



TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

SAKARYA NEHRİ VE DEĞİRMENDERESİ'NDE  
ALKİLFENOL KİRLİLİĞİ VE NONİLFENOLÜN  
ALABALIKLAR (ONCHORYNCUS MYKISS)  
ÜZERİNE ETKİLERİ

72788

PROJE NO: YDABAG-101Y066

**Çevre, Atmosfer, Yer ve Deniz Bilimleri  
Araştırma Grubu**

Environment, Atmosphere, Earth and Marine Sciences  
Research Grant Group

**SAKARYA NEHRİ VE DEĞİRMENDERESİ'NDE  
ALKİLFENOL KİRLİLİĞİ VE NONİLFENOLÜN  
ALABALIKLAR (ONCHORYNCUS MYKISS)  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

72788

**PROJE NO: YDABAG-101Y066**

**PROF. DR. MESUDE İŞCAN  
PROF. DR. İNCİ TOGAN  
PROF. DR. FERİDE SEVERCAN  
CEVDET UĞUZ  
AYŞE ERGÜVEN**

**EYLÜL, 2005  
ANKARA**

## ÖNSÖZ

Çevre kirliliğinin insanlar ve diğer canlılar üzerindeki etkileri her geçen gün artmaktadır. İnsan faaliyetleri sonucunda veya doğada kendiliğinden oluşan kimyasalların etkilerinin incelenmesi önem kazanmaktadır. Sucul çevreler kirliliğe neden olan kimyasalların toplandığı ve yoğunlaştığı bölgelerdir. İnsanların su kullanımı yaygındır. Tarımsal faaliyetlerde, endüstriyel alanlarda, evsel yaşam alanlarında, su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir su kullanımı mevcuttur. Bu nedenle yüzey sularının kirlilik boyutunun incelenmesi ve sucul çevrelerin toksikolojik açıdan inceleme altına alınması önem kazanmaktadır. Suları kirleten başlıca maddeler arasında alkilfenol etoksilatlar gelmektedir. Deterjanlar, herbisit, pestisit, boya ve kozmetiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılan alkilfenol etoksilatlarından biri olan nonilfenol etoksilatın, doğada parçalanma ürünü olan nonilfenolün, geçmişte yapılan çalışmalarda vücuttaki hormonal dengeyi bozduğu, estrogenik etki gösterdiği, kanserojenik ve toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca estrogenik etkileri olan bu gibi maddelerin, sucul ortamlarda yaşayan balıklar üzerinde cinsiyet değişikliği yapma özelliklerinin bulunması, balık stoklarında azalmaya neden olacağından, ekonomik olarak da etkisi vardır. Bu çalışmada ise, nonilfenolün sucul ortamlardaki varlığının saptanması için kromatografik yöntemler geliştirilmesi ve besin zincirinde bulunan balıkların gelişmesi üzerine etkilerinin, biyokimyasal ve morfolojik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma kısmen Dr. Cevdet Uğuz'un doktora tezidir. Bu çalışmanın yürütülmesine olanak sağlayan TÜBİTAK, Orta Doğu Teknik Üniversitesi ve Trabzon Su Ürünleri'ne ve çalışmalara katkıda bulunan Dr. Ebru Saatçi, Dr. Belgin İşgör ve Araş. Gör. Pembegül Uyar'a teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TABLO LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
3 GEREÇ VE YÖNTEMLER	6
3.1 Materyaller	6
3.2 Kimyasallar	7
3.3 Yöntemler	7
3.3.1 Akvaryum deney düzeneği	7
3.3.2 Alkilfenol Ölçümü	7
3.3.3 Sularda Alkilfenol Özütlemesi	8
3.3.4 Sedimanlarda Alkilfenol Özütlemesi	8
3.3.5 Dokularda Alkilfenol Özütlemesi	8
3.3.6 FTIR çalışmaları için numune hazırlanması	9
3.3.7 FTIR Çalışmaları	9
3.3.8 Histolojik Doku Hazırlama Yöntemi	10
3.3.9 Balık karaciğer homojenatının Hazırlanması	10
3.3.10 Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini	10
3.3.11 Vitellogenin Tayini	10
3.3.12 İstatistik analiz	11
4 BULGULAR	11
4.1 Alkilfenol Standart Ölçümleri	11
4.1.1 Su Örneklerinde Alkilfenol Özütlenme Verimi	13
4.1.2 Sedim Örneklerinde Alkilfenol Özütlenme Verimi	14
4.2 Sakarya Nehri ve Değirmendere Üzerindeki İstasyonlarda Su ve Sediman Örneklerindeki Alkilfenol Miktarları	15
4.3 Değirmenderesi ve Sakarya Nehri üzerindeki istasyonlardan yakalanan Balıklardaki Alkilfenol Seviyesi	16
4.4 Nonilfenol'ün balık dokularında birikimi	18
4.5 Nonilfenol'ün Alabalık Karaciğer dokusundaki Histopatolojik Etkileri	21
4.6 Nonilfenol'ün Alabalık Karaciğer dokusundaki moleküler etkilerinin FTIR ile incelenmesi	24
4.7 Nonilfenol'ün Alabalık Karaciğer Glutasyon S-transferaz enzimine etkileri	27
4.8 Nonilfenol'ün Alabalıklarda Vitellogenin seviyesine etkileri	28
5 TARTIŞMA VE SONUÇ	29
6 KAYNAKLAR	30
7 BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	34

## Tablo Listesi

	Sayfa
Tablo 1 Standart Alkilfenol Çözeltilerinin HPLC'de okunan profil alt alan değerleri.....	13
Tablo 2 Sakarya nehri ve Değirmendere Nehri üzerinde alınan su ve sediman örneklerindeki alkilfenol özütleme verimi.....	15
Tablo 3 Sakarya ve Değirmendere ırmaklarından alınan su, sediment, doğal balık ve akvaryum balık örneklerinin AP ve API içerikleri.....	17
Tablo 4 Değirmendere ve Sakarya nehrinde su kalitesine ilişkin parametreler.....	18
Tablo 5 Değişik nonilfenol konsantrasyonlarına maruz bırakılan, Japon balıklarının yaşama süresi ve dokularındaki nonilfenol birikiminin HPLC ile ölçümü.....	18
Tablo 6 Alabalık dokularında nonilfenol birikimi.....	18
Tablo 7 Farklı sürelerde nonilfenol muamelesinin birikime etkisi.....	19
Tablo 8 Alabalık karaciğeri glutatyon S-transferaz enzim aktivitesinin farklı süre ve farklı konsantrasyonlarda NP ile muamele sonucunda değişimi.....	27

## Şekil Listesi

		Sayfa
Şekil 1	Sakarya ve Değirmenderesi üzerindeki örnekleme istasyonları.....	6
Şekil 2	Havanın IR spektrumu.....	9
Şekil 3	Standart 0.5 mM (75µg/ml) 4-tert-butilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili.....	11
Şekil 4	Standart 0.5 mM (110 µg/ml) nonilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili.....	12
Şekil 5	Standart 0.5 mM (103 µg/ml) 4-tert-oktilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili.....	12
Şekil 6	Standart alkilfenol bütilfenol, nonilfenol ve oktilfenol karışımının izokratik ve normal faz HPLC profili.....	12
Şekil 7	Alkilfenol standart grafiği.....	13
Şekil 8	Su örneklerinden özütlenen standart bütil, oktil, ve nonilfenolün HPLC'de ayrılma profili. BP, bütilfenol; NP, nonilfenol; OP, oktilfenol.....	14
Şekil 9	Kontrol grup alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili.....	19
Şekil 10	66 µg/L NP ile bir hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili.....	20
Şekil 11	220 µg/L NP ile bir hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili.....	20
Şekil 12	660 µg/L NP ile bir hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili.....	21
Şekil 13	Kontrol gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x).....	21
Şekil 14	Pozitif kontrol (2,7 µg/L 17β-estradiol ile muamele edilmiş) gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x).....	22
Şekil 15	220 µg/L NP ile bir hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x) K: Kupfer hücreleri.....	22
Şekil 16	220 µg/L NP ile iki hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x) K: Kupfer hücreleri.....	23
Şekil 17	220 µg/L NP ile üç hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x) K: Kupfer hücreleri.....	23
Şekil 18	220 µg/L NP ile dört hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x) K: Kupfer hücreleri.....	24
Şekil 19	Kontrol alabalık karaciğerinden alınan FT-IR spektrası.....	25
Şekil 20	Kontrol ve NP ile bir hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 1800-800 cm <sup>-1</sup> bölgesinde alınan FT-IR spektrası.	25
Şekil 21	Kontrol ve NP ile bir hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 1800-800 cm <sup>-1</sup> bölgesinde alınan FT-IR spektrası.	26

Şekil 22	Kontrol, NP ve 22 µg/L E2 ile iki hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 3600-2800 cm <sup>-1</sup> bölgesinde alınan FT-IR spektrasi .....	26
Şekil 23	Kontrol, NP ve 22 µg/L E2 ile iki hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 1800-800 cm <sup>-1</sup> bölgesinde alınan FT-IR spektrasi.	27
Şekil 24	Vitellogenin Standart Eğrisi.....	28

## Özet

Alkilfenol etoksilatlar (APE), deterjanlarda, ot ve böcek ilaçlarında, boyalarda, kozmetiklerde, plastiklerde, yüzey aktif madde yaygın bir şekilde olarak kullanılan maddelerdir. APE'ler ve onların biyolojik bozunuma uğraması ile oluşan ve genel olarak alkilfenoller olarak adlandırılan, nonilfenol (NP), oktilfenol (OP) ve bütilfenol (BP) gibi sucul ortamlara karışarak kirlilik yaratan ürünler endokrin sistemi bozucu etkilere sahiptir. Bu çalışmada, Değirmenderesi ve Sakarya Nehri üzerinde belirlenen istasyonlardan alınan su ve sedim örneklerinde ve bu bölgelerden tutulan balıkların dokularında alkilfenol kirliliği metanol özütlemesi ve ardından HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Her iki nehirde de, su örneklerinde alkilfenol'e rastlanmazken, Değirmenderesi'nin en kirlili bölgesinden alınan sedim örneklerinde 4,45 µg /g NP ve 1,68 µg /g BP belirlenmiştir. Sakarya Nehrinin en kirlili yerinde ise, yine sedim örneklerinde 3,15 µg/g BP ölçülmüştür. Bu istasyonlardan toplanan balık örneklerinde NP ve alkilfenol ilintili bir madde varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, laboratuvarında NP verilmiş alabalıklarda NP'nin karaciğer glutatyon S-transferaz üzerine etkileri incelendi ve maruziyet süresine ve doza bağımlı değişken bir etki gözlemlendi. Bu balıkların karaciğerlerinde yapılan sitolojik incelemelerde, 17-estradiol benzeri yağlanma etkileri görüldü. Karaciğer dokusundaki moleküler düzeydeki değişiklikler FTIR spektrofotometresinde belirlendi. Estrojenik etkinin belirteci kabul edilen karaciğerde vitellogenin üretimindeki artışlar immunolojik yöntemlerle saptandı.

Anahtar kelimeler: alkilfenol, nonilfenol, glutatyon S-transferaz, FTIR, vitellogenin



## Abstract

Alkylphenol epoxyates (APE) are ubiquitous environmental pollutants used as non-ionic surfactants in detergents, pesticides, herbicides, paints, cosmetics and plasticware. Biological degradation products of APEs namely nonylphenol (NP), octylphenol (OP) and butylphenol (BP), which are found in water systems, are known as endocrine disruptors. In this study, alkylphenols are extracted from water samples and sediments, and also fish tissue collected from the stations along Sakarya and Değirmenderesi Rivers. Methanol extraction is applied for better resolution and the quantity of the pollutants are determined by isocratic and normal phase HPLC. Aps are not detected in water samples collected both from Sakarya and Değirmenderesi Rivers. However, NP (4,45  $\mu\text{g/g}$ ) and BP (1,68  $\mu\text{g/g}$ ) are detected in sediment samples collected at one of the stations of Değirmenderesi, and BP (3,15  $\mu\text{g/g}$ ) is found in sediment samples taken from one of the sites of Sakarya River. Nevertheless, NP and alkylphenol like chemical are detected in the tissue extracts of almost all fish samples collected from all stations. NP treatment of rainbow trout under laboratory conditions results in the bioaccumulation in the tissues and histopathological abnormalities in liver tissue, and changes in glutathione S-transferase activities. The effects of NP treatment is also examined by FTIR at the molecular level. The increase in the vitellogenin amount in liver as determined by immunologic methods indicates the estrogenic behaviour of APEs.

Key words: alkylphenol, nonylphenol, glutathione S-transferases, FTIR, vitellogenin

## 1 Giriş

Çevre kirliliğinin insanlar ve diğer canlılar üzerindeki etkileri her geçen gün artmaktadır. İnsanlar tarafından üretilen veya doğada kendiliğinden oluşan kimyasalların etkilerinin incelenmesi önem kazanmaktadır. Sucul çevreler bu tip kimyasalların toplandığı ve yoğunlaştığı bölgelerdir. Bu nedenle sucul çevrelerin toksikolojik açıdan inceleme altına alınması önemlidir. İnsanların su kullanımı yaygındır. Tarımsal faaliyetlerde, endüstriyel alanlarda, evsal a yaşam alanlarında, su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir su kullanımı mevcuttur. Yüzey sularının kirlilik boyutunun incelenmesi önem kazanmaktadır.

Sucul sistemleri kirlüten maddeler arasında hormon benzeri etki gösteren kimyasallar da bulunmaktadır. Bu çeşit maddelere endokrin sistemi bozucu maddeler denilmektedir. Endokrin sistemi bozucu maddelerin zararlı etkilerinin nedeni, hormonların etkilerini taklit etmelerinden veya hormonlara ters etki yapmalarından, veya hormon sentezini ve metabolizmasını etkilemelerinden kaynaklanmaktadır. Çevresel kaynaklı endokrin sistemi bozucu maddeler arasında bulunan dietilstilbestrol (DES) DDT, çoklu klorlu bifeniller (PCBs) ve alkilfenol etoksilatların (APEs), sucul ve karasal organizmalarda estrojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (McLACHLAN, 1992). COLBORN ve CLEMENT (1992), çalışmalarında, bu tip maddelere uzun süreli maruziyet sonucunda hem insanlarda, hem de doğada yaşayan canlılarda, gonad gelişiminde bozukluklar olduğuna değinmektedir. DES yaygın kullanımı olduğu bilinen bir çevresel estrojendir. İnsanlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir (MARSELOS ve TOMATIS, 1992 a,b). Kullanımı yasaklanmış olmakla birlikte, prostat kanseri tedavisinde doğum kontrol haplarında ve büyükbaş hayvan yemlerinde büyüme verimini artırmak için kullanılmaktadır. PCB ve DDT insan sütünde ve yağ dokusunda birikir (ROGAN et al,1987; KUTZ et al, 1991). Çevresel estrojenlerin memelilerde, kuşlarda ve balıklarda üreme ve endokrin faaliyetleri bozucu etkilerini destekleyen pek çok bulgu mevcuttur (COLBORN et al, 1993; SAFE, 1995).

Bu grup maddeler arasında özgün bir grup oluşturan alkilfenol epoksilatlar, çoğunlukla non-iyonik yüzey aktif maddeler olarak deterjanlarda, herbisit ve pestisitlerde, kozmetiklerde, boyalarda, plastiklerde kullanılır. Toksik olmalarının yanısıra, bu maddeler balıklar üzerinde estrojenik etki gösterirler (JOBLING and SUMPTER, 1993; JOBLING et al., 1996).

Yıllık bazda, üretilen alkilfenollerin %60'ı sucul sistemlerde biriktiğinden (JOBLING et al., 1996), ülkemizdeki sularda alkilfenollerin varlığının gösterilmesi ve miktarlarının saptanması önemli bir konudur. Bu alanda yapılmış detaylı çalışmalar yoktur. 1992'de Duydu ve Vural (DUYDU ve VURAL, 1992) yaptıkları çalışmada, Ankara Çayında noniyonik yüzey gerilim maddesi içeren deterjan miktarını ölçmüşler ve bulgularının nonilfenol'e eşdeğer olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak kullandıkları yöntem ile nonilfenol tayini yapılmamaktadır. Bu çalışmada, Ülkemizdeki Karadeniz'e dökülen iki akarsuda, Sakarya ve Değirmenderesi, suda, sedimde ve bu sularda yaşayan balıklarda alkilfenollerin ölçülmesi için direk bir metot geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Alkilfenollerin biyolojik materyalde birikerek konsantre olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, insan besin zincirinde bulunan balıklarda alkilfenol ölçümü de yapılmıştır. Alkilfenollerden nonilfenolün etkileri laboratuvar koşullarında alabalık üzerinde denenmiştir. Alabalık, hem ülkemizde doğal ortamlarda yetişen, ayrıca çiftliklerde üretilen, hem de yetiştiği ortamındaki kirliliğe çok hassas olan bir balık olması nedeniyle seçilmiştir.

## 2 Genel Bilgi

Endokrin sistemi bozucu (endocrine disrupters) maddelerden olan nonilfenoletoksilatlar (NPEs), alkilfenol etoksilatlar (APEs) grubuna dahil edilen, noniyonik polimerik yüzey aktif maddelerdir. Dünyada üretilen ve piyasaya sürülen ikinci büyük grup yüzey aktif maddelerdendir. Nonilfenol (NP) ise nonilfenoletoksilatların evsel ve çevresel atıklarda kalıcı olarak bulunan bozunma ürünüdür. Endokrin sistemi bozucu etkilerinin yanısıra, NP'nin balıklara ve kuşlara da toksik etkileri vardır.

Endokrine sistemi bozucu kimyasallar, endokrin sistem hormonlarının etkilerini taklit ederek, hormon üretimi, salınması, taşınması, metabolizması ve vücuttan atılımı fonksiyonlarını bozarak, vücuttaki homeostazi etkiler (FERGUSON *et al.*, 2000). Alkilfenoletoksilatların yanısıra, bazı pestisit ve insektisitler ve fitoestrogenler de endokrin sistemi bozucu maddeler sınıfına girer. Bu çeşit maddeler, bütün vertebratlarda, seks hormonları gibi hareket ederek, estrogenik özellikler gösterenler dişileşmeye neden olur (KLOAS *et al.*, 1999). Bu maddeler, doğal yaşamda, anormal üretim sistemi gelişmesine, erkek ve dişilerde üretimin düşmesine ve erkeklerin dişileşmesine neden olmaktadır. İnsanlarda, sperm sayısının azalması ve meme ve testis kanserlerinin çoğalması da endokrin bozucu maddelerle ilişkilendirilmektedir. Örneğin, kullanımı artık durdurulan, ancak kalıntıları hala çevrede bulunana DDT, estrogenik bulunmuştur (SONNENSCHNEIN ve SOTO, 1998).

