

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKTİLFENOL VE 2,4-D'NİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYO VE LARVALARININ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tarık DİNÇ**

**Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOLOJİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ**

**EYLÜL 2014**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKTİLFENOL VE 2,4-D'İNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) EMBRİYO VE LARVALARININ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

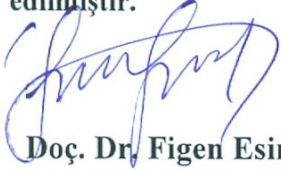
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarık DİNÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Enstitü Bilim Dalı : BİYOLOJİ

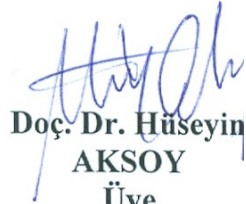
Bu tez 17 / 09 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Figen Esin  
KAYHAN  
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Nazan Deniz  
YÖNERTUĞ  
Üye



Doç. Dr. Hüseyin  
AKSOY  
Üye

## **TEŞEKKÜR**

Tez çalıőmalarım sırasında bana büyük emek ve sabır gösteren değerli Hocam Doç. Dr. Nazan Deniz Yn'e, bütün katkılarından dolayı hocalarım Doç. Dr. Hüseyin Aksoy'a ve Doç. Dr. Figen Esin Kayhan'a, yardımları hiçbir zaman esirgemeyen baőtta Doç. Dr. Ali Uzun olmak üzere bölümümüzdeki diğer hocalarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Baőtta Arő. Gör. Cansu Akbulut olmak üzere araştırma görevlisi arkadaőtlarıma, manevi desteklerinden dolayı eőtım Lamia Din'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Zebra balığının sistematığı.....	3
2.2. Gelişim Evreleri.....	4
2.2.1. Zigot evresi.....	4
2.2.2. Segmentasyon (Yarıklanma) evresi.....	4
2.2.3. Blastula evresi.....	5
2.2.4. Gastrula evresi.....	6
2.2.5. Faringula (geçiş evresi).....	8
2.2.6. Koryondan çıkma evresi.....	8
2.2.7. Larval evre.....	8
2.2.8. Genç (juvenil) evre.....	9
2.2.9. Ergin evre.....	9
2.3. Çevre Kirliliği.....	10
2.4. Endokrin Bozucu Bileşikler.....	11

2.4.1. Endokrin bozucuların sınıflandırılması.....	12
2.4.2. Endokrin bozucu bileşiklerin zararları.....	12
2.4.3. Alkilfenol Etoksilatlar.....	14
2.4.3.1. 4-tert Oktilfenol.....	16
2.5. Herbisitler.....	17
2.5.1. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit.....	17
BÖLÜM 3.	
LİTERATÜR ÖZETİ.....	20
3.1 Oktilfenol ile Yapılan Çalışmalar.....	20
3.2. 2,4-D ile Yapılan Çalışmalar.....	22
BÖLÜM 4.	
MATERYAL VE METOT.....	27
4.1. Materyal.....	32
4.1.1. 4-tert Oktilfenol.....	27
4.1.2. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit.....	28
4.2. Metot.....	29
4.2.1. Laboratuvar Ortamı.....	29
4.2.2. Zebra Balığı Yumurtalarının Toplanması.....	29
4.2.3. Bileşiklerin Uygulanması.....	30
BÖLÜM 5.	
BULGULAR.....	32
5.1. LC <sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması.....	32
5.2. Yumurta ve Embriyo Mortalitesi.....	33
5.3. Morfolojik Anormallikler.....	35
BÖLÜM 6.	
TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

BPA	: Bisfenol A
OP	: Oktilfenol
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
LC <sub>50</sub>	: Lethal Konsantrasyon %50
EC <sub>50</sub>	: Efektif Konsantrasyon %50
FET	: Balık Ekotoksisite Testi
PCB	: Poliklorlu Bifeniller
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroethan
EBB	: Endokrin Bozucu Bileşikler
AP	: Alkilfenol Etoksilatlar
ER	: Östrojen Reseptörü
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
DoE	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Bakanlığı
APE	: Alkil Fenol Etoksilatlar
NP	: Nonilfenol
DMA	: Dimetil Amin
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
°C	: Santigrat Derece
cm <sup>3</sup>	: Santimetreküp
mm Hg	: Milimetre Civa
ppm	: Milyonda bir birim

