparisudthi, O., Mason, T.J. (2010) Degradation of Water Pollutants Using Ultrasound. Proceedings of 20th International Congress on Acoustics, ICA 2010 23-27 August , Sydney, Australia.

Patil, M.N., Pandit, A.B. (2007) Cavitation - A Novel Technique for Making Stable Nanosuspensions. Ultrasonics Sonochemistry, 14: 519-530.

Piner, P. (2009) Lambda-Cyhalothrinin *Oreochromis niloticus*'ta Karaciğerde Piperonil Bütoksit Modülatörlüğünde Oksidatif Stres Potansiyelinin Belirlenmesi Stres Proteinleri ve Apoptozis Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Adana.

Pollet, B.G. (2014) Let's Not Ignore the Ultrasonic Effects on the Preparation of Fuel Cell Materials. Electrocatalysis, 5:330–34. doi:10.1007/s12678-014-0211-4

Pullar, J.M.; Winterbourn, C.C.; Vissers, M.C. (1999) Loss of GSH and Thiol Enzymes in Endothelial Cells Exposed to Sublethal Concentrations of Hypochlorous Acid. American Journal of Physiology, 277(4Pt2), H1505-1512.

Purcell, D., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2013) The Influence of Ultrasound Frequency and Power, on the Algal Species *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Scenedesmus subspicatus* and *Melosira sp*., Environmental Technology, 34:17, 2477-2490. doi: 10.1080/09593330.2013.773355

Richmond, A. (2004) Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd., 4.

Rivas, D.F., Prosperetti, A., Zijlstra, A.G., Lohse, D., Gardeniers, J.G.E. (2010) Efficient Sonochemistry through Microbubbles Generated with Micromachined Surfaces. Angewandte Chemie International Edition, 49: 9699 - 9701. doi: 10.1002/anie.201005533.

Salacinska, K., El Serafy, G.Y., Los, F.J., Blauw, A. (2010) Sensitivity Analysis of the Two Dimensional Application of the Generic Ecological Model (GEM) to Algal Bloom Prediction in the North Sea. Ecological Modelling, *221*(2), 178-190.

Sampat, P. (2001) Yer Altı Sularının Kirlenmesi, Dünyanın Durumu 2001, TEMA Yayını, No:35, İstanbul.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E. (2003) Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. Ecotoxicol Environ Saf. 56, 434-441 .

Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. R., van Nes, E. H. (1997) On the Dominance of Filamentous Cyanobacteria in Shallow, Turbid Lakes. Ecology, 78(1), 272-282.

Schindler, D.W., Hecky, R.E., Findlay, D.L., Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G., Lyng, M., Kasian, S.E.M. (2008) Eutrophication of Lakes Cannot Be Controlled by Reducing Nitrogen Input: Results of a 37-Year Whole-Ecosystem Experiment. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105 (32), 11254-11258.

Schowanek, D., McAvoy, D., Versteeg, D., Hanstveit, A. (1996) Effects of Nutrient Trace Metal Speciation on Algal Growth in The Presence of the Chelator [S, S]-EDDS. Aquatic Toxicology 36, 253e275.

Scott, G.R., Sloman, K.A. (2004) The Effects of Environmental Pollutants on Complex Fish Behaviour: Integrating Behavioural and Physiological Indicators of Toxicity. Aquatic Toxicology, 68, 369–392.

Sen, C.K. (1997) Nutritional Biochemistry of Cellular Glutathione. Nutritional Biochemistry, 8: 660-662.

Sen, C.K., Packer, L. (2000). Thiol Homeostasis and Supplements in Physical Exercise. American Journal of Clinical Nutrition, 72: 653-669.

Sies, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (ed) Oxidative Stress. Academic Press, London, 1–8.

Stahl, W., Sies, H. (2002) Introduction: Reactive oxygen species. Res. Monogr., 1-2.

Starritt, H.C., Duck, F.A., Humphrey, V.F. (1989) An Experimental Investigation of

Streaming in Pulsed İagnostic Ultrasound Beams. Ultrasound in Medicine and Biology, 15(4): 363–373.

Suslick, K. (1988) Ultrasound: It's Chemical, Physical, and Biological Effects, VCH publishers New York, USA.

Suslick, K.S. (1989) The Chemical Effects of Ultrasound. Sci. Am., 260 (2): 80–86.