Nonilfenoletoksilatların estrogenik aktivitesinin nonilfenol nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Nonilfenol çevrede, tatlı sularda ve balıklarda kalıcıdır ve birikmektedir. Bu nedenle, besin zinciri içinde insanlara kadar ulaşması olağandır (ROY *et al.*, 1997; KLOAS, *et al.*, 1999). Nitekim, nonil fenolün insanlarda estrogen reseptör sinyal yolağını etkilediği gösterilmiştir (GAGNE *et al.*, 1999).

Bu nedenlerle, nonilfenol gibi estrogenik aktivite gösteren maddelerin, çevrede varlıklarının gösterilmesi ve rutin tayin yöntemlerinin belirlenmesi, çevre canlılarında birikiminin gözlenmesi acil önem taşımaktadır.

Alkilfenolepoksilatların yüzey aktif özellikleri, kimyasal yapılarında bulunan hidrofobik alkil fenol grubu ile, p-pozisyonundan bağlanmış tekrarlanan etilenoksit ünitelerinden oluşan hidrofilik uzun zincir nedeniyledir. Zincirin uzunluğu maddenin suda çözünürlüğünü artırmaktadır. Etilen ünitesi alkilfenollerde 100 tekrara kadar büyümektedir (NIMROD and BENSON, 1996). Yapıdaki alkil grubu ise genellikle nonil, oktil veya bütil grubudur. Biyodegradasyona uğradığında genellikle etoksilat grubu hidroliz olur ve geriye daha lipofilik olan nonilfenol (NP), oktilfenol (OP) veya bütilfenol (BP) kalır (NIMROD and BENSON, 1996). Doğada hidroliz aşaması oldukça hızlıdır. NP, OP ve BP yanısıra, tamamlanmamış hidroliz ürünleri olarak nonilfenol monietoksilat (NP1EO) nonilfenol dietoksilat (NP2EO) da oluşur (NAYLOR *et al.*, 1992). NP, NP1EO ve NP2EO'nun biyodegradasyonu ise benzen halka yapısı nedeniyle daha yavaştır (BRUNNER *et al.*, 1988). Alkilfenoller yine doğada bakteriler tarafından karboksilik asit grubu taşıyan karbonatlara da çevrilirler (AHEL *et al.*, 1994a). Son ürünleri genellikle karbondioksit ve sudur. Alkilfenol etoksilatların sulu ortamda, 4-t-bütilfenol, 4-t-oktilfenol, 4-t-nonilfenol gibi, 4-t-alkilfenoller de oluşturduğu gözlenmiştir (NIMROD and BENSON, 1996). Nimrod ve Benson (1996) makalelerinde, atık sularda, kirlenmiş yüzey sularında ve sedimlerinde en çok bulunan alkifenol etoksilat bozunma ürünlerinin NP ve 4-t-OP olduğunu rapor etmişlerdir. Haverlak *et al.* (1999), tarım arazilerinden APE konsantrasyonunun 14 hafta içinde % 84 azaldığını belirlemişlerdir. APE'nin

biyodegradasyonu çevre iklim şartlarına göre değişmektedir. Macromini et al. (2000), 20°C üstünde APE'nin daha hızlı bozunduğunu göstermiştir. Mikrobiyel bozunmanın yanısıra, NP'nin fotokimyasal olarak da bozunduğu belirlenmiştir (AHEL et al., 1994b). Su yüzeyinde, öğlen güneşinde NP yarı ömrü 10-12 saattir. 20-25 cm derinlikte ise aynı koşullarda 1,5 kez azalmaktadır. İngiliz Çevre ajansı NP yarı ömrünü suda 150 gün olarak kabul etmektedir (WARHURST, 1995).

ABD'nde APE non-iyonik surfaktan olarak, toplam surfaktan üretiminin %6'sını, toplam non-iyonik surfaktanlar arasında da %25'ini tutar. TALMAGE (1994) raporunda, dünyada üretilen APE'nin %55'inin plastikler, tekstil, tarım kimyasalları ve kağıt üretiminde; %30'unun kurumsal temizlik ürünlerinde, kalan %15'inin de ev temizlik ve kişisel temizlik ürünlerinde kullanıldığını yazmıştır. Ayrıca APE'nin uçak jet yakıtına antioksidan olarak katıldığı bilinmektedir (BARNEBEI et al., 2000).

1997 istatistiklerine göre, dünyada yıllık 500,000 metric tondan fazla APE üretilmektedir (RENNER, 1997). Bunun %60'ının göllere, nehirlere ve çevreye yayıldığı düşünülmektedir (JOBILING et al., 1996). Çevresel sularda AP konsantrasyonunun nadiren 10 µg/L'yi geçtiği bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (NAYLOR et al., 1992, AHEL et al., 1994c,d; BLACKBURN and WALDOCK, 1995; TYLER et al., 1998; BLACKBURN et al., 1999). Evsel atık sular ortalama 100 µg/L APE içerir, ancak endüstriyel atıklarda bu miktar mg/L düzeylerine yükselir. İngiltere'de endüstriyel atık sularda NP miktarı 1000 µg/L olarak rapor edilmiştir (TYLER et al., 1998).

Son yıllardaki çalışmalarda nonilfenolün diğer AP'ler arasında en kritik kimyasal olduğunu vurgulamıştır. Nonilfenol biyodegradasyona daha dayanıklıdır, daha lipofiliktir, dolayısıyla su çözünürlüğü daha düşüktür ve suda yaşayan canlılarda daha yüksek birikim gösterir (AHEL et al., 1994c,d; TYLER et al., 1998). Nonilfenoletoksilatlar, APE'ler arasında %82 pay tutar.

Estrojenik kimyasalların canlılarda birikimi önemli bir problem yaratmaktadır. Lipofilik olmaları canlıdaki yarılanma ömrünü uzatmaktadır. Lipofilik bir madde olarak NP'nin oktanol:su ayrışım katsayısı 4,48 iken, NP1EO, NP2 EO ve NP3EO için bu değer 4,2'dir. (AHEL ve GIGER, 1993). Algler, balıklar ve bunlarla beslenen kuşlar, ayrıca deniz canlıları, tatlı sudan gelen NP, NP1EO, NP2 EO ve NP3EO biriktirmektedir. LEWIS ve LECH (1996), radyoaktif işaretlenmiş NP'nin alabalık karaciğer ve kaslarında 40-100 katsayıyla biriktiğini göstermişlerdir. BLACKBURN et al.,(1999) balıklarda ölçülen NP miktarının sudakinin 50 misli olduğunu rapor etmektedir.

APE 'ler canlılarda sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından alkil zincirin C-8 ve C-9 pozisyonlarında hidroksillenirler ve katekol yapı oluştururlar (PEDERSON ve HILL, 2000; ARUKWE et al., 2000). Ardından glukuronidasyon reaksiyonları ile konjuge olarak canlıdan atılıma hazır hale gelirler (THIBAUT et al., 1998). Nonilfenol alkil zinciri üzerinde ω-1 ve ω-2 pozisyonlarında hidroksillenerek, 9-hidroksi ve 8-hidroksi nonilfenol oluşturur. Bu ürünlerin glukuronitleri saftada bulunur. Ancak ana madde nonilfenole kaslarda bozunmamış olarak da rastlamak mümkündür. Bu durum nonilfenolün metabolizmaya direncini ortaya koyar (CODHAM et al., 1998).

17β-Estradiol ve NP kimyasal yapıları açısından çok benzerlik gösterirler. Bu nedenle NP bu dişi hormonunun bütün fonksiyonlarını taklit etme yetisindedir. NP diğer estrojenik kimyasallardan, örneğin DDT'den 3 kat daha güçlü bir estrojenik aktiviteye sahiptir (SOTO et al., 1991). NP estrojenik aktivitesi, balıklarda vitellogenin artışı ile birlikte. İngiltere'de nehre bırakılan atık sulara maruz kalan erkek

balıklarda vitellogenin artışı saptanmıştır (HARRIES et al., 1997). Vitellogenin sulardaki estrojenik kirlilik biyobelirteci olarak kabul edilmiştir.

Dışarıdan alınan estrojenik kimyasalların kadınlarda meme kanserine zemin hazırladığı ve kadın ve erkeklerde doğurganlığı düşürdüğü yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (HENDERSON et al., 1993; SAFE et al., 1998). Ayrıca, NP'nin over ve testis kanserleri artırdığı da rapor edilmiştir (SKAKKEBAEK et al., 1998).

APE'lerin insanlarda toksisitesi düşüktür, LD<sub>50</sub> si 2-4 g/kg (sıçan ve farelerde). Ancak sucul canlılarda, etilenoksit zincirinin kısalması ve alkil zincirinin uzaması toksisitelerini artırır. Burkhardt-Holm et al., (2000) 10 µg/L dozda NP maruziyette, alabalıklarda epidermal mukus hücrelerinde harabiyet gözlemişlerdir. Alkilfenoller, memelilerde kendilerini metabolize eden enzim sistemlerinden CYP 1A'nın karaciğerde aktivitesinin azalmasına, CYP3A'nın ise artmasına neden olur (LEE et al., 1996). Aynı durum balıklarda da gösterilmiştir (ARUKWE et al., 1997b). Faz II metabolizmada ise Glutatyon konjugasyonundan sorumlu enzimlerden olan Gluatayon S-transferazlar üzerine etkilerinin olup olmadığı konusunda bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Bu çalışmanın amacı sucul ortamlarda aklilfenol kirliliğinin belirlenmesi için kolay kullanılabilir bir metot önermek ve alabalıkların NP etkisinde gösterdikleri değişimleri moleküler seviyede biyokimyasal ve spektral incelemektir. Çevresel kirliliğin biyoindikatörlerinden olan glutatyon S-transferazların alkilfenol kirliliğinden nasıl etkilendiğinin araştırılması, bu proje kapsamına alınmıştır.

### 3 Gereç ve Yöntemler

#### 3.1 Materyaller

HPLC kolonu, su numuneleri ve sedim toplanan şişeler, balık akvaryumları, yatay şala, lam sepeti, lam, lamel, parafin dondurma kalıbı, parafin dondurma yüksüğü, parafin eritme ve dökme kabı, mikrotom ve mikroskop gerekli malzemelerdir. Alkilfenollerin ölçümü için TUBITAK tarafından desteklenen bu proje bütçesinden satın alınan HPLC cihazı [Shimadzu HPLC pompası (model LC-9A), spektrofotometresi (model UV-160A) ve integratörü (model CR-6A)] kullanılmıştır. Luna C18 HPLC (250 x 4.6 mm, 5 µl) kolonu, C18 BOND ELUTE (100 mg/ml) oktadesil silika kartuşu Aldrich firmasından temin edilmiştir.

#### **Balıklar:**

Doğadan balıklar Değirmendere ve Sakarya nehrinden elektroşok tekniği ile yakalandı. Kanları alındı. Organları ayrıldı. Kasları ve karaciğerleri yıkanarak kandan temizlendi ve sıvı nitrojende donduruldu. Ölçümler için laboratuvara sıvı nitrojende taşındı.

6 aylık genç alabalıklar, Er-Su alabalık Çiftliğinden (Kesikköprü-Ankara) laboratuvara içine oksijenle karışık hava basılan plastik varillerde transfer edildiler. Su sıcaklığı 9-12°C olan, 35 litrelik akvaryumlara alındılar. Deneylere başlamadan önce 2 gün ortamlarına uyum sağlamaları için beklendi. Bu süreçte ve deneyler süresince alabalık yemi ile beslendiler. Her gün akvaryumlarındaki suyun yarısı alınarak, temiz şartlanmış suyla değiştirildi. Temiz şartlanmış su, çeşme suyu karbon kömür filtrelerden geçirilerek dinlendirilen ve 24 saat süreyle içine hava basarak elde edildi.

#### **İstasyonlar:**

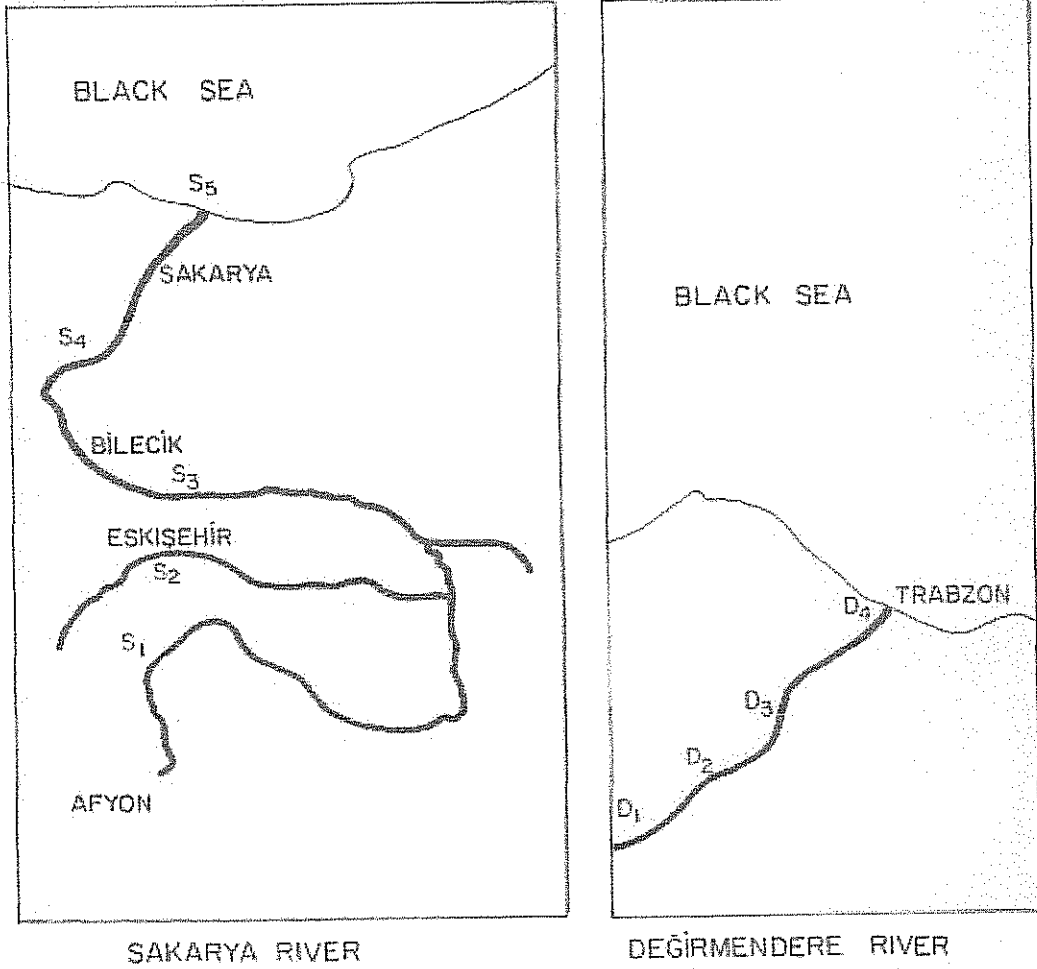
Şekil 1'de görüldüğü üzere Sakarya Nehri kuzey-batı Anadolu'da yer alır. Bayat Platosundan doğarak Eskişehir, Bilecik ve Adapazarını geçtikten sonra Karadeniz'e dökülür. Türkiye'nin 5. büyük nehridir. 820km uzunluğundadır. En geniş yeri 690 m'dir. Akış hızı 6-1,162 m<sup>3</sup>/sn.'dir. Üzerinde elektrik üretme amaçlı bir baraj bulunur. Suyu sulamak amaçlı kullanılır. İrili ufaklı dere ve çaylarla beslenir. Çevresinde 35 endüstri kompleksi yer alır. Bu kuruluşların atık suları arıtılmadan nehre boşaltılır. Alkilfenol ölçmek amacıyla örnekleme yapılan istasyonlar şunlardır:

Sakarya Nehrinde:

- Seyitsuyu (Seyitgazi): Sakarya Nehrinin doğduğu yere en yakın bir çaydır. En temiz bölgesi olarak (kontrol) kabul edilir.
- Porsuk Çayı: Eskişehirden geçerek nehre katılır, Hem endüstriyel, hem de evsel atıklar bu suya boşaltılır.
- Sarıcakaya ve Pamukova: Sakarya Nehri ana arterinde iki istasyondur. Bu bölgeler tarım arazileriyle çevrildiğinden, tarla sulama suları ile taşınan tarımsal ilaçlarla kirlenmektedir
- Karasu: Karadeniz kıyısında denize döküldüğü bölgededir.

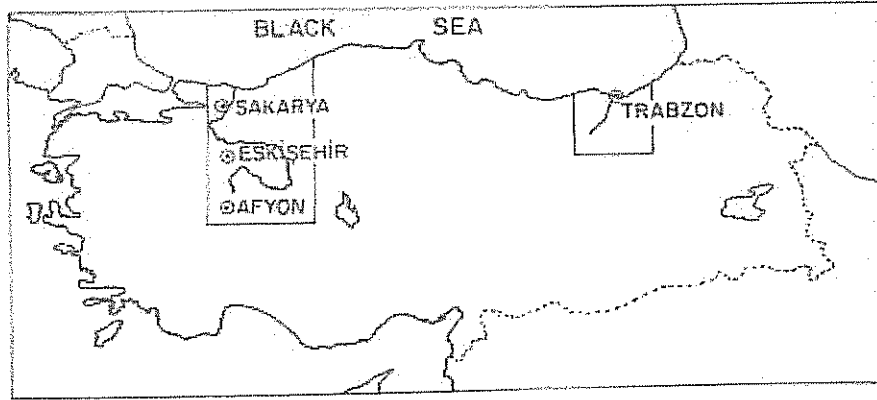
Değirmenderesinde:

- Su ürünleri Yüksek Okulu: nehrin denize döküldüğü yere en uzak noktasıdır. En temiz bölge olarak kabul edilebilir.
- Maçka: Maçka ilçesinde , yerleşim yerindedir. Arıtılmamış şehir atık suyu boşalır.
- Esiroğlu: Maçka Trabzon arasındadır.
- Sanayi Sitesi: Trabzondadır. Değirmenderesi buradan Karadenize dökülür.



SAKARYA RIVER

DEĞİRMENDERE RIVER



**Şekil 1.** Sakarya ve Değirmenderesi üzerindeki örnekleme istasyonları, Sakarya Nehri Üzerinde: S1, Seyitsuyu; S2, Porsuk Çayı; S3, Sarıcakaya; S4, Pamukova; S5 Karasu; Değirmenderesi üzerinde, D1, Su Ürünleri Yüksek Okulu önü; D2, Maçka; D3, Esiroğlu; D4, Sanayi Sitesi. (1/1200000 ölçek)

## 3.2 Kimyasallar

Nonilfenol (4-NP) Aldrich Company'den temin edilmiştir. Potasyum bromür (KBr) Merck Firmasından satın alınmıştır.