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Döllenmeden yaklaşık 10 dakika sonra zigot.....	4
Şekil 2.2.	45 dakika sonra, iki hücreli evre.....	5
Şekil 2.3.	Döllenmeden yaklaşık 75 dakika sonra 8 hücreli evre.....	5
Şekil 2.4.	2.5 saatlik 500 hücreli evre.....	6
Şekil 2.5.	Epiboli başlangıcı.....	6
Şekil 2.6.	%50 epiboli (5,5 saat) .....	7
Şekil 2.7.	Baş bölgesi kalınlaşması ve kuyruk tomurcuğunun oluşumu (10 saat) .....	7
Şekil 2.8.	10 somitlik (yaklaşık 14 saat) zebra balığı embriyosu.....	7
Şekil 2.9.	Yaklaşık 48 saatlik embriyo.....	8
Şekil 2.10.	Koryondan çıkma evresi.....	9
Şekil 2.11.	5 günlük zebra balığı larvası.....	9
Şekil 2.12.	Ergin zebra balığı.....	10
Şekil 4.1.	4-tert Oktifenol.....	27
Şekil 4.2.	2,4-diklorofenoksiasetik asit.....	28
Şekil 4.3.	FET tesitinin 24 kutucuklu mikropate üzerine uygulanması.....	30
Şekil 5.1.	OP 120 saat süreyle uygulanmış dozları.....	33
Şekil 5.2.	2,4-D 120 saat süreyle uygulanmış dozları.....	34
Şekil 5.3.	48 saatlik a) negatif kontrol ve b) çözücü kontrol zebra balığı embriyoları.....	36
Şekil 5.4.	96 saatlik a) negatif kontrol ve b) çözücü kontrol zebra balığı larvaları.....	36
Şekil 5.5.	5 µM OP uygulanmış 48 saatlik zebra balığı embriyolarında kraniofasial defekt.....	37
Şekil 5.6.	1 µM OP uygulanmış 48 saatlik zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem ve anaksial vücut gelişimi.....	37

Şekil 5.7.	500 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında vertebra sütün defektleri ve perikardial ödem.....	38
Şekil 5.8.	100 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında lordoz.....	38
Şekil 5.9.	2 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz, perikardiyal ve perivitellin ödemler.....	38
Şekil 5.10.	1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz ve perivitellin ödemler.....	39
Şekil 5.11.	1 µM OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz ve perivitellin ödemler.....	39
Şekil 5.12.	0,5µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz perikardiyal ve perivitellin ödemler.....	40
Şekil 5.13.	200 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz ve aşırı büyümüş hava kesesi.....	40
Şekil 5.14.	50 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz ve aşırı büyümüş hava kesesi.....	41
Şekil 5.15.	20 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz ve aşırı büyümüş hava kesesi.....	41
Şekil 5.16.	0,5 µM OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında perikardiyal ödem ve hemoraji.....	41
Şekil 5.17.	1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında hemoraji.....	42
Şekil 5.18.	0 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz ve hava kesesi oluşmaması.....	42
Şekil 5.19.	50 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz.....	42
Şekil 5.20.	5 µM OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz.....	43
Şekil 5.21.	1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz	43
Şekil 5.22.	50 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz.....	44
Şekil 5.23.	0,5 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz.....	44



Şekil 5.24.	50 µM 2,4-D uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz.....	45
Şekil 5.25.	100 µM 2,4-D uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz.....	45
Şekil 5.26.	1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anomalisi lordoz.....	46
Şekil 5.27.	1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anomalisi.....	46
Şekil 5.28.	0,5 µM OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anomalisi.....	47
Şekil 5.29.	2 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anomalisi.....	47

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Zebra Balığının Taksonomisi .....	3
Tablo 3.1.	Farklı 2,4-D Formlarının Çeşitli Balıklar Üzerindeki Akut Toksikitesi.....	28
Tablo 4.1.	Oktilfenol'ün Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikler .....	27
Tablo 4.2.	2,4-Diklorofenoksiasetik Asidin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	28
Tablo 5.1.	OP ve 2,4-D'nin 120 Saatlik LC <sub>50</sub> Değerleri.....	31
Tablo 5.2.	120 Saatlik OP Uygulamalarında Zebra Balığı Embriyo ve Larvaların Elde Edilen Doz-Yanıt Verileri.....	34
Tablo 5.3.	120 Saatlik 2,4-D Uygulamalarında Zebra Balığı Embriyo ve Larvaların Elde Edilen Doz-Yanıt Verileri.....	34

## ÖZET

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı (*Danio rerio*), Oktilfenol, 2,4-D, Teratoloji

Organizmanın endokrin sistemi başta olmak üzere bir savunma üreme ve gelişim gibi birçok kritik sisteme zarar veren yabancı kimyasallara endokrin bozucu bileşikler denir. Bu bileşikler arasında yer alan 4-tert Oktilfenol ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asidin ksenoöstrojen, organizmada birikim yapabilen, temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan bileşiklerdir.

Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, yumurta ve embriyoların saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması, toksik ajanlara duyarlı oluşu ve insanlarla genetik yapısının benzerliği nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında en sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir.

Bu çalışmada Oktilfenolün 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1  $\mu$ M dozları ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asidin 2, 1, 0,5, 0,2 0,1 ve 0,05 mM dozları zebra balığının embriyo ve larvaları üzerine uygulanmıştır. Uygulama balık ekotoksisite testi (Fish Ecotoxicity Test) yöntemiyle yapılmıştır. Uygulama kimyasalları suda çözünmediğinden dolayı %1 lik Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Oktifenol ve 2,4-D için 120 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bu kimyasalların embriyo ve larvalara olan morfolojik etkilerini incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonunda 120 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri Oktilfenol için 1,592  $\mu$ M 2,4-D için 1,185 mM çıkmıştır. Ayrıca embriyo ve larvalarda blastodermal lezyon, kranofasiyal defekt, vertebral defektleri, perikardial ve perivitellin ödemler, hemoralji gibi morfolojik anomaliler tespit edilmiştir.

## SUMMARY

Keywords: Zebrafish (*Danio rerio*), Octylphenol, 2,4-D, teratology

Foreign chemicals that harm organism's many critical systems such as endocrine, immune, reproductive and developmental systems are called endocrine-disrupting compounds. Among these compounds, the 4-tert Octylphenol and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid that are xenoestrogens which can accumulate in organisms, and found in cleaning products, paint, herbicides, pesticides and used in the construction materials.

Zebrafish are resilient has transparent eggs and embryos, development can be monitoring easily, generation time is short, sensitive to toxic agents and with the genetic structure similar to humans, for these reasons zebrafish are the most frequently used model organism in toxicology studies

In this study we apply doses of 10, 5, 2, 1, 0,5 and 0,1  $\mu\text{M}$  Octylphenol and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid 2, 1, 0,5, 0,2 0,1 and 0,05 mM on zebrafish embryo and larva via Fish Ecotoxicity Test. Application chemicals are insoluble in water so firstly we solve chemicals in %1 DMSO. We calculate 120 hour  $\text{LC}_{50}$  values of Octylphenol and 2,4-D. Also we investigate morphological effects of these chemicals on zebrafish embryo and larvae.

As a result we find 120 hour  $\text{LC}_{50}$  values for Octylphenol 1,592  $\mu\text{M}$  and for 2,4-D 1,185 mM Also we find morphological defects such as blastodermal lesion, craniofacial defects, vertebral defects, pericardial and perivitellin edema and hemoralgy on zebrafish embryo and larvae.

## **BÖLÜM 1. GİRİŞ**

Çevre, endüstriyel tesisler ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan yabancı organik bileşiklerle kirlenmektedir. Bu bileşikler arasında organizmanın endokrin sistemi başta olmak üzere savunma üreme ve gelişim gibi birçok kritik sisteme zarar veren kimyasal arasında Endokrin Bozucu Bileşikler (EBB) yer alır. EBB organizmaya harici olarak alınan, doğal veya insan kaynaklı, bireysel veya popülasyon seviyelerinde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz negatif etkiler yapan kimyasallardır. Bu kirleticiler özellikle, endüstriyel tesisler ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan atık sularla sucul ekosisteme dahil olmaktadır.

Balıklar çevresel kirliliğin izlenmesinde uygun organizmalardır. Çünkü hem beslenme yoluyla hem de direkt olarak sudan kirleticileri alarak dokularında yoğunlaştırırlar. Böylece besin zinciri yoluyla kirliliğin taşınmasına neden olurlar.

Bu çalışmada etkilerini incelemek üzere seçtiğimiz kimyasallardan biri 4-tert Oktilfenol'dür (OP). OP, Alkilfenol etoksilatlarına ait bir iyonik olmayan surfektanlardır. Temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşiklerdir. Yağda çözünen bir bileşik olduğu için besin zinciri içerisindeki üst canlıların yağ dokularında birikim yapmaktadır. Endokrin bozucu bir bileşik olduğu için organizmaların birçok sistemini etkileyerek zarar vermektedir. Sucul canlılar üzerindeki etkileri konusunda yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır (Naylor, 1992; Markey, 2001; Ying, 2002).