Tang, J., Wu, Q., Hao, H., Chen, Y., Wu, M. (2003) Growth Inhibition of the Cyanobacterium *Spirulina* (*arthrospira*) *platensis* by 1.7 MHz Ultrasonic Irradiation. Journal of Applied Phycology, 15, 37-43.

Tang, J.W., Wu, Q.Y., Hao, H.W., Chen, Y., Wu, M. (2004) Effect of 1.7 MHz Ultrasound on a Gas Vacuolate Cyanobacterium and a Gas-Vacuole Negative Cyanobacterium. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 36, 115-121.

Temli, G. (2013) Farklı Fotobiyoreaktörlerin *Chlorella vulgaris*'in Büyümesine Etkisinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Tian, F., Ida, S. (2015) Water Contents of Earth-Mass Planets around M Dwarfs. Nature Geoscience, 8(3), 177-180.

Timoshkin, O.A., Samsonov, D.P., Yamamuro, M., Moore, M.V., Belykh, O.I., Malnik, V.V., Sakirko, M.V., Shirokaya, A.A., Bondarenko, N.A., Domysheva, V.M., Kochetkov, A.I., Kuzmin, A.V., Lukhnev, A.G., Medvezhonkova, O.V., Nepokrytykh, A.V., Pasynkova, E.M., Poberezhnaya, A.E., Potapskaya, N.V., Rozhkova, N.A., Sheveleva, N.G., Tikhonova, I.V., Timoshkina, E.M., Tomberg, I.V., Volkova, E.A., Zaitseva, E.P., Zvereva, Yu.M., Kupchinsky, A.B., Bukshuk, N.A. (2016) Rapid Ecological Change ın The Coastal Zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the Site of the World's Greatest Freshwater Biodiversity in Danger?. Journal of Great Lakes Research. doi:10.1016/j.jglr.2016.02.011

Tkachenko, H., Kurhaluk, N., Grudniewska, J. (2014) – Oxidative stress biomarkers in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Disinfectant-CIP formulated with peracetic acid and hydrogen peroxide – Arch. Pol. Fish. 22: 207-219. DOI 10.2478/aopf-2014-0021

Tkachenko, H., Kurhaluk, N., Grudniewska, J. (2015) Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defences as indicators of different disinfectants exposure in the heart of

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Research, 46, 679–689 doi:10.1111/are.12214

Travacio, M., Polo, J.M., Llesuy, S. (2000) Chromium (VI) Induces Oxidative Stress in the Mouse Brain. Toxicology, 150: 137-146.

Turner, A.M., Chislock, M.F. (2010) Blinded by the Stink: Nutrient Enrichment Impairs the Perception of Predation Risk by Freshwater Snails. Ecological Applications, 20(8), 2089-2095.

Uemura, Y., Sasaki, K., Minami, K., Sato, T., Choi, P. K., & Takeuchi, S. (2015) Observation of Cavitation Bubbles and Acoustic Streaming in High Intensity Ultrasound Fields. Japanese Journal of Applied Physics, 54(7S1), 07HB05.

van den Hoek , C., Mann, D., Jahns, H.M. (1995a) Chlorophyta (Green Algae). Algae: An Introduction to Phycology . Cambridge, Cambridge University Press, 300-330.

van den Hoek, C., Mann, D., Jahns, H.M. (1995b) Heterokontophyta:Class Bacillariophyceae. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge, Cambridge University Press, 113-152.

Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003) Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13, 57-149.

Walsby, A.E. (1992) The Control of Gas-vacuolate Cyanobacteria. Eutrophication: Research and Application to Water Supply. Ambleside, Freshwater Biological Association, 150-162.

Wang, Y.C., Lu, K.H. (2004) The Harmof Cyanobacterial Blooms and Governance. Chinese Journal of Fisheries, 17(1), 90–93.

Warnock, D.S. (2005) The Ultrasonic Irradiation of Algae. Master Thesis, Cranfield University.

Wetzel, R.G. (2001) Limnology: Lake and River Ecosystems, 3rd ed. San Diego, Academic Press.

Widjaja, A., Chien, C.C., Ju, Y.H. (2009) Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical

Engineers, 40(1): p. 13-20

Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. (2004) Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. Crit Rev Food Sci Nutr, 44, 275-295.

Wilson, I.B., Nachmansohhn, D. (1954) In Ion Transport Across Membranes. Acedemic Pres Inc., New York, 35.