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), kristalize sığır serum albumini (BSA), indirgenmiş glutatyon (GSH) Sigma Chemical Company'den alınmıştır.

HPLC kalitede metanol ve propanol (Merck) ve alkilfenol türevleri olan 4-*tert*-bütilfenol, 4-*tert*-oktilfenol, 4-nonilfenol Aldrich firmasından AFP-2000-07-02-00-08 projesi bütçesinden temin edilmiştir. Etil alkol, asetik asit, pikrik asit, formaldehit, parafin, HCl, Ksilene, ve diğer bütün kimyasallar, piyasada bulunan en saf ürünlerden seçilmiştir.

## 3.3 Yöntemler

### 3.3.1 Akvaryum deney düzeneği:

Deneyler sabit (durgun) akvaryum sisteminde yapıldı. 35 litrelik akvaryumlar kullanıldı. Çeşme suyu akvaryumlara doldurulmadan önce, aktif karbon filtreden süzülerek 24 saat boyunca hava geçirildi. Alabalıklar akvaryuma konmadan önce su 24 saat dinlendirildi. Deneyler sıcaklığı en yüksek 14°C'ye ayarlanmış odada yapıldı. Kontrol için bir akvaryum ayrıldı, diğer akvaryumlarda NP muamelesi yapıldı. Etanolde çözülmüş nonilfenol farklı konsantrasyonlarda muamele tanklarına ilave edildi. İlk aşamada, japon balıkları 0.22, 2.2, 22 ve 220 µg/L nonilfenole maruz bırakılmışlardır. Kontrol tankına sadece aynı miktarlarda etanol ilave edilmiştir. Balıklar yukarıda anlatıldığı gibi dondurulup dokularından alkilfenol özütlemesi yapılarak yöntem geliştirilmesinde kullanılmışlardır. Alabalıklarda alkilfenol etkilerinin araştırıldığı deneylerde, farklı muamele süreleri ve farklı NP konsantrasyonları denendi. Pozitif kontrol olarak 22 µg/lt estrogen aynı koşullarda (35 l lik tanklarda, 2 hafta) kullanıldı. NP ve estrogen etanolde çözülerek hazırlandığından, kontrol akvaryuma aynı miktarda etanol ilavesi yapıldı. Genelde her akvaryum tankına 15 alabalık yerleştirildi, her akvaryumdan (kontrol ve muamele tankları) beş balık haftada bir kez yakalanarak özütleme işlemine tabi tutuldu. Ayrıca FTIR çalışmaları için balıkların karaciğerlerinden alınan bir kısım -22°C'de derin dondurucuda saklandı. Tankların temizliği için her gün 10 litre su tanktan sifonlanarak alındı ve yerine aynı miktarda nonilfenol içeren su kondu.

### 3.3.2 Alkilfenol Ölçümü:

Standart alkilfenol türevleri etil alkol içerisinde çözülerek stok solüsyonlar hazırlandı. 0,2203 gr nonilfenol; 0,206 gr oktilfenol; 0,150 gr bütilfenol; 100 ml etanol içerisinde çözülerek 10 mM stok solüsyonu hazırlandı. 1, 0.5, 0.1, 0.05 ve 0.05 mM solüsyonlar 10 mM stok solüsyonunun seyreltilmesi ile elde edildi. Örneğin, 1 mM elde etmek için 10 mM solüsyondan 100 µl alınarak 900 µl etanol içerisinde seyreltildi. Standart alkilfenol solüsyonlarının ölçümler için Luna C18 (İSOKRATİK) HPLC (4,6x250 mm, 5 µl) kolonu ile normal faz ve isokratik HPLC yöntemi kullanıldı. Solid ve polar olmayan faz oktadesil silika, sıvı ve polar faz olarak da % 100 HPLC kalitede metanol kullanıldı. HPLC'de 0.2 ml/min akış hızında, 277 nm dalga boyunda takip edilerek, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan nonilfenol, oktilfenol ve



bütiflenol standart çözeltileri kullanıldı. Standart çözeltilerden 25 µl HPLC'ye yüklenerek ölçümler yapıldı. Doğadan alınan su ve sediman örneklerinden özütlenen alkilfenoller de aynı şekilde kolona yüklenerek HPLC de ayrışmaları yapıldı.

### 3.3.3 Sularda Alkilfenol Özütlemesi:

Alkilfenollerin sudaki çözünürlüğü çok düşük olduğundan, sularda doğrudan ölçüm yapıldığında, varlıklarının belirlenmesi imkansızdır. Bu nedenle, ölçüm için alkilfenol bileşiklerinin su örneklerinden konsantre edilip, HPLC çözücüsü içerisinde çözünebilir hale getirilmesi gerekmektedir. Konsantrasyon amacıyla, su örnekleri, C18 BOND ELUTE kartuşlarından filtre edildi. Su içerisinde bulunan, alkilfenol bileşikleri C18 kartuşlar içindeki oktadesil silika tarafından tutulmaktadır. Oktadesil silika tarafından tutulan alkilfenol bileşikleri metanol ile yıkandığı zaman, kartuşlardan serbest kalıp, metanol içerisine geçmektedir (Marcomini ve arkadaşları, 1987). Böylece, alkilfenol bileşikleri sulardan C18 BOND ELUT kartuşu ile ayrılıp, metanol içerisinde toplanarak ölçülecek hale getirilmektedir. Deiyonize su örneğine eklenen standart alkilfenol konsantrasyonları, istenilen oranda konsantre edilerek ölçülebilmektedir. Örneğin, 100 ml deiyonize su örneğindeki 10 µM alkilfenol konsantrasyonu, C18 BOND ELUT kartuşundan geçirildikten sonra, kartuş 10 ml metanol ile yıkanarak 10 defa konsantre edilmiş oldu. Böylece, deiyonize su içerisine konan 10 µM, yukarıda tarif edilen yöntemle 10 defa konsantre edilerek 100 µM konsantrasyona ulaşılmaktadır. Şekil 1'de şematik olarak gösterilen istasyonlardan, 2 litre yüzey suyu alındı, son hacimde % 10 olacak şekilde formaldehit ilave edildi karanlıkta ve 4 derece sıcaklıkta ölçümlere kadar bekletildi. Su örneklerinden 100 ml, C18 BOND ELUTE kartuşlarından filtre edildi. Kartuş 10 ml metanol ile yıkanarak, kartuşta tutulan alkilfenoller konsantre olarak alındı. 25 µl miktarda HPLC ye uygulandı ve daha önce anlatıldığı gibi HPLC de, standart grafiklerdeki eğim kullanılarak, alkilfenol hesabı yapıldı. Alkilfenol miktarı µg/litre olarak ifade edildi.

### 3.3.4 Sedimanlarda Alkilfenol Özütlemesi:

Su örneklerinin toplandığı istasyonlardan, dipten 5-10 cm derinlikten yarım kilo civarında sedim numuneleri alındı. İçine son hacimde %10 olacak şekilde formaldehit ilave edilerek, özütleme yapıncaya kadar saklandı. Ölçümler öncesinde sedimin çökelmiş kısımdan 50 gr tartıldı, 4 g NaCl ile karıştırıldı ve 25 ml metanol ile yıkandı. Daha sonra metanol süspansiyonu filtre kağıdından süzüldü. Filtre kağıdı methanol ile tekrar yıkandı. Böylece sediman içerisinde bulunan alkilfenol bileşikleri metanol içerisinde, süzüntüde toplandı. Süzüntüden 25 µl alınarak HPLC de alkilfenol miktarı tayin edildi. Özütleme işleminin verimi sediman içine 200 µl alkilfenol ilave edilerek aynı işlemin tekrarlanmasıyla hesaplandı. Alkilfenol miktarları µg/g sediman olarak ifade edildi.

### 3.3.5 Dokularda Alkilfenol Özütlemesi:

Laboratuvar koşullarında alkilfenollere maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Ochorynchus mykiss*) ve japon balıkları kullanılarak dokulardan alkilfenol özütleme çalışmaları yapıldı. Zhao ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği tekniğe benzer bir teknik geliştirildi. Balıklar örneklendikten sonra sıvı azotta dondurularak -22 °C'de ölçüm zamanına kadar saklandı. Alkilfenol ölçümü için, dondurulmuş balık

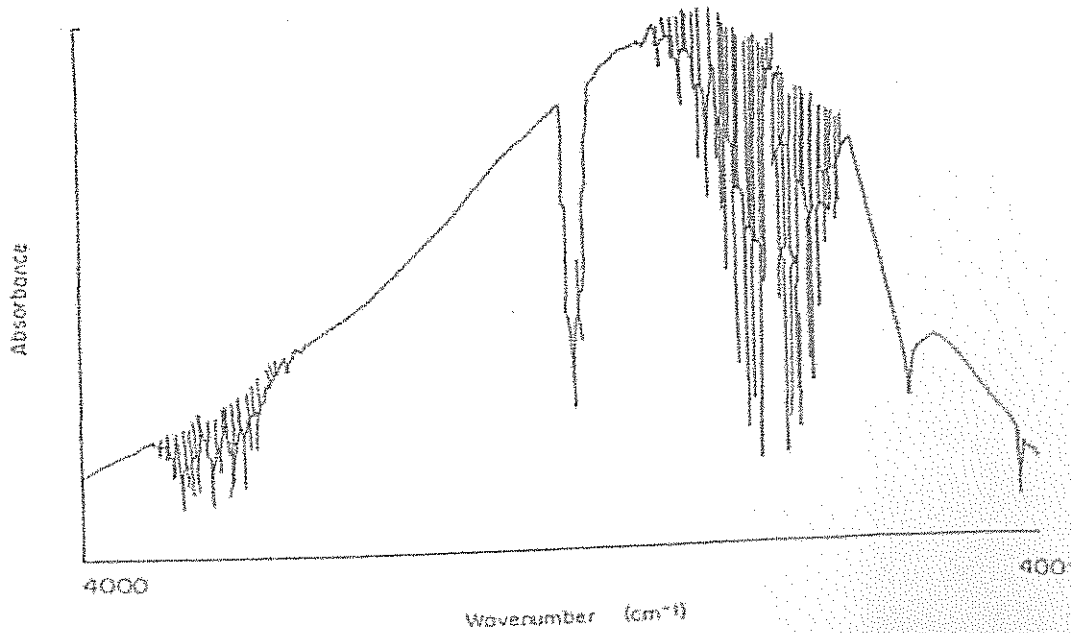
dokularından belli ağırlıkta parçalar kırıldı ve havanda ezilerek toz haline getirildi. Bu işlem esnasında, donmuş dokuların erimemesi için sürekli sıvı azot eklendi. Dokular toz gibi ince ezildikten sonra, metanol ile iyice karıştırılarak yıkandı. Metanol doku karışımından 1.5 ml alındı ve 12,000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant karıştırılmadan ayrıldı ve 25 µl örneklerde HPLC'de alkilfenol miktarı saptandı.

### 3.3.6 FTIR çalışmaları için numune hazırlanması:

5 mg karaciğer örneği HETO-MAXI dondurucu-kurutucuda 12 saat boyunca kurutuldu. Dondurulmuş doku sıvı nitrojende havan içinde ezilerek toz haline getirildi. 1 mg karaciğer tozu, 100 mg KBr ile karıştırıldı (1:100, w/w). Karışım HETO-MAXI kurutucuda 6 saat daha kurutuldu ve vaküm uygulandı. Ardından yaklaşık 1100 kg/cm<sup>2</sup> basınç uygulandı ve oluşturulan pelet tamamen geçirgenleştirildi (STUART, 1977).

### 3.3.7 FTIR Çalışmaları:

IR spektra BOMEM 157 FTIR Spektrofotometresinde alındı. Sinyalleri bozduğundan, su buharı ortamdaki sürekli kuru hava püskürtülmesiyle uzaklaştırıldı. Su ve havadaki karbondioksit spektrum ile etkileşir. Bu nedenle havanın spektrumu alınır ve ölçülen diğer spektrallardan otomatik olarak çıkarılır. Şekil 2 havanın FTIR spektrumunu göstermektedir. Karaciğer örneklerinin FTIR spektrumu 4000-400 cm<sup>-1</sup> arasında oda sıcaklığında alındı. Aynı koşullarda 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında çekilen hava spektrumu alınan spektrundan çıkarıldı. Kontrol ve NP verilmiş balıkların karaciğerlerinin FTIR spektrumlarını karşılaştırmak için, spektralar normalize edildi. Normalizasyonun amacı, farklı zamanlarda aynı örnek için alınmış spektraların pik boyları arasındaki farkları yok etmektir. Normalizasyon nokta-nokta karşılaştırma yapılmasını sağlamaktadır.



Şekil 2. Havanın IR spektrumu.

### 3.3.8 Histolojik Doku Hazırlama Yöntemi

Yukarıda da bahsedildiği gibi balık gonadları Bouin's solüsyonu içerisinde 24 saat sabitleştirildi ve sonra normal musluk suyu ile yıkanarak % 70 etil alkol içerisinde muhafaza edildi. Dokuların histolojik incelenmesinde rutin olarak kullanılan, dokuların parafin bloklar içerisinde dondurulma işlemi yapıldı. Parafin içinde dondurulmuş, dokular, Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesildi ve hematoksilin-eozin boyama yöntemi ile boyanarak normal ışık mikroskobu altında incelendi.

### 3.3.9 Balık karaciğer homojenatının Hazırlanması

İstasyonlardan yakalanan veya laboratuvarında akvaryumlarda alınan balıklardan karaciğerler kısmen aseptik koşullarda soğuk odada çıkarıldı ve soğuk % 1.15 KCl ile yıkanarak kanından arıtılarak hemen kullanıldı veya sıvı nitrojende dondurularak saklandı. GST aktivitesi ölçümlerine hazırlanmak üzere bu çözölen doku 20 mM potasyum fostat tamponu içeren % 1,15 KCL içinde cam-cam homogenizatörde düşük hızda (5 kez) homojenize edildi. 12,000 X g de 30 dakika soğutmalı mikrofüjde çevrilerek, debris, nukleus ve mitokondri uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatat (S9 fraksiyonu) hemen kullanıldı veya -80°C'de dondurularak saklandı. Protein miktarı belirlendi ve GST aktivitesi ölçümlerinde kullanıldı.

### 3.3.10 Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini

Balık örneklerindeki glutasyon s-transferaz aktivitesi Habig ve arkadaşlarının 1974 de sıçan karaciğeri için geliştirdikleri yöntem örnek alınarak 340 nm'de spektrofotometrede belirlenmiştir. Aktivite tayin koşulları balık karaciğerine göre optimize edilmiştir. Tipik bir reaksiyon ortamında, son hacimde, 1.0 mM substrat CDNB, 1.0 mM kofaktör GSH, 0.1 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.0, ve uygun miktarlarda balık karaciğeri homojenatı bulunur. Reaksiyonlar karışıma substrat ilavesiyle başlatıldı. Enzimatik olmayan reaksiyonları tayin etmek için enzim konmamış reaksiyon ortamındaki (kör) absorbans değışikliğı spektrofotometrede takip edildi. Bu şartlarda alınan reaksiyonların eğimi, enzim varlığında yapılan reaksiyonlardan elde edilen eğim değerlerinden çıkarılarak ve  $9,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  katsayısı kullanılarak hesaplamalar yapıldı. GST aktivitesi ünite/mg protein olarak ifade edildi.

### 3.3.11 Vitellogenin Tayini

Vitellogenin laboratuvarında NP verilmiş ve kontrol alabalıkların kanlarında tayin edildi. Her bir balıktan kanlar heparinli tüplere alınarak, içlerine 0,5 µg/ml olacak şekilde Pepsitatin A (proteaz inhibitörü) ilave edildi. 4000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatat kısım (plasma) ayrılarak eppendorf tüplerde -80°C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Vitellogenin tayini için Cayman Chemicals'ın Vitellogenin Elisa Immunoassay testi kiti kullanıldı ve kit prosedürü aynen uygulandı. Çizilen standart eğrinin eğimi kullanılarak plasma örneklerindeki vitellogenin miktarı hesaplandı. Plasma için 1/2000, 1/5000 ve 1/10000 seyreltmeleri kullanıldı.

### 3.3.12 İstatistik analiz:

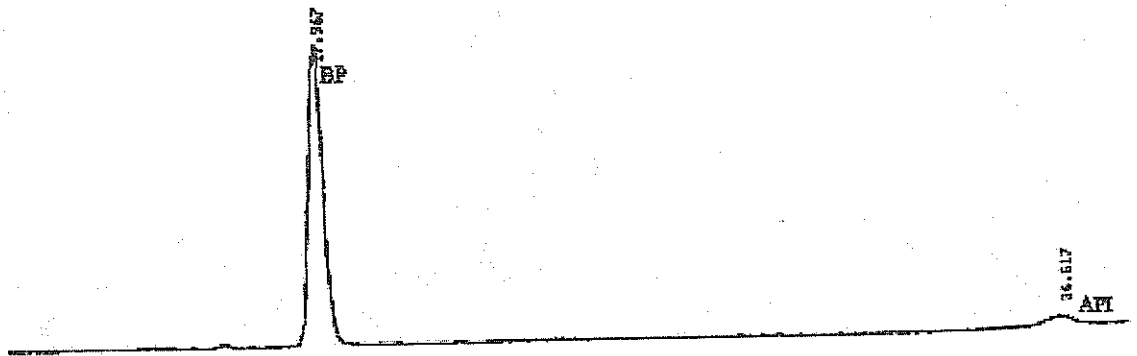
Kontrol ve NP verilmiş örneklerdeki farkın karşılaştırılması t-testi ile yapılmıştır. 0,05 den küçük p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## 4 Bulgular

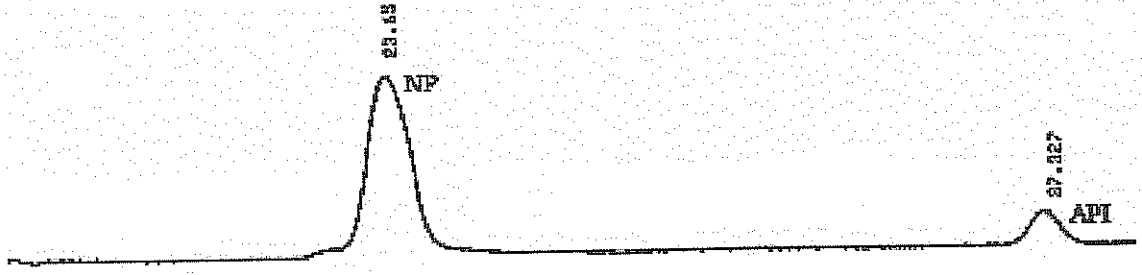
### 4.1 Alkilfenol Standart Ölçümleri

Standart alkilfenol türevleri etil alkol içerisinde çözülerek stok solüsyonlar hazırlandı. 0,2203 gr nonilfenol; 0,206 gr oktilfenol; 0,150 gr bütilfenol; 100 ml etanol içerisinde çözülerek 10 mM stok solüsyonu hazırlandı. 1, 0.5, 0.1, 0.05 ve 0.05 mM solüsyonlar 10 mM stok solüsyonunun seyreltilmesi ile elde edildi. Örneğin, 1 mM elde etmek için 10 mM solüsyondan 100 µl alınarak 900 µl etanol içerisinde seyreltildi. Etanol içerisinde hazırlanan solüsyonlarda, alkilfenol türevlerini birbirinden ayırmak özellikle oktilfenol ve nonilfenol bileşiklerini ayırmak mümkün olmadığından, solüsyonlar aynı yöntemle metanol içerisinde hazırlandı. Metanol içerisinde hazırlanan solüsyonlarda nonilfenol ve oktilfenolü birbirinden ayırmak mümkün hale geldi.