Bu çalışmada etkilerini incelemek üzere seçtiğimiz kimyasallardan diğeri 2,4-Diklorofenoksiasetik asittir. 2,4-D herbisidi bir klorofenoksi asetik asit türevine ait

seçici ve sistematik bir herbisittir. Herbisitler yabancı otlarla mücadelede kullanılan zirai ilaçlardır. Yapılan çalışmalarda 2,4-D'nin sucul canlılar için teratojenik ve nörotoksik olabileceği belirtilmiş, ancak yapılan çalışmalar son derece sınırlı kalmıştır (WSDE, 2001).

Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış dölllenmeyle üremeleri, yumurta ve embriyoların saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, üreme zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında en sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir (Lele, 1996).

Son yıllarda ekotoksikoloji çalışmalarında *Danio rerio* (Zebra balığı) yumurtaları ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüzden zebra balıkları gelişim ve toksikoloji çalışmalarında en önemli model organizmalardan biri haline gelmiştir (Page, 1990; Lele, 1996; Roush, 1996; Briggs, 2002; Nagel, 2002; Langheinrich, 2003; Hill, 2005; Yang, 2009; Norton, 2010; Busch ve ark., 2011; Sipes 2011; Strähle ve ark., 2012; Konantz, 2012).

Bu çalışmada Oktifenolün ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asidin farklı dozlarının zebra balığının embriyo ve larvaları üzerine uygulanmıştır. Uygulama balık ekotoksikite testi (Fish Ecotoxicity Test) yöntemiyle yapılmıştır. Oktifenol ve 2,4-D için 120 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bu kimyasalların embriyo ve larvalara olan morfolojik etkisinin olup olmadığı varsa hangi dozlarda etkili olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri

#### 2.1.1. Zebra Balığının Sistematığı

Zebra balığı, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) Cyprinidae familyasına ait (Tablo 2.1) tropikal bir türdür. Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları baskın olarak da Pakistan ve Hindistan'da da bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Zebra balığının taksonomisi

Phylum	: Chordata
Classis	: Osteichthyes (Kemikli balıklar)
Ordo	: Cypriniformes
Familya	: Cyprinidae
Cins	: Danio (= Branchydanio)
Tür	: Danio rerio (Zebra balığı)

Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülü olduğundan zebra balığı olarak adlandırılmaktadır. Danio ismi Bengalce'de, pirinç tarlasından anlamına gelen “*dhani*” kelimesinden almaktadır (Talwar ve Jhingran, 1991). Uygun koşullar altında bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması nedeniyle 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak üzerinde araştırmaların yapıldığı bir türdür. Genetikte (Norton, 2010), gelişim biyolojisinde (Page, 1990; Roush, 1996; Lele, 1996), çevresel toksikolojide (Lele, 1996; Nagel, 2002; Hill, 2005; Yang, 2009; Sipes 2011), farmakolojide (Langheinrich, 2003), nörofizyolojide (Briggs, 2002), kanser (Konantz, 2012) ve birçok hastalık modeli (Sullivan, 2008; Berger, 2012; Li, 2012) konularında kullanılan omurgalı model organizmadır (Vascotto, 1997; Grunwald ve

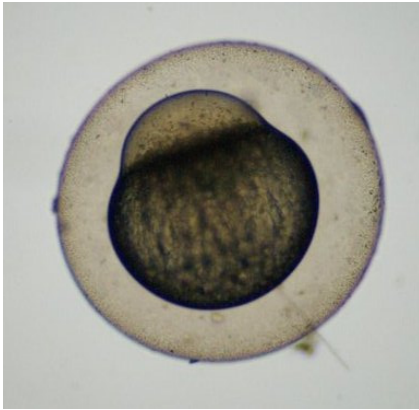
Eisen, 2002). Ergin boyları 4,5 - 5 cm uzunluktadır Erkek bireyler dişi bireylerden morfolojik olarak farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptirler. Yaklaşık üreme sıcaklığı 28,5°C'dir. 90 günlük olgunluğa eriştikleri zaman yumurtlayabilirler. Bir seferde 50-700 arasında yumurta bırakabilir. Yumurta sayısı dişinin yaşına ve vücut büyüklüğüne bağlıdır (Spencer, 2008).