Wood, C.M. (2001) Toxic Responses of the Gill. Organs. In: Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Taylor & Francis, 1: 1-89, London.

Wu, X. (2010) The Effects of Ultrasonic Treatment on Cyanobacteria in Surface Waters. PhD Thesis. Coventry University, Coventry.

Wu, Y., Zhoua, Q., Li, H., Liu, W., Wanga, T., Jiang, G., (2010) Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. Aquatic Toxicology, 100(2),160–167.

www.solidgoldfish.com

Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W. (2011) Effects of nano-scale TiO_2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. Sci Total Environ, 409:1444–52.

Xu, F.L. (1997) Exergy and structural exergy as ecological indicators for the development state of the Lake Chaohu ecosystem. Ecological Modelling, 99(1), 41–49.

Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K., Huang, J.C., Wang, L.H., Wu, S.H., Hou, L.A., Ma, H., Tsai, L.Y. (2005) Superoxide Anion Radical, Lipid Peroxides and Antioxidant Status in the Blood of Patients with Breast Cancer. Clin. Chim. Acta., 25:175-181.

Yemişen, E. (2008) Termal Deri Yanığında Silmarinin Karaciğer Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya A.B.D., İstanbul, Türkiye.

Yi, C., Guo, L., Ni, L., Luo, C. (2016) Silver Carp Exhibited An Enhanced Ability of Biomanipulation to Control Cyanobacteria Bloom Compared to Bighead Carp in Hypereutrophic Lake Taihu mesocosms. Ecological Engineering, 89, 7-13.

Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M. (2010) Selection of Microalgae for

Lipid Production Under High Levels Carbondioxide. Bioresource Technology, 101(1), 71-74.

Zegura, B., Štraser, A., Filipič, M. (2011) Genotoxicity and Potential Carcinogenicity of Cyanobacterial Toxins– A Review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, *727*(1), 16-41.

Zhang ,J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. (2005) Responses of the Antioxidant Defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, Exposed to 2,4-dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19: 185–190.

Zhang, G., Zhang, P., Wang, B., Liu, H. (2006) Ultrasonic Frequency Effects on the Removal of *Microcystis aeruginosa*. Ultrasonics Sonochemistry, 13, 446-450.

Zhang, Y.B., Chen, Q.H. (2001) Biological Effect of Ultrasonic Radiation on Marine Chlorella. J. Xiamen Univ, 40, 653-657.

Zhu, Z.Y., Wu, Y., Zhang, J., Du, J.Z., Zhang, G.S. (2014) Reconstruction of Anthropogenic Eutrophication in the Region off the Changjiang Estuary and Central Yellow Sea: From Decades To Centuries. Continental Shelf Research. 72: 152–162. doi:10.1016/j.csr.2013.10.018

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Harika Eylül ESMER

2. Doğum Tarihi: 1991

3. Unvanı: Biyolog

4 Öğrenim Durumu:

Derece	**Alan**	**Üniversite**	**Yıl**
Lisans	Biyoloji Bölümü	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi	2009-2013
Y. Lisans	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (Danışman: Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN)	Temmuz 2013-…

5. Görevler

Görev Ünvanı	**Görev Yeri**	**Yıl**
Kısmi zamanlı Öğrenci	Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO)	2014

6. Hakemli Ulusal Dergilerde Yayınlanmış Türkçe Derlemeler

1) Akbulut C., Kaymak G., **Esmer H.E.**, Yön N.D., Kayhan F.E. (2014) "Oxidative stress mechanisms induced by heavymetals and pesticide in fish", Ege JFAS, 32(1):1-5.

2) Kaymak G., Akbulut C., **Esmer H.E.**, Kayhan F.E. , Yön N.D. (2014) "Sucul Organizmalarda Çevresel Şartlara Karşı Geliştirilen Oksidatif Stres Mekanizmaları ve Adaptif Yanıtlar" Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 4(1):154-169.

3) Kayhan F.E., Kaymak G., Tartar Ş., Akbulut C., **Esmer H.E.**, Yön Ertuğ N.D. Küresel ısınmanın balıklar ve deniz ekosistemleri üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(3): 1-7

7. Uluslararası Kongre (Sempozyum) Etkinlikleri

1) The Toxic Potential of Mancozeb on AChE activity of Zebrafish (*Danio rerio*) Tissues., Fourth Internationel Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2014, İstanbul- Türkiye. KAYHAN, F. E., Kaymak, G., **Esmer, H. E.**, Akbulut, C., Yön, N.