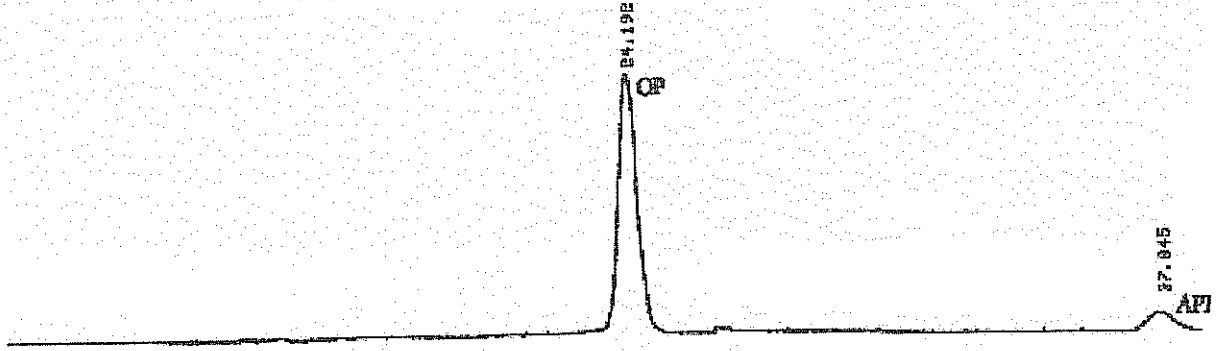
Şekil 3, 4, 5 ve 6'da, standart alkilfenol türevleri olan nonilfenol (NP), bütilfenol (BP) ve oktilfenol (OP)'nin, C18 oktadesil silika kolonundan tutulma zamanları 17, 23 ve 24 dakikadır. Bütilfenolün HPLC'de verdiği peak ve kolonda tutulma zamanı Şekil 3'de, nonilfenolün Şekil 4'de ve oktilfenolün ise Şekil 5 de görülmektedir. Bütilfenol, nonilfenol ve oktilfenol metanol içerisinde çözünerek elde edilen karışımının HPL analizi ise Şekil 6 da görülmektedir. Şekil 6'da görüldüğü gibi nonilfenol ve oktilfenolün tutulma zamanı 23 ve 24. dakikada örtüşmektedir. Nonilfenol, oktilfenolden yaklaşık 30 saniye daha geç çıkmaktadır (Şekil 6). Ayrıca, standart alkilfenol türevlerinin ayrı ayrı ve birlikte ölçümlerinde görülen ve tutulma zamanı 37 dakika olan bir peak daha vardır ve bu peak alkilfenol ilintili indikatör olarak adlandırılmıştır (Şekil 3-6). Bu ayrışmanın etoksi ünitesi olduğu tahmin edilmektedir.



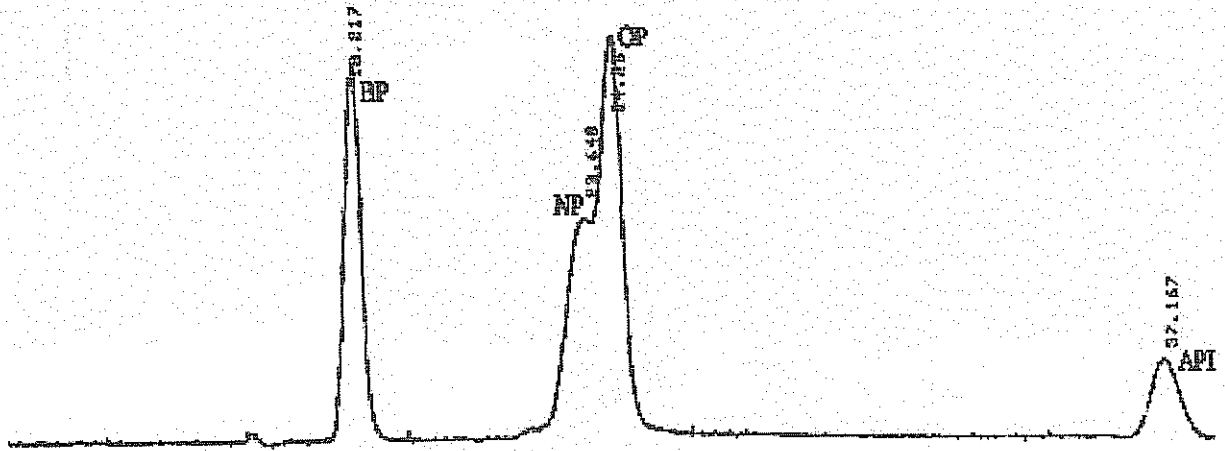
Şekil 3. Standart 0.5 mM (75µg/ml) 4-tert-butilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili. (BP, butilfenol; API, alkylphenol ilintili indikatör.)



Şekil 4. Standart 0.5 mM (110 µg/ml) nonilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili. ( NP, nonylphenol; API, alkylphenol ilintili indikatör)



Şekil 5. Standart 0.5 mM (103 µg/ml) 4-*tert*-oktilfenol çözeltisinin izokratik ve normal faz HPLC profili (OP, octylphenol; API, alkylphenol ilintili indikatör)



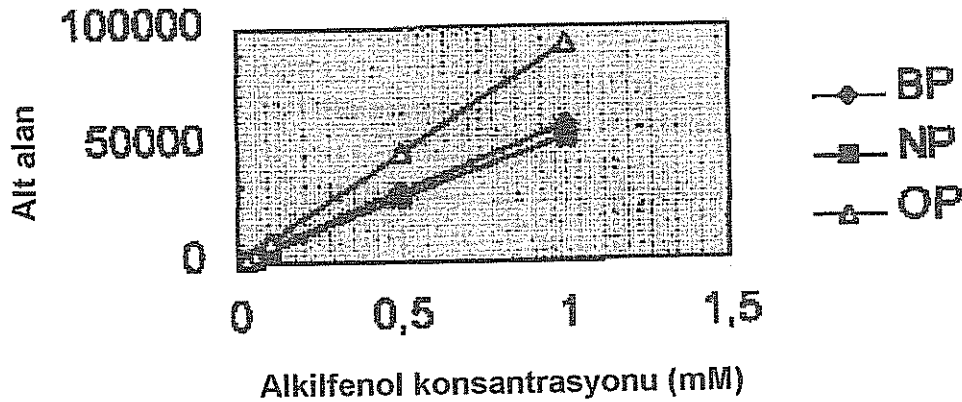
Şekil 6. Standart alkilfenol bütilfenol, nonilfenol ve oktilfenol karışımının izokratik ve normal faz HPLC profili. (75 µg/ml bütilfenol (BP); 110 µg/ml nonilfenol (NP); 103 µg/ml oktilfenol (OP) metanol çözeltisi; API, alkilfenol ilintili indikatör)

Alkilfenol bileşikleri NP, BP ve OP ayrı ayrı, değişik konsantrasyonlarda ölçülerek, her konsantrasyona denk düşen minimum altalan değerleri tespit edildi.

Tablo 1. Standart Alkilfenol Çözeltilerinin HPLC'de okunan profil alt alan değerleri

Konsant- rasyon (mM)	Standart alkilfenol türevlerinin HPLC'de verdikleri eğri altı alan değerleri						
	Bütilfenol		Nonilfenol		Oktilfenol		API
	µg/ml	alan mean±SE n=2	µg/ml	alan mean±SE n=2	µg/ml	alan mean±SE n=2	alan mean±SE n=2
1	150	57757±168	220	52330±156	206	93127±110	21303±60
0.5	75	29848±197	110	27356±455	103	46570±427	10033±115
0.1	15	5933±433	22	5006±296	20.6	9508±186	2139±294
0.05	7.5	2722±89	11	2060±256	10.3	3795±205	816±8.48
0.025	3.75	1346±9	5.5	569±38.8	5.15	1416±118	482±34

Şekil 7, standart alkilfenol çözeltilerinden elde edilen Standart Grafikleri göstermektedir. Bu grafikler kullanılarak, örneklerden ölçülen alkilfenol miktarları mM konsantrasyon veya µg/ml olarak hesaplanmıştır.

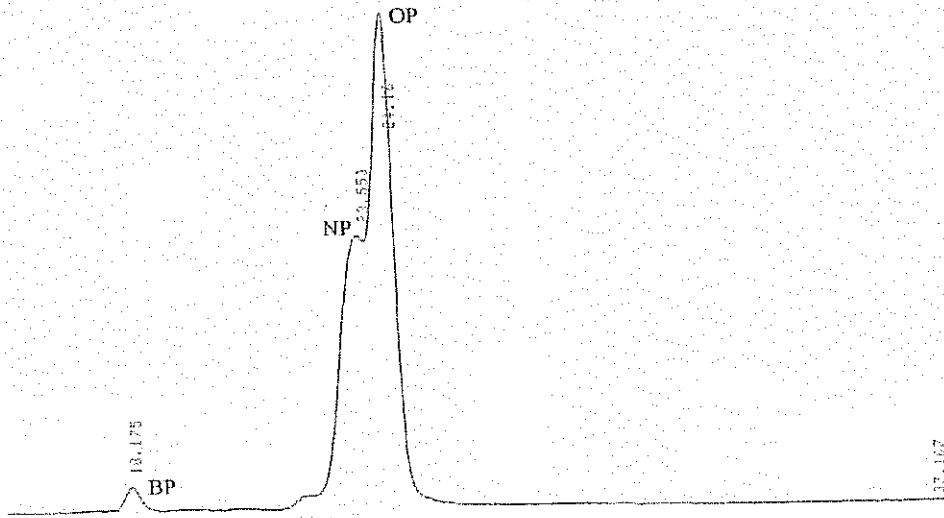


Şekil 7. Alkilfenol standart grafiği

#### 4.1.1 Su Örneklerinde Alkilfenol Özütlenme Verimi

Ölçüm için alkilfenol bileşiklerinin su örneklerinden özütlenip, HPLC çözücüsü içerisinde çözünebilir hale getirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, su örnekleri, C18 BOND ELUTE kartuşlarından filtre edildi. Su içerisinde bulunan, alkilfenol bileşikleri C18 kartuşlar içindeki oktadesil silika tarafından tutulmaktadır. Oktadesil silika

tarafından tutulan alkilfenol bileşikleri metanol ile yıkandığı zaman, kartuşlardan serbest kalıp, metanol içerisine geçmektedir (Marcomini ve arkadaşları, 1987). Böylece, alkilfenol bileşikleri sulardan C18 BOND ELUT kartuşu ile ayrılıp, metanol içerisinde toplanarak ölçülecek hale getirilmektedir. Deiyonize su örneğine eklenen standart alkilfenol konsantrasyonları, istenilen oranda konsantre edilerek ölçülebilmektedir. Örneğin, 100 ml deiyonize su örneğindeki 10 µM alkilfenol konsantrasyonu, C18 BOND ELUT kartuşundan geçirildikten sonra, kartuş 10 ml metanol ile yıkanarak 10 defa konsantre edilmiş oldu. Böylece, deiyonize su içerisine konan 10 µm, yukarıda tarif edilen yöntemle 10 defa konsantre edilerek 100 µM konsantrasyona ulaşılmaktadır. C18 BOND ELUT kartuşu ile deiyonize sudan alkilfenoller konsantre etme işlemindeki duyarlılık oranı oktilfenol ve nonilfenol için bütilfenolden daha fazladır (Şekil 8). C18 BOND ELUT kartuşu ile deiyonize sudan alkilfenoller konsantre etme işlemindeki duyarlılık oranı oktilfenol ve nonilfenol için bütilfenolden daha fazladır. Kartuşlarda konsantrasyon sırasında alkilfenollerde kayıp olup olmadığını kontrol etmek için bilinen miktarlarda alkilfenoller su örneklerine ilave edilerek aynı işlem tekrarlandı. C18 BOND ELUT kartuşu ile su örneklerinden alkilfenoller konsantre etme işlemindeki verim oranı oktilfenol ve nonilfenol için bütilfenolden daha fazla bulundu. Su kompozisyonundaki değişikliklerin, ısı ve pH gibi etkenlerin özütleme verimini değiştireceği düşünüldüğünden örnekleme yapılan istasyonlardan bazı su parametreleri de kaydedildi. Tablo 3 de görüldüğü gibi, Değirmenderesi ve Sakarya nehirlerinden alınan örneklerde alkilfenol bulunamadı.



**Şekil 8.** Su örneklerinden özütlenen standart bütil, oktil, ve nonilfenolün HPLC'de ayrılma profili. BP, bütilfenol; NP, nonilfenol; OP, oktilfenol.

#### 4.1.2 Sedim Örneklerinde Alkilfenol Özütleme Verimi

Sedimanlarda alkilfenol ölçümü için 50gr sediman tartıldı ve 25 ml metanol ile yıkandı. Daha sonra metanol süspansiyonu filtre kağıdından süzüldü. Böylece

sediman içersinde bulunan alkilfenol bileşikleri metanol içersinde, süzütüde toplandı.

Sediman örneklerinde, alkilfenollerin özütlenabilirliğini test etmek için, ölçümlerde kullanılan örneklerle aynı miktarlarda sediman örneği alınarak, içersine bilinen konsantrasyonlarda alkilfenol bileşikleri eklendi ve aynı yöntemle ekstrakte (özütlenerek) edilerek, ölçümlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Örneğin, 50 gr sediman örneğine 500 µl (final konsantrasyon 200 µM) alkilfenol türevleri eklendi ve 25 ml metanol ile karıştırılarak, filtre kağıdından süzödü ve pozitif kontrol olarak alkilfenol ölçümü yapıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılmak için toprağa eklenen alkilfenol türevlerinin tekrar ekstrakte edilmesindeki duyarlılık oranı %100'dür. Ancak, Sakarya nehri ve Değirmenderesi üzerinde toplanan sediman örneklerinden ekstrakte işleme esnasında, duyarlılık örnekleme istasyonlarına göre değişmektedir. Sedimanlardaki özütleme verimi Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.** Sakarya nehri ve Değirmendere Nehri üzerinde alınan su ve sediman örneklerindeki alkilfenol özütleme verimi

Alkylphenols	Su Örnekleri			Sediman Örnekleri		
	mean n=9	stdev	% CV	mean n=9	stdev	% CV
Bütillfenol	73.55	22.79	31	29.33	18.93	65
Nonilfenol	57	17.26	31	51.5	25.8	50
Oktilfenol	63.11	19.29	31	32.8	10.31	31

#### 4.2 Sakarya Nehri ve Değirmendere Üzerindeki İstasyonlarda Su ve Sediman Örneklerindeki Alkilfenol Miktarları

Sakarya nehrinden ve Trabzon, Değirmenderesinden alınan su örneklerinde alkilfenol türevlerine rastlanmamıştır. Bu da göstermektedir ki, alkilfenol bileşikleri, hidrofobik özelliklerinden dolayı ölçülebilecek miktarlarda bulunmamaktadır. Naylor ve arkadaşları 1992'de; Ahel ve arkadaşları 1994'de, alkilfenollerin sularda değil sediman ve suda yaşayan canlılarda biriktiğini rapor etmektedirler. Tablo 2'de gösterilen özütleme verimi göz önüne alındığında, sularda bulunabilecek alkilfenol miktarları Tablo 3'de gösterilmiştir. Sakarya nehrinde hem de Değirmenderesinde iki örnekleme istasyonunda alkilfenol türevlerine rastlanmıştır Tablo 3. Sakarya Nehri üzerinde, Porsuk Çayı'ndan alınan sediman örneğinde 3.15 µg/g bütillfenol ölçülmüştür. Değirmenderesi üzerinde, Maçka'dan alınan sediman örneğinde ise 1.68µg/g bütillfenol ile 4.46 µg/gr nonilfenol ölçülmüştür. Ayrıca, Tablo 2'de gösterilen özütleme verimi göz önüne alınarak sedimanlarda hesaplanan alkilfenol değerleri Tablo 3'de gösterilmektedir. Alkilfenol türevlerine rastlanan istasyonlarda Klorofil-a ve çözünmüş oksijen seviyesi de diğer istasyonlara göre daha düşük bulunmuştur. Ancak, iki istasyonda Klorofil-a ve çözünmüş oksijen çok düşük miktarlarda çıkmasına rağmen, alkilfenol türevlerine rastlanmadı. Bu iki istasyonda, sediman yani çamur alınmadığından ve kum alınmak zorunda kalınmıştır. Değirmenderesi, Sanayi Sitesinde, kanalizasyon atıklarının denize boşaltıldığı noktadan yapılan



örnekleme de çamur örneği elde edilememiştir. Su örneklerinde alkilfenol varlığı gösterilemediyse de, Sakarya nehrinin ve Değirmenderesinin ikinci istasyonlarından alınan sedim örneklerinde nonilfenol ve bütilfenol varlığı saptandı.

#### **4.3 Değirmenderesi ve Sakarya Nehri üzerindeki istasyonlardan yakalanan Balıklardaki Alkilfenol Seviyesi**

Su ve sediman örnekleri toplanan bütün istasyonlarda-Porsuk Çayı hariç-toplanan balık örnekleri de toplanmıştır. Porsuk Çayı'nda balık yakalanamamıştır. Değirmenderesi, birinci istasyon hariç, diğer istasyonlarda yakalanan balık örneklerinde nonilfenol ve standart alkilfenollerin ölçümleri sırasında tespit edilen alkilfenol ilintili maddeye rastlanmıştır Tablo 3. Ayrıca, Değirmenderesi ikinci istasyon olan Maçka'da kanalizasyon suyunda 1 saat bekletilen gökkuşağı alabalıklarında da alkilfenol ve nonilfenol ve nonilfenol ilintili maddelere rastlanmıştır Tablo 3.