## 2.2. Gelişim Evreleri

Zebra balığında embriyo gelişimi; zigot, segmentasyon (yarıklanma), blastula, gastrula, faringula (geçiş evresi) ile koryondan çıkma, larval, genç (juvenil) ve ergin evreler olarak devam eder (Kimmel ve ark., 1995).

### 2.2.1. Zigot evresi (0-45 Dk)

Zebra balığı yumurtaları teleostesittir. Fertilizasyondan yaklaşık 10 dakika sonra (Şekil 2.1), teleost yumurtaların sitoplazması animal kutupta toplanır ve nükleusu çevreler. Yumurta sitoplazmasının bu kısmı blastodisk olarak adlandırılmaktadır.

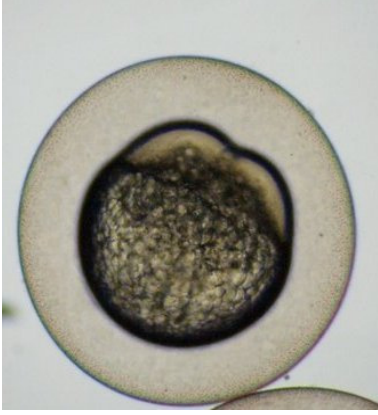


Şekil 2.1. Döllenenmeden yaklaşık 10 dakika sonra zigot.

### 2.2.2. Segmentasyon (Yarıklanma) evresi (45 – 120 dk)



İlk bölünme fertilizasyondan yaklaşık 45 dakika sonra gerçekleşir (Şekil 2.2). Daha sonra blastomerler yaklaşık olarak 15'er dakika arayla bölünmeye devam eder (Şekil 2.3). 128 hücre oluştuktan sonra blastula evresi başlar.



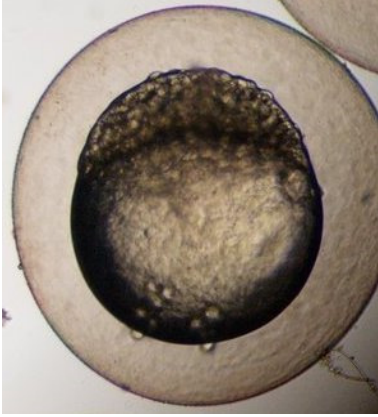
Şekil 2.2. İki hücreli evre, 45 dakika sonra embriyo.



Şekil 2.3. 8 hücreli evre, döllenmeden yaklaşık 75 dakika sonra embriyo.

### 2.2.3. Blastula evresi (2 – 5 saat)

Blastodiskte yaklaşık döllenmeden 2 saat sonra, 128 hücre oluştuğu zaman başlar. Bu evrede 512 hücre safhasındayken (Şekil 2.4) orta-blastosöl geçişi (*mid-blastula transition*) (*MBT*) şekillenir. 1000 hücreli iken vitellus sinsitiyal tabakası (*yolk syncytial layer*) (*YSL*) görülmektedir. Epiboli (Şekil 2.5), blastula periyodunun sonunda başlamaktadır. Bu safha, vitellus üzerindeki *YSL*'in yayılması ve blastodisk hücre tepesinde eşzamanlı olarak meydana gelen incelme ve yayılma ile karakterize edilmektedir. Epiboli safhası, vitellusun hepsi embriyo ile çevrildiği zaman gastrulasyonun sonuna kadar devam eder.



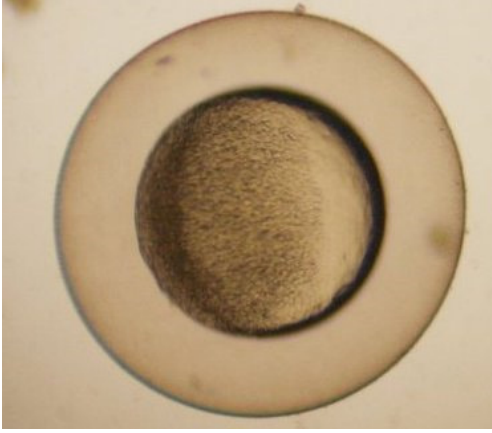
Şekil 2.4. 500 hücreli evre, döllenmeden yaklaşık 2,5 saat sonra embriyo.