D. (Poster sunum)

2) Defense Enzyme Activities and AChE Levels in Liver and Gill Tissues of *Xiphophorus hellerii* (Swordtail Fish)., 5. International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 2014, Isparta-Türkiye. Kayhan, F. E., Turan, G. T., Kaymak, G., Sesal, C., Yön, N. D., Akbulut, C., **Esmer, H. E.** (Poster sunum)

3) Effects of Mancozeb on Oxidative Stress Parameters in Zebrafish (*Danio rerio*). FABA 2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences 25-27 September 2014 Trabzon, Turkey. Kaymak G., **Esmer H.E.**, Akbulut C., Yön N.D., Kayhan F.E. (Poster sunum)

4) Effects of Fluoxetine HCl on Oxidative Stress Parameters in Zebrafish. The 3rd International Gen-Arel Molecular Biology and Genetics Student Congress. 24-25 April 2015, Istanbul, Turkey. Kaymak G., Koldemir-Gündüz M., Çevik M., **Esmer H.E.**, Tartar Ş., Kayhan F.E., Süsleyici-Duman B. (Poster sunum)

5) How Mancozeb Effects Heart Tissues Of A Model Organism Zebrafish (*Danio rerio*)? Evaluation Of The Oxidative Stress Parameters. International Conference on Applied Biological Sciences (ICABS) 16-20 September 2015 Skopje, Macedonia. Tartar Ş., Kaymak G., **Esmer H.E.**, Akbulut C., Yön N.D., Kayhan F.E. (Sözlü sunum)

6) The Biochemical Toxicities of TiO2 Nanoparticles on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). International Conference on Applied Biological Sciences (ICABS) 16-20 September 2015 Skopje, Macedonia. Kaymak G., **Esmer H.E.**, Tartar Ş., Akbulut C., Yön N.D., Kayhan F.E. (Poster sunum)

7) The Effects of Ultrasound Application on Green Algae *Chlorella variabilis*. International Conference on Applied Biological Sciences (ICABS) 16-20 September 2015 Skopje, Macedonia. **Esmer H.E.**, Kayhan F.E., Sesal N.C., Çakmak T., Gökalsin B. (Poster sunum)

8) Oxidative Stress Parameters in Zebrafish Brain Tissue After Exposed to Prozac. IVEK 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies 27-29 October 2015 Istanbul, Turkey. Kaymak G., Koldemir-Gündüz M., Tartar Ş., **Esmer H.E.**, Çevik M., Kayhan F.E., Süsleyici-Duman B. (Poster sunum)

9) Effects of Fluoxetine HCl on AML-12 Hepatocytes Proliferation by iCELLigence System. IVEK 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies 27-29

October 2015 Istanbul, Turkey. Koldemir-Gündüz M., Kaymak G., Çevik M., Tartar Ş., **Esmer H.E.**, Kayhan F.E., Süsleyici-Duman B. (Poster sunum)

8. Proje Katılımcılığı (Süren)

1) "Ultrasese maruz kalan *Carassius auratus* (Pisces: Cyprinidae) türü balıklarda davranışsal, biyokimyasal ve histolojik değişimlerin incelenmesi." Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje No: FEN-C-YLP-121214-0389

2) "Zebra Balığı Dokularında Antidepresan Etken Madde Fluoksetin HCl' nin Oksidatif Hasar Oluşturma Potansiyelinin Belirlenmesi" Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje No: FEN-A-111115-0511

9. Yönetim Kurulu Üyelikleri

TSPPT - Divan katibi

10. Üyesi Olduğu Dernekler

TSPPT

11. Staj Bilgileri (Lisans Eğitimi Sırasında)

1) Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Temmuz-Ağustos, 2011, Sakarya.

12. Bildiği Bilgisayar Programları

Microsoft windows

Microsoft word

Microsoft excel

Microsoft power point

SPSS veri analiz programı

Bu çalışmanın bir bölümü, "International Conference on Applied Biological Sciences (ICABS) , 16-20 September 2015 Skopje/ Macedonia" kongresinde "The Effects of Ultrasound Application on Green Algae *Chlorella variabilis*" başlığı ile poster sunum yapılmıştır.