Alkilfenol etoksilat bileşiklerinin Japon balıkları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Laboratuvardaki ön çalışmalarımız, Japon balıklarının nonilfenolü çok hızlı bir şekilde vücutlarına aldığı (Tablo 5). Nonilfenolün, sudan Japon balıklarının dokularına geçişi doza bağlı olarak artmakta ve çok kısa bir sürede balıklarda ölüme neden olmaktadır. Düşük konsantrasyonda nonilfenolün balık dokusuna geçişi azalmaktadır. Balıklar düşük dozlarda daha uzun yaşamaktadırlar. Bu konu üzerinde daha detaylı çalışma yapılması gerekmektedir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi API, standart alkilfenol ölçümlerinin hepsinde görülen ve HPLC'deki tutulma zamanı 37 dakika olan bir maddedir. Bu maddenin ne olduğu bilinmemektedir. Ancak, alkilfenollerin etoksi ünitesi olma ihtimali büyüktür. Ahel et al. (1985) rapor etmiştir ki, ticari olarak elde edilen nonilfenol gibi alkilfenol türevleri, saf değildir. Örneğin, ticari olarak Aldrich firmasından elde edilen nonilfenolün, etoksi ünitesine sahip nonilfenol etoksilat hatta oktilfenol ve oktilfenol etoksilat içerdiği rapor edilmektedir (Ahel ve Giger, 1985).

Suyun fizyolojik ve kimyasal özellikleri özütleme verimini etkileyeceğinden, istasyonlardan alınan su örneklerinde suyun kalitesini belirleyen, çözünmüş oksijen, pH ve sıcaklık gibi bazı parametreler de tayin edildi.

Tablo 5. Sakarya ve Değirmendere ırmaklarından alınan su, sediment, doğal balık ve akvaryum balık örneklerinin AP ve API içerikleri

Örnekler	AP'ler ve API	Sakarya Irmağı					Değirmendere Irmağı				
		S1	S2**	S3	S4	S5	D1	D2**	D3	D4	
Sediment	NP (µg/g)	<2,4	<3,38	<3,03	<1,33	<0,76	<0,4	4,46	<2,24	<3,24	
	OP (µg/g)	<1,57	<2,48	<1,56	<1,46	<1,46	<0,57	<1,91	<2,24	<1,83	
	BP (µg/g)	<2,63	3,15	<1,6	<3,23	<3,02	<0,3	1,68	<0,82	<0,79	
	API (zirve alanı)	526	642	320	-	402	-	1043	383	-	
Su	NP (µg/g)	<0,3	<0,25	<0,19	<0,37	<0,36	<0,2	<0,4	<0,3	<0,5	
	OP (µg/g)	<0,3	<0,25	<0,20	<0,50	<0,43	<0,1	<0,3	<0,3	<0,4	
	BP (µg/g)	<0,3	<0,36	<0,25	<0,32	0,38	<0,2	<0,2	<0,2	<0,4	
	API (zirve alanı)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Doğal balık	NP (µg/g)	0,31 ± 0,2 n=3	*	0,10 ± 0,6 n=5	0,21 ± 0,1 n=2	-	-	0,26 ± 0,2 n=5	0,59 ± 0,6 n=4	0,11 ± 0,1 n=3	
	OP (µg/g)	-	*	-	-	-	-	-	-	-	
	BP (µg/g)	-	*	-	-	-	-	-	-	-	
	API (zirve alanı ± se)	154 ± 150 n=3	*	430 ± 267,5 n=5	564 ± 179 n=2	172 ± 172 n=2	-	945 ± 515,6 n=5	131,5 ± 131 n=4	209 ± 209 n=3	
Alfın balık	NP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	OP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	API (zirve alanı ± se)	-	0,1 n=1	-	-	-	-	0,07 n=3	-	-	
R.trout	NP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	0,075 ± 0,07 n=3	-	-	
	OP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BP (µg/g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	API (zirve alanı ± se)	-	-	-	-	-	-	624,5 ± 10,3 n=3	-	-	

**Tablo 4.** Değirmendere ve Sakarya nehrinde su kalitesine ilişkin parametreler

Parametreler	Sakarya nehri					Değirmendere			
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Çözülmüş O <sub>2</sub> (mg/l)	8.68	4.5	8.8	7.6	6.7	9.45	8.34	9.14	7.92
pH	7.43	7.10	7.78	7.86	7.86	7.9	8.02	8.32	8.41
Sıcaklık (°C)	19.1	19.1	19.7	26	25.5	13.4	22.4	21.9	24.5

#### 4.4 Nonilfenol'ün balık dokularında birikimi

Tablo 5'de değişik nonilfenol konsantrasyonlarına maruz bırakılan Japon balıklarının yaşama süresi ve dokularındaki nonilfenol birikiminin HPLC ile ölçüm sonuçları görülmektedir.

**Tablo 5.** Değişik nonilfenol konsantrasyonlarına maruz bırakılan, Japon balıklarının yaşama süresi ve dokularındaki nonilfenol birikiminin HPLC ile ölçümü

Nonilfenol Konsantrasyonu (mg/L)	Kullanılan Balık Sayısı	Balığın yaşama süresi (dakika)	Nonilfenolün Balıkta birikimi (µg/g doku ± SE)	API peak alanı ±SE
kontrol	3	1440*	0	0
220	3	10	9.15 ± 0.16	6658 ± 97.9
22	3	30	6.58 ± 0.91	6312 ± 144.5
2.2	3	180	5.62 ± 0.51	6161 ± 3.95
0.22	3	1440*	0.95 ± 0.29	6076 ± 48.5

Alabalıklar farklı dozlarda ve farklı sürelerle nonilfenole maruz bırakıldı. Tablo 6'da farklı konsantrasyonların iki hafta süreyle alabalık dokularında birikimini göstermektedir.

**Tablo 6.** Alabalık dokularında nonilfenol birikimi

Süre (hafta)	Nonilfenol Konsantrasyonu (µg/l) ve doku miktarı (µg/g doku)			
	0	66	220	660*
2	0	0,165±0,04	0,692±0,17 <sup>a</sup>	1,37±0,213

\*Bu tanktaki balıklar 4 günde öldüler

<sup>a</sup>Kontrol grubundan farklı, p<0,05

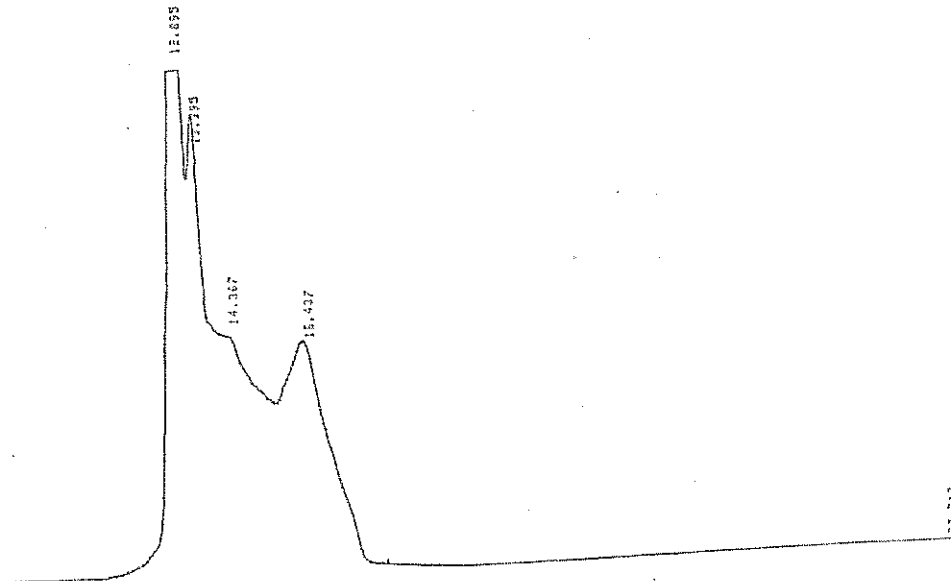
220µg/l konsantrasyondaki nonilfenol ilave edilen tanktaki balıklar ölmeden üç haftaya kadar yaşamlarını sürdürdüler(Tablo 7). Bu konsantrasyonda daha uzun süre bırakıldıklarında (4 hafta) , ölümler başladı. Farklı sürelerle muamele edilen balıkların kontrolleri de aynı sürelerde ve aynı şartlarda akvaryumlarda tutuldu.

**Tablo 7.** Farklı sürelerde nonilfenol muamelesinin birikime etkisi

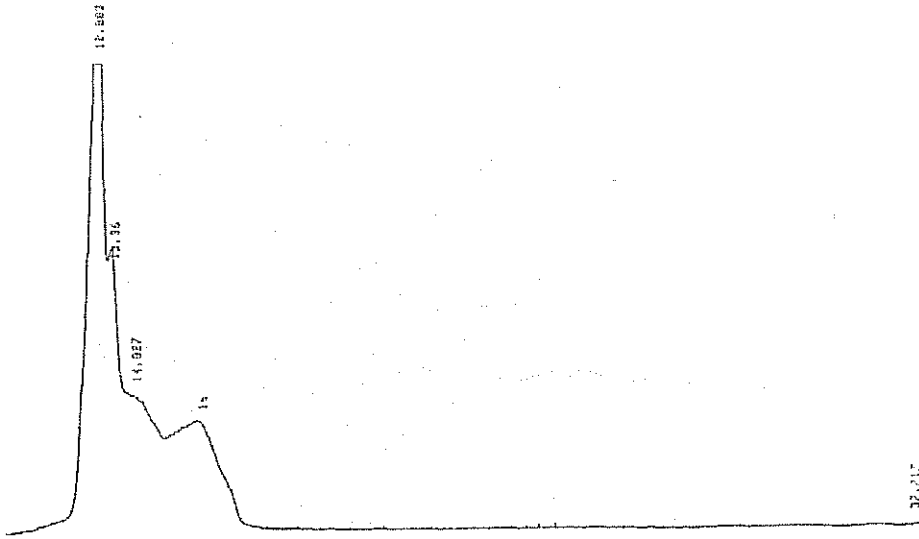
Nonilfenol konsantrasyonu (µg/l)	Süre (hafta)		
	1	2	3
Kontrol	0	0	0
220	0,121±0,07	0,692±0,17 <sup>α</sup>	1,27±0,45 <sup>β</sup>

<sup>α,β</sup> Kontrollerinden ve birbirlerinden farklı, p<0,05

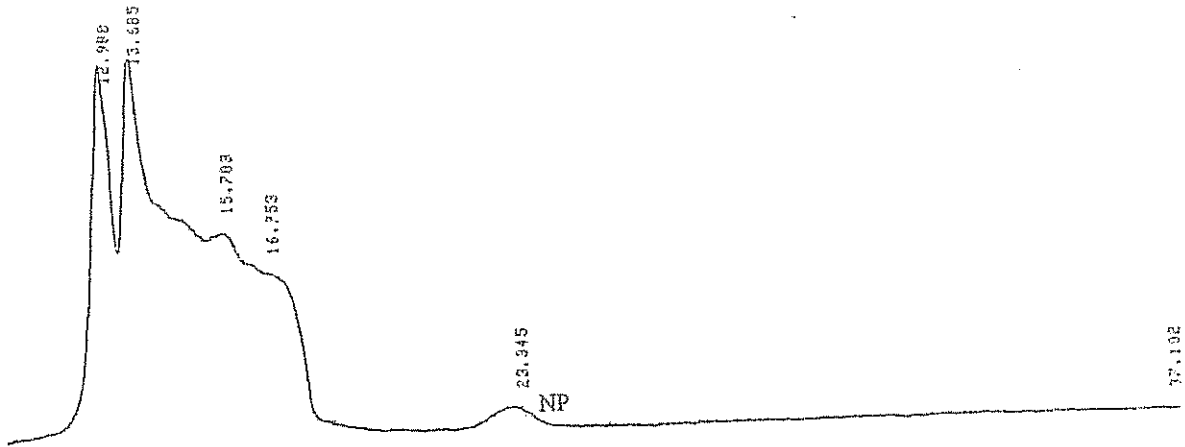
Tablolarda sonuçları verilen akvaryum deneyleri en az 3 kez tekrarlanmıştır. Her şart için tanklarda bulunan en az 5 balıktan, her birinden ayrı ayrı ikişer özüt hazırlanmış ve her özütten ikişer kez HPLC ölçümü yapılmıştır. Tabloda verilen değerler bu ölçümlerin sonuçlarının ortalamasıdır. Şekil 9-12'de farklı nonilfenol konsantrasyonlarında ve farklı sürelerle muamele edilmiş alabalıklardan elde edilen özütlerde HPLC ölçümlerinden örnekler verilmiştir.



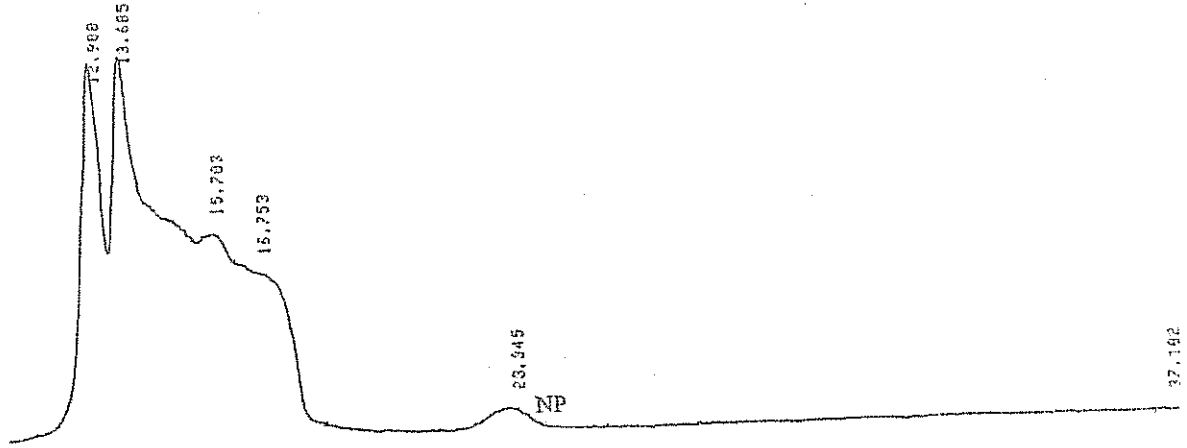
**Şekil 9.** Kontrol grup alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili



**Şekil 10.** 66 µg/L NP ile bir hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili



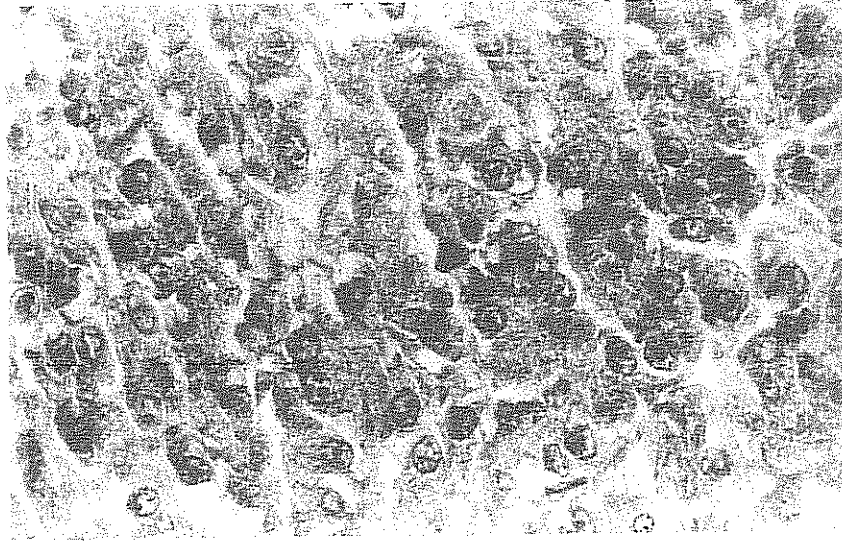
**Şekil 11.** 220 µg/L NP ile bir hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili



**Şekil 12.** 660 µg/L NP ile 1 hafta muamele edilen alabalık karaciğeri özütünün izokratik ve normal faz HPLC profili

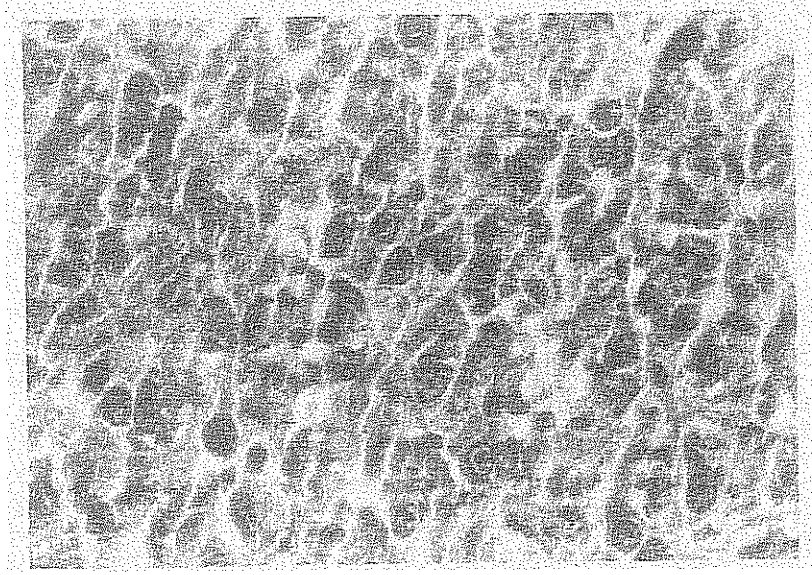
#### 4.5 Nonilfenol'ün Alabalık Karaciğer dokusundaki Histopatolojik Etkileri

Farklı konsantrasyonlarda NP ve 17β-estradiol'a farklı sürelerle maruz kalan alabalık karaciğerlerinin histolojik inceleme sonuçları Şekil 13-18'de görülmektedir. Kontrol grupta hiçbir patolojik anormallik yoktur (Şekil 13). Gayet düzenli oluşmuş sinüsler ile normal hücreler düzenli yerleşmişlerdir.