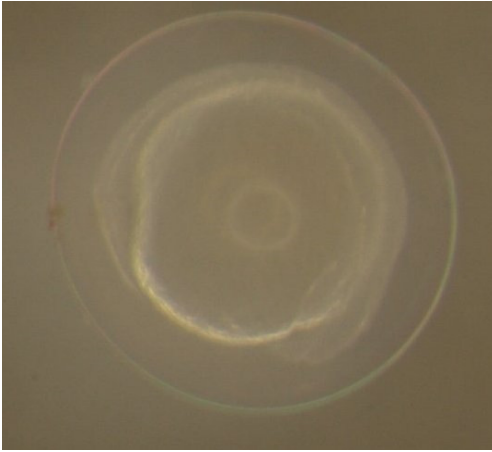
Şekil 2.5. Embriyoda epiboli başlangıcı

#### 2.2.4. Gastrula evresi (5-24 saat)

Epibolinin vitellusun 1/3'ünü kapladığı zaman başlar, döllenmeden sonra yaklaşık 5 saatlik bir süre geçmiştir (Şekil 2.6). Blastoderm hızlı bölünmelerle vitellüsü kaplamaya devam eder, epiboli tamamlanmaya yakın dorsal bölgede kalınlaşma, kuyruk tomurcuğu ve baş bölgesi farklılaşma gözlemlenir (Şekil 2.7). İlk somitlerin ve optik vesiküllerin oluşumu ile devam eder (Şekil 2.8). 18 saat sonunda artık tipik balık şekliyle tanınabilir ve işitme plakları gelişmiştir.



Şekil 2.6. Embriyoda %50 epiboli döllenmeden yaklaşık 5,5 saat sonra.



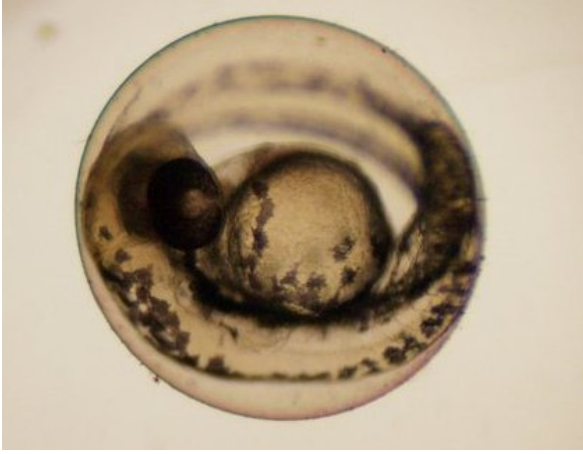
Şekil 2.7. Baş bölgesi kalınlaşması ve kuyruk tomurcuğunun oluşumu Döllenmeden yaklaşık 10 saat sonra.



Şekil 2.8. 10 somitlik Zebra balığı embriyosu, döllenmeden yaklaşık 14 saat sonra.

### 2.2.5. Faringula (Geçiş evresi) (24-48 saat)

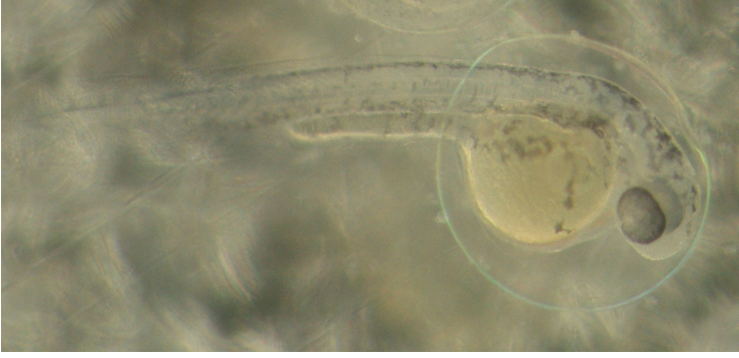
24 somitli embriyonun balık şekline kavuştuğu, retinada vücutta pigmentasyonun başladığı evredir (36. saat). Yemek borusu başta olmak üzere sindirim sisteminin gelişiminden dolayı bu periyoda faringula periyodu denilmektedir (Şekil 2.9). Kuyruk epeyce uzar ve kalp atışı başlar ve 1-2 saat içinde kan dolaşımı görülebilir. Somitler 30 tanedir.



Şekil 2.9. Yaklaşık 48 saatlik Zebra balığı embriyosu.

### 2.2.6. Koryondan çıkma evresi (48-72 saat)

Embriyo koryondan çıkmaya hazır hale gelirken bir yandan da baş bölgesinde yaygın bir sarı renklenme başlar. Kalp atışı düzenlidir. Kuyruğun şiddetli kontraksiyonuyla koryon herhangi bir yerden yırtılmakta ve larva dışarı çıkmaktadır (Şekil 2.10). Aynı şartlar altındaki yumurtaların çoğunun koryondan çıkma zamanları oldukça değişiktir. Ama bu süre normal olarak 28°C'de yaklaşık 72. saatte tamamlanır.



Şekil 2.10. Koryondan çıkma evresi

### 2.2.7. Larval evre (72 saat- 30 gün)

Embriyolar koryondan çıktıktan sonra larva olarak adlandırılır (Şekil 2.11). Yüzmeye başlayan larvaların hava keseleri şişmeye başlamıştır. Vitellüs keseleri tamamen bittiği için beslenmeye ihtiyaç duyarlar.



Şekil 2.11. 5 günlük Zebra balığı larvası

### 2.2.8. Genç (juvenil) evre (30-90 gün)

Bu süreç ergin hale gelinceye kadar yaklaşık 90 gün devam edecektir.

### 2.2.9. Ergin evre

Zebra Balığı erginliğe yaklaşık 90 günde ulaşır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Ergin Zebra balığı (<http://www.sphere.be/> adresinden alınmıştır.)

### 2.3. Çevre Kirliliği

Dünya nüfusu 20. yüzyıl boyunca üç katına ulaşmış iken, su kaynaklarının kullanımı altı kat artmıştır. Gelecek 50 yıl içerisinde, dünya nüfusunun % 40-50 oranında artacağı düşünülmektedir. Bu nüfus artışının endüstrileşme ve kentleşme ile birleşmesi, su isteğinin artması ile sonuçlanacak ve çevre üzerinde çok önemli olumsuz sonuçlara yol açacaktır (WWC, 2006).

Geçmiş zamanlarla kıyaslandığında, günümüzde atık su üretimi ve bunun dağılımı zaten en üst seviyededir. İnsanlar tarafından su kullanımının artışı sadece endüstriyel ve tarımsal gelişim için gerekli olan su miktarını azaltmamakta, ayrıca sucul ekosistemler ve bunların bağımlı türleri için yıkıcı etkilere neden olmaktadır (WWC, 2006).

Çevre, endüstriyel tesisler ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan yabancı organik bileşiklerle kirlenmektedir. Kirleticilerin binlercesi üretilmekte ve kısmen çevreye verilmektedir (Van Der Oost, 2003; Miller, 2003). Özellikle gelişmekte olan ülkelerde arıtılmamış endüstriyel, evsel ve tarımsal atıklar önemli bir sorundur. Atık arıtım tesislerinden yoksun endüstriyel kuruluşlar, sıklıkla nehir yatakları ya da diğer su yolları üzerinde yer almaktadır. Bu kuruluşlar katı ve sıvı atıklarını doğrudan veya dolaylı olarak su kaynaklarına vermektedir, bu ise nehirler aracılığı ile denizlere ve okyanuslara taşınarak önemli su kirliliğine neden olmaktadır (Al-Arabi, 2005).

Kirleticiler doğal sulara ulaştıkları zaman sucul organizmaların organlarında birikerek zararlı etkiler meydana getirirler. Bu nedenle balıklar sudaki çevresel

kirleticilere daha duyarlıdır. Kirleticiler önemli doku hasarları ile sonuçlanabilecek belirli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde önemli bozukluklara neden olabilir (Balin, 1997). Son yıllarda çevresel kirliliğe bağlı olarak, popülasyonlarda azalmalar olduğu ve özellikle erkek birey sayısının bazı türlerde önemli düzeyde azalış gösterdiği kaydedilmektedir. Bunun başlıca nedeninin endokrin bozucu etkiye sahip ya da endokrin taklitçisi olarak rol oynayan maddeler (ksenoöstrojen ya da çevresel östrojen) olduğuna işaret edilmektedir (Hutchinson, 2002; Moncaut, 2003; Hirano, 2004).

#### **2.4. Endokrin Bozucu Bileşikler**

Endokrin bozucu bileşikler (EBB), organizmaya harici olarak alınan, doğal veya insan kaynaklı, bireysel veya popülasyon seviyelerinde geri dönüşümlü veya dönüşümsüz negatif etkiler yapan kimyasallardır. Vücudun normal hormonal sistemine etkileri; doğal hormonları taklit ederek normal sentezleri ve hormonal fonksiyonları engelleme, depolanan hormonları serbest bırakma, salgı, taşınım mekanizmalarını engelleme, bağlanma ve doğal hormonları devre dışı bırakma şeklindedir (USEPA, 1998).