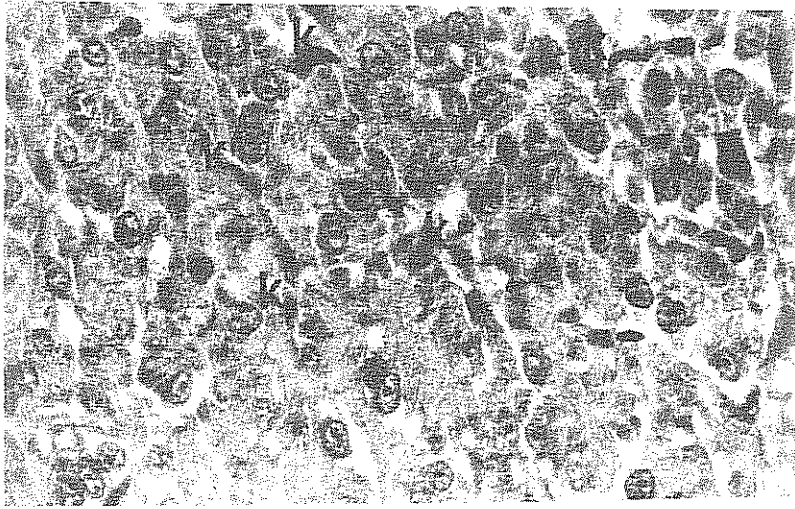
**Şekil 13.** Kontrol gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (100x)

NP'nin etkilerinin estrojeni taklit ettiği bilindiğinden, 17 $\beta$ -estradiol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. NP etkileri bu hücrelerle karşılaştırılmıştır (Şekil 14).

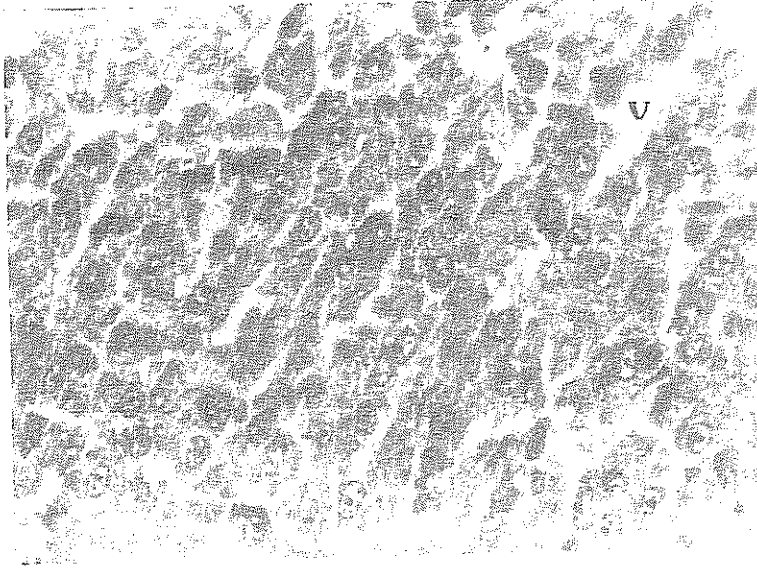


**Şekil 14.** Pozitif kontrol (2,7 µg/L 17 $\beta$ -estradiol (E2) ile muamele edilmiş) gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (1000x)

220 µg/L NP'ye maruz bırakılan balıkların karaciğerleri 1. haftada normal görülmekle birlikte (Şekil 15), Kupfer hücrelerinin sayısında artış görülmektedir. 2 haftadan sonra Kupfer hücrelerinde azalma başlamış ve vakuoller belirlemiştir (Şekil 16). Sinüsoidler de genişlemiştir. Hücre sınırları kayblmuş, hücre çekirdekleri büyümüştür.

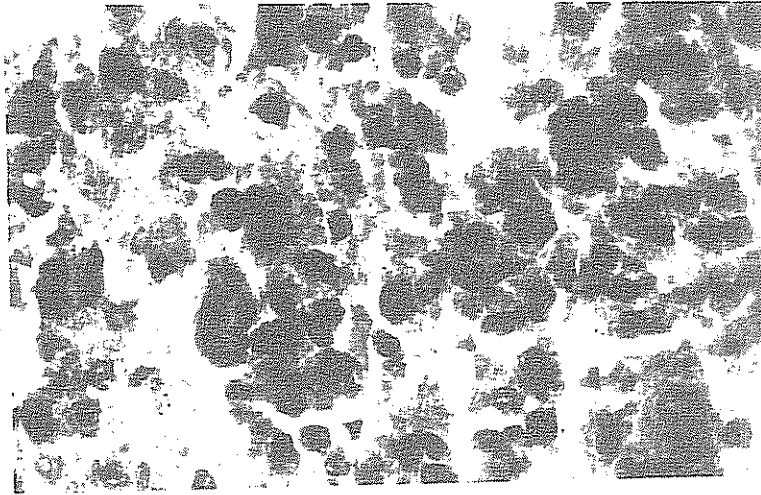


**Şekil 15.** 220 µg/L NP ile bir hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (1000x) K: Kupfer hücreleri.



**Şekil 16.** 220 µg/L NP ile iki hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (1000x) K: Kupfer hücreleri.

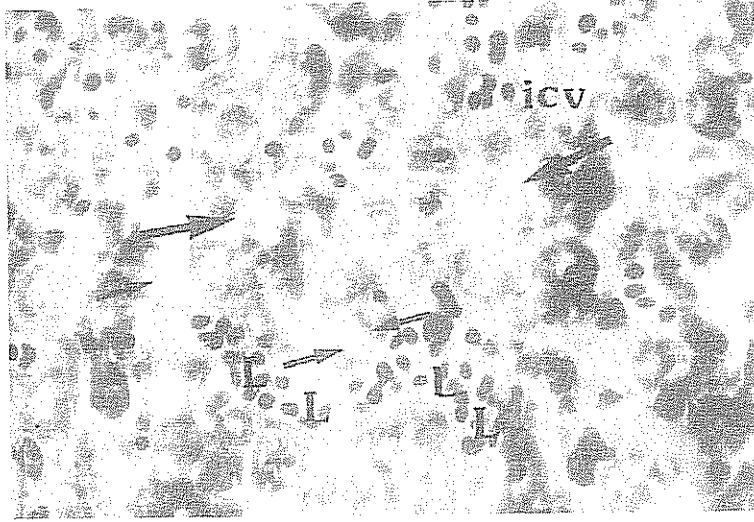
3 hafta sonra karaciğer hücre sayısında azalma başlamış ve hücreler boşlukta yüzer görüntü almıştır (Şekil 17).



**Şekil 17.** 220 µg/L NP ile üç hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (1000x) K: Kupfer hücreleri.



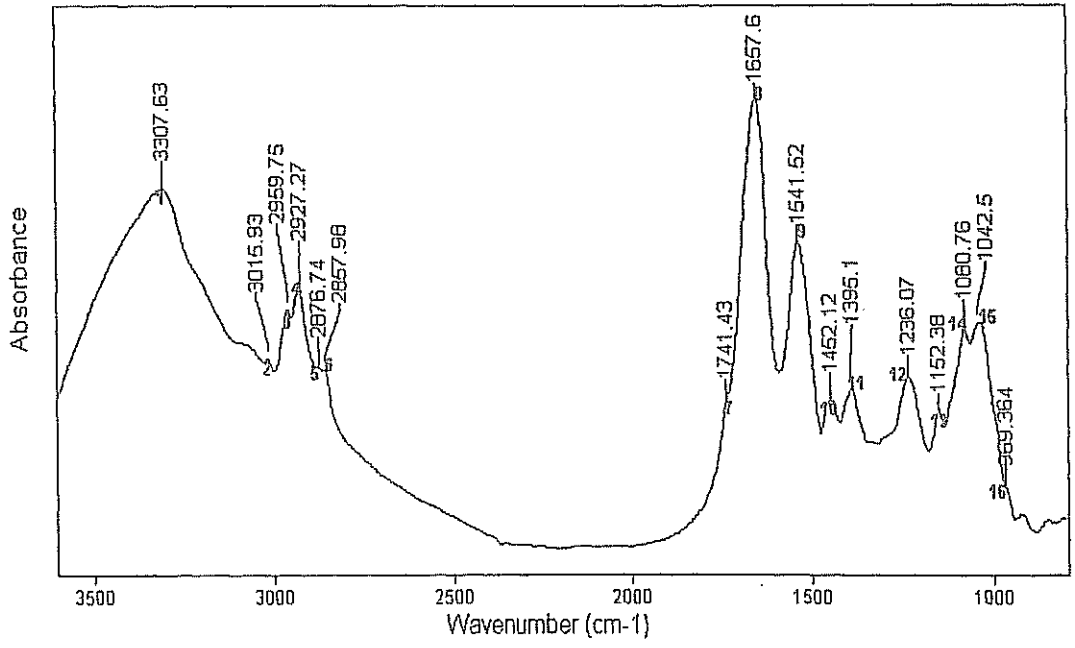
4 hafta sonra ise, kanama ve lenfosit infiltrasyonu görülmektedir (Şekil 18). Ekstrasellüler bölgede ve sitozolde vaküller büyümüştür. Normal düzenli karaciğer hücre organizasyonu yok olmuştur.



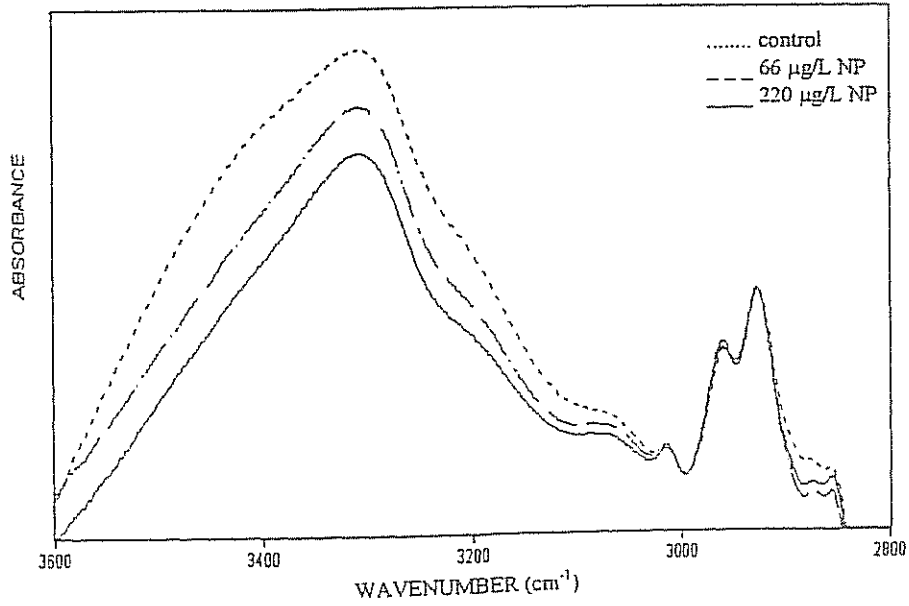
**Şekil 18.** 220 µg/L NP ile dört hafta süreyle muamele edilmiş gruptan alınan Hematoksilin-Eosin ile boyanmış alabalık karaciğer kesitinin mikroskopik görüntüsü (1000x) L, lenfositler; icv, hücre içi vaküller; oklar, vakül oluşumu.

#### 4.6 Nonilfenol'ün Alabalık Karaciğer dokusundaki moleküler etkilerinin FTIR ile incelenmesi

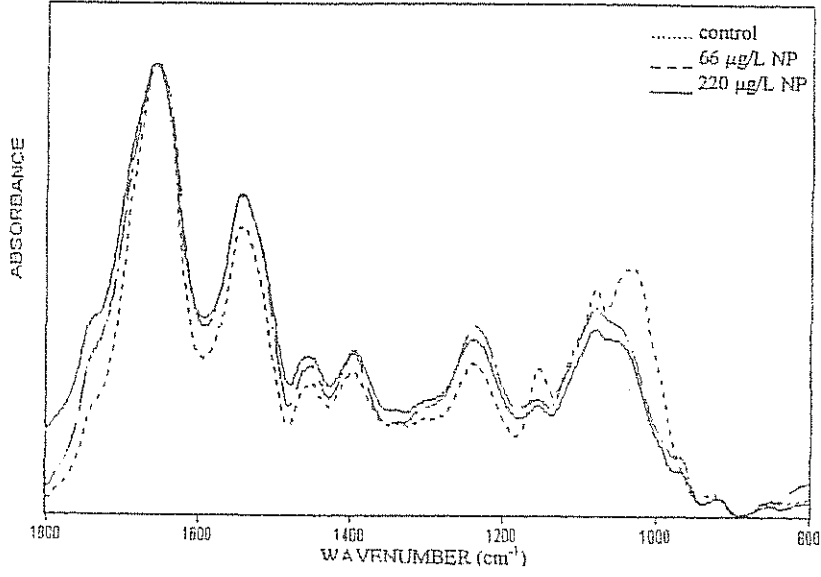
660 µg/L NP'ye maruz bırakılan balıklardan çoğu öldüğünden, 66 µg/L ve 220 µg/L NP ile yapılan çalışmalardan alınan balık karaciğerlerinde FT-IR spektrumları alınmıştır. Şekil 19 daki kontrol karaciğer 3600-800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesi spektrumundan görüldüğü gibi, karbonhidrat, lipit, protein ve nükleik asitlere ait bir çok banttın oluşan karmaşık bir spektrum elde edilmiştir. Özellikle 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  ve 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  bölgelerinde NP maruziyeti süresi ve dozuna bağlı frekans, intensite ve bant genişliğinde değişkenlik gösteren hatırısayılır sayıda FT-IR bandı gözlenmiştir. En belirgin değişiklikler, 220 µg/L NP'ye iki hafta süreyle maruz kalan balıkların karaciğerlerinde ortaya çıkmıştır.



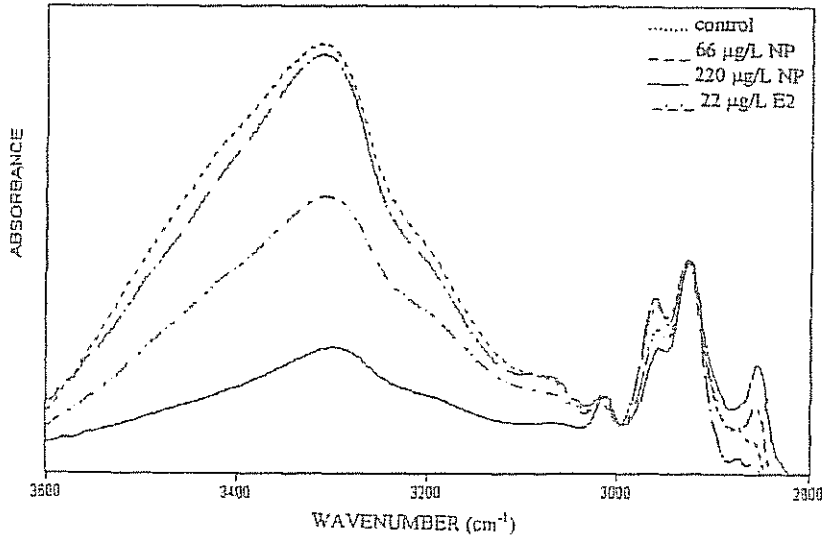
**Şekil 19.** Kontrol alabalık karaciğerinden alınan FT-IR spektrası



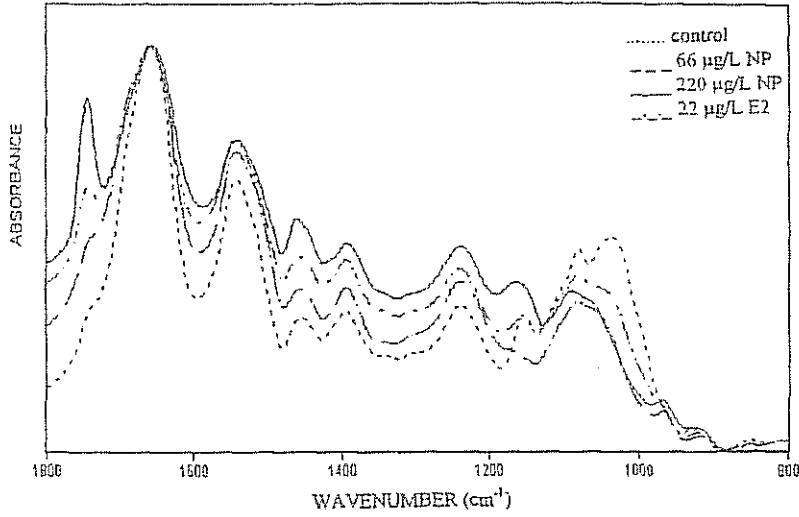
**Şekil 20.** Kontrol ve NP ile bir hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde alınan FT-IR spektrası (2927  $\text{cm}^{-1}$  deki  $\text{CH}_2$  asimetrik mod'a göre normalize edilmiştir)



**Şekil 21.** Kontrol ve NP ile bir hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde alınan FT-IR spektrası (2927  $\text{cm}^{-1}$  deki  $\text{CH}_2$  asimetrik mod'a göre normalize edilmiştir)



**Şekil 22.** Kontrol, NP ve 22  $\mu\text{g/L}$  E2 ile iki hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde alınan FT-IR spektrası (2927  $\text{cm}^{-1}$  deki  $\text{CH}_2$  asimetrik mod'a göre normalize edilmiştir)



**Şekil 23.** Kontrol, NP ve 22 µg/L E2 ile iki hafta muamele edilmiş alabalık karaciğerinden 1800-800 cm<sup>-1</sup> bölgesinde alınan FT-IR spektrasi (2927 cm<sup>-1</sup> deki CH<sub>2</sub> asimetrik mod'a göre normalize edilmiştir)

#### 4.7 Karaciğerdeki glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri

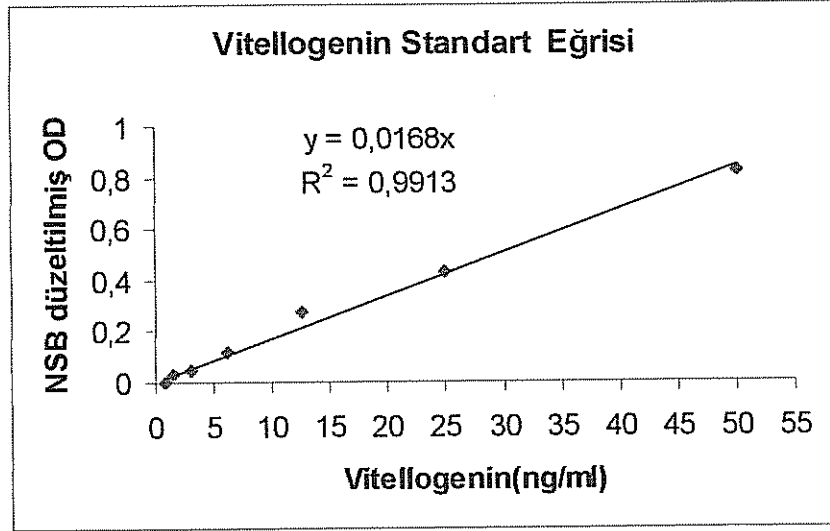
Tablo 8'de görüldüğü gibi, 220 µg/L nonilfenole bir hafta maruz kalan balıklarda GST enzim aktivitesi, yükselmektedir. Bu yükselme Tukey'in HSD istatistik yöntemine göre anlamlıdır (p<0.05). Aynı konsantrasyona iki ve üç hafta kalan balıkların karaciğerinde ise GST enzim aktivitesi düşmektedir. GST aktivitesindeki bu düşmede, istatistiksel olarak anlamlıdır. Kontrol ve 66 µg/L nonilfenol maruz bırakılan balıklarda, ikinci haftadan sonra GST enzim aktivitesinde bir artma meydana gelmektedir. Kontrol grubunda meydana gelen yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat, 66 µg/L nonilfenol grubundaki balıkların karaciğerinde, GST enzim aktivitesinde ikinci haftada meydana gelen yükselme istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

**Tablo 8.** Alabalık karaciğeri glutatyon S-transferaz enzim aktivitesinin farklı süre ve farklı konsantrasyonlarda NP ile muamele sonucunda değişimi

NP Konsantrasyonu	GST Aktivitesi (µmol/gr protein ± SE, N=3)		
	1. hafta	2. hafta	3. hafta
Kontrol	68,82± 9,67	83,69 ±11,46	90,42 ±8,07
66 µg/L	60,35± 8,67	106,37 ±23,04 <sup>a</sup>	68,89 ±8,41
220 µg/L	138,05 ±17,62 <sup>b</sup>	79,61 ±17,13	43,50 ±6,90 <sup>c</sup>

#### 4.8 Nonilfenol'ün Alabalıklarda Vitellogenin seviyesine etkileri

Estrojenik etki gösteren endokrin bozuculara maruz kalan canlılarda vitellogenin miktarının yükselmesi beklenmektedir. Bu çalışmada NP'e maruz bırakılan alabalıkların kanları toplandı ve immunoassay ile Cayman Vitellogenin kiti kullanılarak plasma vitellogenin miktarları belirlendi. Şekil 24'de görülen standart eğimi kullanarak vitellogenin miktarları hesaplandı.



**Şekil 24.** Vitellogenin Standart Eğrisi (NSB: özgün bağlanmayan vitellogenin antikörlerinin verdiği okuma değeri)

66 µg/L nonilfenol'e bir hafta maruz bırakılan balıkların dahi plazma vitellogenin değerleri, kontrol balıklara oranla artmış olduğu görüldü. Değerlerdeki artışların tüm NP dozlarında ve maruziyet süreleri için geçerli olduğu gözlemlendi. Ancak satın alınan kitteki, üretici firma tarafından sonradan bildirilen kullanılan çözeltilerden birindeki seyreltme hatası yüzünden elimizde yeterli örnek kalmadığından deneyler tekrarlanamadı. Bu nedenle güvenilir olmayacağından, değerler burada verilmemiştir.

## 5 Tartışma ve Sonuç

Sakarya Nehri ve Değirmen deresi üzerinden toplanan su örneklerinde alkilfenol rastlanmamıştır. Ancak, sediman ve balık örneklerinde alkilfenollere rastlanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. Çünkü, alkilfenoller hidrofobik (su çözünmeyen) ve lipofilik (yağda çözünen) özelliklerinden dolayı, sulara değil, sediman ve suda yaşayan canlılarda birikmektedir (Tablo 3). Sakarya nehri üzerinde Porsuk Çayı, Değirmendere üzerinde ise Maçka'dan alınan sediman örneklerinde alkilfenole rastlanmıştır. Değirmendere, Maçka'da nonilfenol (4,46 µg/L) ve bütiflenole (1,68 µg/L) rastlanmış, Porsuk Çayında ise sadece bütiflenol (3,15 µg/L) ölçülmüştür. Porsuk Çayı'ndan alınan sediman örneğinde, Değirmenderesi, Maçka'dan alınan sediman örneğinden daha düşük alkilfenol bulunmasının muhtemel nedenleri: 1) Maçka'dan alınan sediman örneği, kanalizasyonun suya Değirmendereye akitildiği bölgeye daha yakın olması. 2) Porsuk Çayı'ndan alınan sediman örneğinde alkilfenol özütleme veriminin çok düşük olmasıdır (%50'den az). Porsuk Çayı, Değirmenderesine oranla çok daha fazla ağır metal kirlenmesine neden olmaktadır. Ağır metallerin, metanol ile özütleme yöntemine etkisinin araştırılması gerekmektedir. Örneğin, kadmiyum, nonilfenolün canlı organizma tarafından tutulmasını inhibe etmektedir. Sediman içerisinden özütleme de böyle bir etkileşimin olup olmadığı bilinmemektedir.

Sakarya nehri ve Değirmenderesi üzerinden alınan sediman örneklerinin bazılarında alkilfenollere rastlanmamasının bir nedeni de, bazı istasyonlarda sediman alınmaması ya da su sıcaklığının 20 °C üzerinde olması. Örneğin, Değirmenderesi, Sanayi sitesinde, sediman örneği alınamamıştır. Sediman yerine kum alınabilmektedir. Trabzon'unun kanalizasyon atıklarının atıldığı nokta olduğu için, örnekleme oradan yapılması gerekmekteydi. Ancak, Değirmenderenin denize boşaldığı yer olduğu için, sediman değil kum alınabilmektedir. Kum örneğinde alkilfenol ölçülememiştir. İsviçre'de sedimden yapılan ölçümlerde (Ahel et al., 1994) 1,31 µg/L alkilfenol; İngiltere'de 15 µg/L ve ABD'de ise 70 µg/L bulunmuştur. Bu çalışmada iki nehirde 3,15 ve 4,46 µg/L civarında NP varlığı saptanmıştır.

Bütün bunlara rağmen, alkilfenollerin balık dokularında ölçülmesi, nehirlerimizde alkilfenol varlığını göstermektedir. Gerek literatür gerekse laboratuvar çalışmalarımız göstermektedir ki, alkilfenoller ve özellikle nonilfenol canlı dokularda biyolojik birikime neden olmaktadır. Biyolojik birikim, biokonsantrasyon faktörü olarak ölçülmektedir ve dokularda ölçülen alkilfenol miktarının, sudaki miktarına oranı olarak hesap edilmektedir. Literatürde biokonsantrasyon faktörünün 1 ile 1000 arasında değiştiği rapor edilmektedir. Laboratuvarda yapılan deneylerde ise nonilfenolün, balıkların karaciğerinde patolojik (Şekil 13-18) ve biyokimyasal bozukluklara neden olduğu ortaya konmuştur. NP'e maruz bırakılan alabalıkların karaciğer FT-IR spektrumları incelendiğinde görülen değişikliklerin detaylı incelenmesi sonucunda varılan sonuçlar şöyledir: NP 'ye maruziyet ile karaciğer dokusunda glikojen miktarlarında azalma olmuştur. Doymamış yağların miktarında artış olmuştur. Bu durum, karaciğerden alınan kesitlerin morfolojik incelemesinde vaküllerin oluşması ve dokuda yağlanmanın gözlenmesiyle uyumludur.

Sonuç olarak, ölçüm yapılan iki su sisteminde alkilfenol kirliliği büyük boyutlarda olmasa da mevcuttur. Alkilfenol balıklarda birikim gösterdiğinden, varlığı daha kolaylıkla görülebilmektedir. Su kirliliği, içinde yaşayan canlılardan özütleme yapılarak, HPLC ile rutin ölçümlerde kolayca belirlenebilecektir. Vitellogenin ölçümleri en hassas belirteç olabilir, ancak kullanılan kitler çok pahalıdır, daha kolay ve ucuz ölçüm metodu gelecek çalışmalarda amaçlanmalıdır.

## 6 KAYNAKLAR

- AHEL, M., Giger, W., Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates Between Water and Organic Solvents, *Chemosphere*, 26, 1471-1478, (1993).
- AHEL, M., Hrsak, D. Giger, W., Aerobic Transformation of short Chain Alkylphenol Ethoxylates by Mixed Bacterial cultures, *Contam. Toxicol.*, 26, 540-548, (1994a).
- AHEL, M., Scully, F. E., Hoigne, J., Giger, W., Photochemical Degradation of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Natural Waters, *Chemosphere*, 28, 1361-1368, (1994b).
- AHEL, M., Giger, W., Koch, M., Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment, *Water Res.*, 28, 1131-1142, (1994c).
- AHEL, M., Giger, W., Schaffner, C., Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate-Surfactants in the Aquatic Environment 2. Occurrence and Transformation in Rivers, *Water Res.*, 28, 1143-1152, (1994d).
- ARUKWE, A., Goksoyr, A., Thibaut, R., Cravedi, J.P., Metabolism and Organ Distribution of Nonylphenol in Atlantic Salmon, *Marine Environ. Res.*, 50, 141-145, (2000).
- ARUKWE, A., Förlin, L., Goksoyr, A., Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2576-2588, (1997b).
- BLACKBURN, M.A., Waldock, M.J., Concentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales, *Water Res.*, 29, 1623-1629, (1995).
- BLACKBURN, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J., Concentration of Alkylphenol Ethoxylates Entering UK Estuaries, *Mar. Pollution Bull.*, 38, 109-118, (1999).
- BRUNNER, P.H., Capli, S., Marcomini, A., Giger, W., Occurrence and Behavior of Linear Alkylbenzene Sulphonates, Nonylphenol, nonylphenol Mono- and Nonylphenol diethoxylates in Sewage and Sewage Sludge Treatment, *Water Research*, 22, 1465-1472, (1988).
- URKHARDT-HOLM, P., Wahli, T., Mejer, W., Nonylphenol affects the Granulation Pattern of Epidermal Mucous Cells in Rainbow Trout, *Toxicol. Environ. Safety*, 46, 34-40, (2000).
- COLBORN, T., Clement, C., Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the Wildlife-Human Connection, Princeton, NJ Princeton Scientific Publications, (1992).
- COLBORN, T., vomSaal, F.S., Soto, A.M., Developmental Effects of Endocrine Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ. Health Perspectives*, 101, 378-384, (1993).

COLDHAM, N.G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottiger, T.G., Goodal, C. Sauer, M.J., Biotransformation, Tissue Distribution and Persistence of 7-nonylphenol residues in Juvenile Rainbow trout. *Drug Metab. Dispos.* 26, 347-354.

DUYDU, Y., Vural, N., Monitoring of Ionic and Nonionic Surfactants in Ankara and Berdan Stream. II. *International Symposium of Ecotoxicology and Environmental Problems*. 5-7 November, Ankara, p.76-82, (1992).

FERGUSON, S. A., Scallet, A. C., Flynn, K. M. Meredith, J. M., Schwetz, B. A. Developmental Neurotoxicity of Endocrine Disrupters: Focus on Estrogens. *Neurotoxicology*, 21(6), 947-956, (2000).

GAGNE, F., Pardos, M., Blaise, C., Estrogenic Effects of Organic Environmental Extracts with the Trout Hepatocyte Vitellogenin Assay, *Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 723-730, (1999).

HABIG, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139, (1974).

HARRIES, J.E., Sheahan, D.A., Jobling S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T., Zaman, N., Estrogenic Activity in five UK Rivers Detected by Measurement of Vitellogenins in Caged Male Trout, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 534-542 (1997).

HAWERLAK, M., Bennett, E., Metcalfe, C., The Environmental Fate of the Primary Degradation Products of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Recycles Paper Sludge, *Chemosphere*, 39, 745-752, (1999).

HENDERSON, B.E., Ross, R.R., Pike, M., Hormonal Chemoprevention of Cancer in Women, 259, 633-638, (1993).

JOBLING, S., Sumpter, J.P., Detergent Components in Sewage are Weakly Estrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout hepatocytes, *Aquatic Toxicol.* 27, 361-372, (1993).

JOBLING, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mathissen, P., Sumpter, J.P., Inhibition of Testicular Development in rainbow Trout exposed to estrogenic Alkylphenol chemicals, *Environ. Toxic. Chem.*, 15, 194-202, (1996).

KLOAS, W., Lutz, I., Einspainer, R., Amphibians, As a Model to Study Endocrine Disrupters: II. Estrogenic Activity of Environmental Chemicals *in vitro* and *in vivo*, *The Science of the Total Environment*, 225, 59-68, (1999).

KUTZ, F.W., Wood, W.H., Battimore, D.P., Organochlorine Pesticides and Polychlorinated biphenyls in Human Adipose Tissue, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 120, 1-82, (1991).



LEE, P.C., Patra, S.C., Stelloh, C.T., Lee, W., Struve, M., Interaction of Nonylphenol and Hepatic CYP1A in Rats, *Biochem. Pharmacol.*, 52, 885-889, (1996a).

LEE, P.C., Patra, S.C., Struve, M., Modulation of Rat Hepatic CYP3 by nonylphenol, *Xenobiotica*, 26, 813-819, (1996b).

LEWIS, S.K., Lech, J.J., Uptake, Disposition and Persistence of Nonylphenol from Water in Rainbow Trout, *Xenobiotica*, 26, 813-819, (1996).

McLACHLAN, J.A, Newbold, R. R., Nelson, K.G., Korach, K.S. Control of Uterine Epithelial Growth and Differentiation. Implications for Estrogen-Associated Neoplasm, *Hormonal Carcinogenesis*, ed. J.J. Li, S. Nandi, S.A. Li, NewYork Springer-Verlag, (1992), pp 43-50.

MARCOMINI, A., Pojana, G., Sfriso, A., Quiroga, A.J.-M., Behavior of Anionic Surfactants and their Persistent Metabolites in Venice Lagoon, Italy, *Environ. Toxicol, Chem.*, 19, 2000-2007, (2000).

MARSELOS, M, Tomatis, L., Diethylstilbestrol II: Pharmacology, Toxicology and Carcinogenicity in Experimental Animals, *Eur. J. Cancer*, 259, 518-520 (1992b).

MARSELOS, M, Tomatis, L., Diethylstilbestrol I: Pharmacology, Toxicology and Carcinogenicity in Experimental Animals, *Eur. J. Cancer*, 259, 149-155 (1992a).

NAYLOR, C.G., Mieux, J.P., Adams, W.H., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R., Alkylphenol ethoxylates in Environment, *J. American Oil Chem.*, 69, 695-703, (1992).

NIMROD, A.C., Benson, W.H., Environmental Estrogenic Effects of Alkylphenol Ethoxylates, *Crit Rev. Toxicol*, 26, 335-364, (1996).

PEDERSON, R.T., Hill, E.M., Identification of Novel Metabolites of the Xenoestrogen 4-tert-octylphenol in Primary Rat Hepatocytes, *Chem.-Biol. Interact.*, 128, 189-209, (2000).

ROY, D., Palangat, M., Chen, C., Thomas, R. D., Colerangle, J., Atkinson, A., Yan, Zhi-Jie, Biochemical and Molecular Changes at the Cellular Level in Response to Exposure to Environmental Estrogen-Like Chemicals, *J. Toxicol and Environ Health*, 50, 1-29 (1997).

RENNER, R., European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate, *Environ. Sci. Tech.*, 31, 316-320, (1997).

ROGAN, W.J., Gladen, B.C., McKinney, J.D. Careras, N., Hardy, P., Thullen, J., Tinglestad, J. Tully, M., Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Dichlorodiphenyl dichloroethane (DDE) in Human milk: Effects on Growth, morbidity and Duration of Lactation, *Am. J. Public Health*, 77, 1294-1297, (1987).

SAFE, S.H., Connor, K., Gaido, K., Methods for Xenoestrogen Testing, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 665-670, (1998).

SAFE, S.H., Environmental and Dietary Estrogens in Human Health: Is there a problem? *Environ. Health Perspectives*, 103, 346-351, (1995).

SKAKKEBAEK, N.E., Meyts, ERD, Jorgensen, N., Carlsen, E., Petersen, P., Giwercman, A., Andersen, A.G., Jensen, T.K., Muller, J., Germ Cell Cancer and Disorders of Spermatogenesis: An Environmental Connection?, *APMIS*, 106, 3-11, (1998).

SOTO, M.A., Justica, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., p-Nonylphenol estrogenic xenobiotic released, *Environ Health Perspect.*, 92, 167-173 (1991).

SONNENSCHN, C ve Soto, M. A. An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists, *J Steroid Biochem Molec. Biol.*, 65(1-6), 143-150, (1998).

STUART, B., Biological Applications of Infrared Spectroscopy, ed: Ando, D.J., John and Sons LTD, England, (1997).

TALMAGE, S.S., Environmental and Human Safety of major Surfactants-Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates, In *Soap and Detergent Association*, Lewis Pub., BocaRaton, FL.(1994).

THIBAUT, R., Debrauer, L., Rao, D., Cravedi, J.P., Disposition and Metabolism of [3H]-4-nonylphenol in Rainbow Trout, *Mar Environ. Res*, 46, 12521-12524, (1998a).

THIBAUT, R., Debruwer, L., Rao, D., Cravedi, J.-p., Characterisation of Biliary metabolites of 4-nonylphenol in Rainbow Trout, *xenobiotica*, 28, 745-757 (1998b).

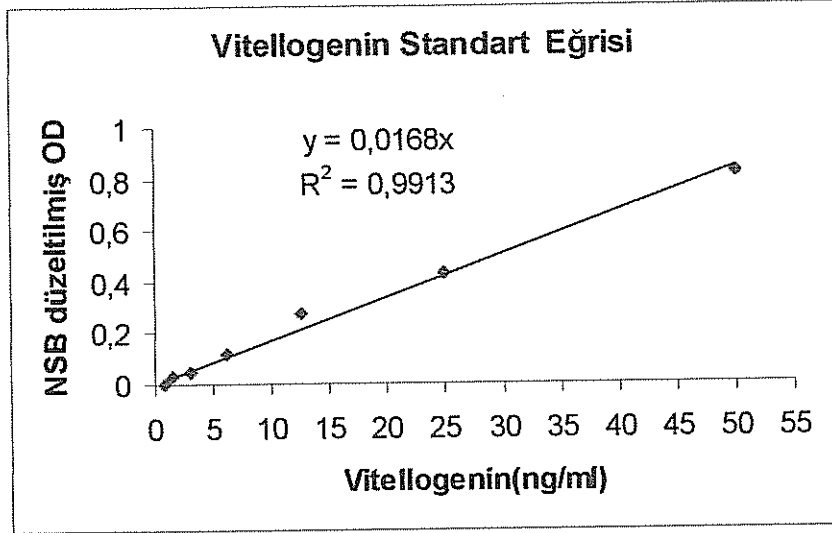
TYLER, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., Endocrine Distruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, 28, 319-361, (1998).

WARHURST, A.M., An Environmental Assessment of Alkylphenol ethoxylates and Alkylphenols, *Ph.D. Friens Earth*, 1-15, (1995).

ZHAO, M., van der Wielen, F., Voogt, P., Optimisation of a Matrix Solid-Phase Dispersion Method with Sequential Clean-up for the Determination of Alkylphenol Ethoxylates in Biological Tissues, *J. Chromat. A.*, 837, 129-138, (1999).

#### 4.8 Nonilfenol'ün Alabalıklarda Vitellogenin seviyesine etkileri

Estrojenik etki gösteren endokrin bozuculara maruz kalan canlılarda vitellogenin miktarının yükselmesi beklenmektedir. Bu çalışmada NP'e maruz bırakılan alabalıkların kanları toplandı ve immunoassay ile Cayman Vitellogenin kiti kullanılarak plazma vitellogenin miktarları belirlendi. Şekil 24'de görülen standart eğimi kullanarak vitellogenin miktarları hesaplandı.



**Şekil 24.** Vitellogenin Standart Eğrisi (NSB: özgün bağlanmayan vitellogenin antikorlarının verdiği okuma değeri)

66  $\mu\text{g/L}$  nonilfenol'e bir hafta maruz bırakılan balıkların dahi plazma vitellogenin değerleri, kontrol balıklara oranla artmış olduğu görüldü. Değerlerdeki artışların tüm NP dozlarında ve maruziyet süreleri için geçerli olduğu gözlemlendi. Ancak satın alınan kitteki, üretici firma tarafından sonradan bildirilen kullanılan çözeltilerden birindeki seyreltme hatası yüzünden elimizde yeterli örnek kalmadığından deneyler tekrarlanamadı. Bu nedenle güvenilir olmayacağından, değerler burada verilmemiştir.

## 5 Tartışma ve Sonuç

Sakarya Nehri ve Değirmen deresi üzerinden toplanan su örneklerinde alkilfenol rastlanmamıştır. Ancak, sediman ve balık örneklerinde alkilfenollere rastlanmıştır. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. Çünkü, alkilfenoller hidrofobik (su çözünmeyen) ve lipofilik (yağda çözünen) özelliklerinden dolayı, sulara değil, sediman ve suda yaşayan canlılarda birirmektedir (Tablo 3). Sakarya nehri üzerinde Porsuk Çayı, Değirmendere üzerinde ise Maçka'dan alınan sediman örneklerinde alkilfenole rastlanmıştır. Değirmendere, Maçka'da nonilfenol (4,46 µg/L) ve bütifenoile (1,68 µg/L) rastlanmış, Porsuk Çayı'nda ise sadece bütifenoil (3,15 µg/L) ölçülmüştür. Porsuk Çayı'ndan alınan sediman örneğinde, Değirmenderesi, Maçka'dan alınan sediman örneğinden daha düşük alkilfenol bulunmasının muhtemel nedenleri: 1) Maçka'dan alınan sediman örneği, kanalizasyonun suya Değirmendereye akıtıldığı bölgeye daha yakın olması. 2) Porsuk Çayı'ndan alınan sediman örneğinde alkilfenol özütleme veriminin çok düşük olmasıdır (%50den az). Porsuk Çayı, Değirmenderesine oranla çok daha fazla ağır metal kirlenmesine neden olmaktadır. Ağır metallerin, metanol ile özütleme yöntemine etkisinin araştırılması gerekmektedir. Örneğin, kadmiyum, nonilfenolün canlı organizma tarafından tutulmasını inhibe etmektedir. Sediman içerisinden özütleme de böyle bir etkileşimin olup olmadığı bilinmemektedir.

Sakarya nehri ve Değirmenderesi üzerinden alınan sediman örneklerinin bazılarında alkilfenollere rastlanmamasının bir nedeni de, bazı istasyonlarda sediman alınamaması ya da su sıcaklığının 20 °C üzerinde olması. Örneğin, Değirmenderesi, Sanayi sitesinde, sediman örneği alınamamıştır. Sediman yerine kum alınabilmektedir. Trabzon'unun kanalizasyon atıklarının atıldığı nokta olduğu için, örneklemenin oradan yapılması gerekmektedir. Ancak, Değirmenderenin denize boşaldığı yer olduğu için, sediman değil kum alınabilmektedir. Kum örneğinde alkilfenol ölçülememiştir. İsviçre'de sedimden yapılan ölçümlerde (Ahel et al., 1994) 1,31µg/L alkilfenol; İngiltere'de 15 µg/L ve ABD'de ise 70 µg/L bulunmuştur. Bu çalışmada iki nehirde 3,15 ve 4,46 µg/L civarında NP varlığı saptanmıştır.

Bütün bunlara rağmen, alkilfenollerin balık dokularında ölçülmesi, nehirlerimizde alkilfenol varlığını göstermektedir. Gerek literatür gerekse laboratuvar çalışmalarımız göstermektedir ki, alkilfenoller ve özellikle nonilfenol canlı dokularda biyolojik birikime neden olmaktadır. Biyolojik birikim, biokonsantrasyon faktörü olarak ölçülmektedir ve dokularda ölçülen alkilfenol miktarının, sudaki miktarına oranı olarak hesap edilmektedir. Literatürde biokonsantrasyon faktörünün 1 ile 1000 arasında değiştiği rapor edilmektedir. Laboratuvarda yapılan deneylerde ise nonilfenolün, balıkların karaciğerinde patolojik (Şekil 13-18) ve biyokimyasal bozukluklara neden olduğu ortaya konmuştur. NP'e maruz bırakılan alabalıkların karaciğer FT-IR spektrumları incelendiğinde görülen değişikliklerin detaylı incelenmesi sonucunda varılan sonuçlar şöyledir: NP 'ye maruziyet ile karaciğer dokusunda glikojen miktarlarında azalma olmuştur. Doymamış yağların miktarında artış olmuştur. Bu durum, karaciğerden alınan kesitlerin morfolojik incelemesinde vaküllerin oluşması ve dokuda yağlanmanın gözlenmesiyle uyumludur.

Sonuç olarak, ölçüm yapılan iki su sisteminde alkilfenol kirliliği büyük boyutlarda olmasa da mevcuttur. Alkilfenol balıklarda birikim gösterdiğinden, varlığı daha kolaylıkla görülebilmektedir. Su kirliliği, içinde yaşayan canlılardan özütleme yapılarak, HPLC ile rutin ölçümlerde kolayca belirlenebilecektir. Vitellogenin ölçümleri en hassas belirteç olabilir, ancak kullanılan kitler çok pahalıdır, daha kolay ve ucuz ölçüm metodu gelecek çalışmalarda amaçlanmalıdır.

## 6 KAYNAKLAR

AHEL, M., Giger, W., Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates Between Water and Organic Solvents, *Chemosphere*, 26, 1471-1478, (1993).

AHEL, M., Hrsak, D. Giger, W., Aerobic Transformation of short Chain Alkylphenol Ethoxylates by Mixed Bacterial cultures, *Contam. Toxicol.*, 26, 540-548, (1994a).

AHEL, M., Scully, F. E., Hoigne, J., Giger, W., Photochemical Degradation of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Natural Waters, *Chemosphere*, 28, 1361-1368, (1994b).

AHEL, M., Giger, W., Koch, M., Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment, *Water Res.*, 28, 1131-1142, (1994c).

AHEL, M., Giger, W., Schaffner, C., Behavior of Alkylphenol Polyethoxylate-Surfactants in the Aquatic Environment 2. Occurrence and Transformation in Rivers, *Water Res.*, 28, 1143-1152, (1994d).

ARUKWE, A., Goksoyr, A., Thibaut, R., Cravedi, J.P., Metabolism and Organ Distribution of Nonylphenol in Atlantic Salmon, *Marine Environ. Res.*, 50, 141-145, (2000).

ARUKWE, A., Förlin, L., Goksoyr, A., Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2576-2588, (1997b).

BLACKBURN, M.A., Waldock, M.J., Concentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales, *Water Res.*, 29, 1623-1629, (1995).

BLACKBURN, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J., Concentration of Alkylphenol Ethoxylates Entering UK Estuaries, *Mar. Pollution Bull.*, 38, 109-118, (1999).

BRUNNER, P.H., Capli, S., Marcomini, A., Giger, W., Occurrence and Behavior of Linear Alkylbenzene Sulphonates, Nonylphenol, nonylphenol Mono- and Nonylphenol diethoxylates in Sewage and Sewage Sludge Treatment, *Water Research*, 22, 1465-1472, (1988).

URKHARDT-HOLM, P., Wahli, T., Mejer, W., Nonylphenol affects the Granulation Pattern of Epidermal Mucous Cells in Rainbow Trout, *Toxicol. Environ. Safety*, 46, 34-40, (2000).

COLBORN, T., Clement, C., Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: the Wildlife-Human Connection, Princeton, NJ Princeton Scientific Publications, (1992).

COLBORN, T., vomSaal, F.S., Soto, A.M., Developmental Effects of Endocrine Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ. Health Perspectives*, 101, 378-384, (1993).

COLDHAM, N.G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottiger, T.G., Goodal, C. Sauer, M.J., Biotransformation, Tissue Distribution and Persistence of 7-nonylphenol residues in Juvenile Rainbow trout. *Drug Metab. Dispos.* 26, 347-354.

DUYDU, Y., Vural, N., Monitoring of Ionic and Nonionic Surfactants in Ankara and Berdan Stream. II. *International Symposium of Ecotoxicology and Environmental Problems*. 5-7 November, Ankara, p.76-82, (1992).

FERGUSON, S. A., Scallet, A. C., Flynn, K. M. Meredith, J. M., Schwetz, B. A. Developmental Neurotoxicity of Endocrine Disrupters: Focus on Estrogens. *Neurotoxicology*, 21(6), 947-956, (2000).

GAGNE, F., Pardos, M., Blaise, C., Estrogenic Effects of Organic Environmental Extracts with the Trout Hepatocyte Vitellogenin Assay, *Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 723-730, (1999).

HABIG, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139, (1974).

HARRIES, J.E., Sheahan, D.A., Jobling S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T., Zaman, N., Estrogenic Activity in five UK Rivers Detected by Measurement of Vitellogenins in Caged Male Trout, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 534-542 (1997).

HAWERLAK, M., Bennett, E., Metcalfe, C., The Environmental Fate of the Primary Degradation Products of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Recycles Paper Sludge, *Chemosphere*, 39, 745-752, (1999).

HENDERSON, B.E., Ross, R.R., Pike, M., Hormonal Chemoprevention of Cancer in Women, 259, 633-638, (1993).

JOBLING, S., Sumpter, J.P., Detergent Components in Sewage are Weakly Estrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout hepatocytes, *Aquatic Toxicol.* 27, 361-372, (1993).

JOBLING, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Mathissen, P., Sumpter, J.P., Inhibition of Testicular Development in rainbow Trout exposed to estrogenic Alkylphenol chemicals, *Environ. Toxic. Chem.*, 15, 194-202, (1996).

KLOAS, W., Lutz, I., Einspainer, R., Amphibians, As a Model to Study Endocrine Disrupters: II. Estrogenic Activity of Environmental Chemicals *in vitro* and *in vivo*, *The Science of the Total Environment*, 225, 59-68, (1999).

KUTZ, F.W., Wood, W.H., Battimore, D.P., Organochlorine Pesticides and Polychlorinated biphenyls in Human Adipose Tissue, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 120, 1-82, (1991).

LEE, P.C., Patra, S.C., Stelloh, C.T., Lee, W., Struve, M., Interaction of Nonylphenol and Hepatic CYP1A in Rats, *Biochem. Pharmacol.*, 52, 885-889, (1996a).

LEE, P.C., Patra, S.C., Struve, M., Modulation of Rat Hepatic CYP3 by nonylphenol, *Xenobiotica*, 26, 813-819, (1996b).

LEWIS, S.K., Lech, J.J., Uptake, Disposition and Persistence of Nonylphenol from Water in Rainbow Trout, *Xenobiotica*, 26, 813-819, (1996).

McLACHLAN, J.A, Newbold, R. R., Nelson, K.G., Korach, K.S. Control of Uterine Epithelial Growth and Differentiation. Implications for Estrogen-Associated Neoplasm, *Hormonal Carcinogenesis*, ed. J.J. Li, S. Nandi, S.A. Li, NewYork Springer-Verlag, (1992), pp 43-50.

MARCOMINI, A., Pojana, G., Sfriso, A., Quiroga, A.J.-M., Behavior of Anionic Surfactants and their Persistent Metabolites in Venice Lagoon, Italy, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2000-2007, (2000).

MARSELOS, M, Tomatis, L., Diethylstilbestrol II: Pharmacology, Toxicology and Carcinogenicity in Experimental Animals, *Eur. J. Cancer*, 259, 518-520 (1992b).

MARSELOS, M, Tomatis, L., Diethylstilbestrol I: Pharmacology, Toxicology and Carcinogenicity in Experimental Animals, *Eur. J. Cancer*, 259, 149-155 (1992a).

NAYLOR, C.G., Mieure, J.P., Adams, W.H., Weeks, J.A., Castaldi, F.J., Ogle, L.D., Romano, R.R., Alkylphenol ethoxylates in Environment, *J. American Oil Chem.*, 69, 695-703, (1992).

NIMROD, A.C., Benson, W.H., Environmental Estrogenic Effects of Alkylphenol Ethoxylates, *Crit Rev. Toxicol*, 26, 335-364, (1996).

PEDERSON, R.T., Hill, E.M., Identification of Novel Metabolites of the Xenoestrogen 4-tert-octylphenol in Primary Rat Hepatocytes, *Chem.-Biol. Interact.*, 128, 189-209, (2000).

ROY, D., Palangat, M., Chen, C., Thomas, R. D., Colerangle, J., Atkinson, A., Yan, Zhi-Jie, Biochemical and Molecular Changes at the Cellular Level in Response to Exposure to Environmental Estrogen-Like Chemicals, *J. Toxicol and Environ Health*, 50, 1-29 (1997).

RENNER, R., European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate, *Environ. Sci. Tech.*, 31, 316-320, (1997).

ROGAN, W.J., Gladen, B.C., McKinney, J.D. Careras, N., Hardy, P., Thullen, J., Tinglestad, J. Tully, M., Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Dichlorodiphenyl dichloroethane (DDE) in Human milk: Effects on Growth, morbidity and Duration of Lactation, *Am. J. Public Health*, 77, 1294-1297, (1987).

SAFE, S.H., Connor, K., Gaido, K., Methods for Xenoestrogen Testing, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 665-670, (1998).

SAFE, S.H., Environmental and Dietary Estrogens in Human Health: Is there a problem? *Environ. Health Perspectives*, 103, 346-351, (1995).

SKAKKEBAEK, N.E., Meyts, ERD, Jorgensen, N., Carlsen, E., Petersen, P., Giwercman, A., Andersen, A.G., Jensen, T.K., Muller, J., Germ Cell Cancer and Disorders of Spermatogenesis: An Environmental Connection?, *APMIS*, 106, 3-11, (1998).

SOTO, M.A., Justica, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., p-Nonylphenol estrogenic xenobiotic released, *Environ Health Perspect.*, 92, 167-173 (1991).

SONNENSCHN, C ve Soto, M. A. An Updated Review of Environmental Estrogen and Androgen Mimics and Antagonists, *J Steroid Biochem Molec. Biol.*, 65(1-6), 143-150, (1998).

STUART, B., Biological Applications of Infrared Spectroscopy, ed: Ando, D.J., John and Sons LTD, England, (1997).

TALMAGE, S.S., Environmental and Human Safety of major Surfactants-Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates, In *Soap and Detergent Association*, Lewis Pub., BocaRaton, FL.(1994).

THIBAUT, R., Debrauer, L., Rao, D., Cravedi, J.P., Disposition and Metabolism of [3H]-4-nonylphenol in Rainbow Trout, *Mar Environ. Res*, 46, 12521-12524, (1998a).

THIBAUT, R., Debruwer, L., Rao, D., Cravedi, J.-p., Characterisation of Biliary metabolites of 4-nonylphenol in Rainbow Trout, *xenobiotica*, 28, 745-757 (1998b).

TYLER, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., Endocrine Distruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence, *Crit. Rev. Toxicol.*, 28, 319-361, (1998).

WARHURST, A.M., An Environmental Assessment of Alkylphenol ethoxylates and Alkylphenols, *Ph.D. Friens Earth*, 1-15, (1995).

ZHAO, M., van der Wielen, F., Voogt, P., Optimisation of a Matrix Solid-Phase Dispersion Method with Sequential Clean-up for the Determination of Alkylphenol Ethoxylates in Biological Tissues, *J. Chromat. A.*, 837, 129-138, (1999).



PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

49

1-29

2005

<b>Proje Kodu:</b> YDABAG- 101Y066
<b>Proje Başlığı:</b> SAKARYA NEHRİ VE DEĞİRMENDERESİ'NDE ALKİLFENOL KİRLİLİĞİ VE NONİLFENOLÜN ALABALIKLAR (ONCHORYNCUS MYKISS) ÜZERİNE ETKİLERİ
<b>Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:</b> PROF. DR. MESUDE İŞCAN PROF. DR. İNCİ TOGAN PROF. DR. FERİDE SEVERCAN CEVDET UĞUZ AYŞE ERGÜVEN
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Biyoloji Bölümü ODTÜ Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b>
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Bu çalışmada, Değirmenderesi ve Sakarya Nehri üzerinde belirlenen istasyonlardan alınan su ve sedim örneklerinde ve bu bölgelerden tutulan balıkların dokularında alkilfenol kirliliği metanol özütlemesi ve ardından HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Her iki nehirde de, su örneklerinde alkilfenol'e rastlanmazken, Değirmenderesi'nin en kirli bölgesinden alınan sedim örneklerinde 4,45 µg /g NP ve 1,68 µg /g BP belirlenmiştir. Sakarya Nehrinin en kirli yerinde ise, yine sedim örneklerinde 3,15 µg/g BP ölçülmüştür. Bu istasyonlardan toplanan balık örneklerinde NP ve alkilfenol ilintili bir madde varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, laboratuvarında NP verilmiş alabalıklarda NP'nin karaciğer glutatyon S-transferaz üzerine etkileri incelendi ve maruziyet süresine ve doza bağımlı değişken bir etki gözlemlendi. Bu balıkların karaciğerlerinde yapılan sitolojik incelemelerde, 17-estradiol benzeri yağlanma etkileri görüldü. Karaciğer dokusundaki moleküler düzeydeki değişiklikler FTIR spektrofotometresinde belirlendi. Estrojenik etkinin belirteci kabul edilen karaciğerde vitellogenin üretimindeki artışlar immunolojik yöntemlerle saptandı.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> alkilfenol, nonilfenol, glutatyon S-transferaz, FTIR, vitellogenin
<b>Projeden Kaynaklanan Yayınlar:</b> Uğuz, C. İşcan, M., Ergüven A., İşgör, BS, Togan İ.: Bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effects on the liver of rainbow trout, <i>Environ. Res.</i> , 92,262-270, 2003. Uğuz, C., Togan, İ., Eroğlu, Y., Tabak, İ., Zengin, M., İşcan, M.: Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey, <i>Environ. Toxicol. Pharmacol.</i> , 14, 87-88, 2003,
<b>Bilim Dalı:</b> <b>Doçentlik B. Dalı Kodu:</b>