Endokrin bozucu bileşikler, organizmanın işleyişin dengelenmesinden sorumlu doğal hormonların aktivitesini, tutulmasını, metabolizmasını, taşınımını, üretimini etkilemektedir (EPA, 1997). EBB etkileri biyokimyasal olabildiği gibi moleküler, hücre, doku, organ, organizma, popülasyon, kommunité ve ekosistemi içeren birçok biyolojik organizasyon seviyesinde meydana gelmektedir (Hoffman ve ark., 2003).

Hormon bozucu kimyasallar farklı yollar ile organizmanın hormonal sistemini etkilemektedir. EBB'lerin vücudun hormonal sistemine etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- Endojen (doğal) hormonları taklit ederek hormon sentezini ve hormonal fonksiyonlarını engelleme,
- Depolanan hormonları serbest bırakma, salgı, taşınım mekanizmalarını engelleme ve bağlanma,
- Doğal hormonları devre dışı bırakma,

- Hormon reseptörlerini antagonize ya da agonize etme (Markey ve ark., 2003; Maffini ve ark., 2006).

Endokrin bozucu bileşikler doğal östrojenlere benzer etkilere sahip özellikle olmalarından dolayı bu kimyasallar aynı zamanda çevresel östrojenler ya da ekzojen östrojenler olarak da kabul edilir. Bu çevresel östrojenik bileşikler, östrojen reseptörüne bağlanma ve tepkime oluşturma prensibine dayanan testlerle tayin edilebilmektedir (Sonnenschein ve Soto, 1998; Cook ve ark., 1997; EPA, 1998).

#### **2.4.1. Endokrin bozucuların sınıflandırılması**

Çevresel ortamlarda bulunabilen ve birikim yapma özelliğine sahip çevresel östrojenler şunlardır (Lintelmann ve ark., 2003; Colborn ve ark., 1993);

- Doğal östrojenler: Fitoöstrojenler, hayvan steroidleri, mikoöstrojenler vb.
- Sentetik steroidler: 17 $\alpha$  etinil östradiol (EE<sub>2</sub>), dietilstilbestrol (DES), zeranol, trenbolon, mestranol.
- Organoklorlu pestisitler: Dikloro difenol triklorethan (DDT) ve metabolitleri, metoksiklor, kepon, lindan, atrazin.
- Endüstriyel kimyasallar: Fenoller, dioksinler, poliklorlu bifeniller (PCB), alkilfenol etoksilatlar (APE), çok halkalı aromatik hidrokarbonlar (PAH), vb.
- Plastikler ve monomerleri: Bisphenol A (BPA), fitalatlar.

#### **2.4.2. Endokrin bozucu bileşiklerin zararları**

Çevredeki insan yapımı kimyasal maddelere maruz kalmanın insanların fetal ve ergin dönem üzerindeki genel, üreme sistemi ve kanser yapıcı etkileri konusunda ilk çalışma Sullivan ve Barlow tarafından 1979 yılında yapılmıştır. 1988'de Finkelstein ve arkadaşlarının tespitlerinde kozmetikte kullanılan bazı maddelerin endokrin bozucu kimyasallar ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.



Endokrin bozucu bileşiklerin (EBB) kimyasal yapıları oldukça geniş bir farklılık göstermektedir. Bu kimyasalların hormon tahrip edici etkileri *invitro* ve *invivo* çalışmalar ile tespit edilmektedir. EBB testlerinin çoğu östrojen hormonunu taklit eden östrojenik kimyasallara odaklanmıştır. Birçok kimyasalın östrojenik temelli olduğu kültür şartlarında insan ya da hayvan hücreleri kullanılarak tayin edilmiştir. Farklı canlılar kullanılarak östrojenik rol oynayan kimyasalların tespit edilmesi söz konusudur. Balıklar kullanılarak bu kimyasallar ile kirlenmiş sucul ortamdaki etkiler belirlenebilmektedir (Sumpter ve ark., 1995). İnsan hücreleri kullanılarak geliştirilen testler ise bu kimyasallardan korunma amacıyla geliştirilmiştir (Soto ve ark., 1995).

Vücuda alındığında doğal hormonları taklit edip üreme sistemini bozan çevresel östrojenlerin doğada birçok hayvan türünde (bazı balıklarda, kuşlarda, memelilerde ve timsahlarda) cinsiyet bozuklukları, cinsiyetsiz doğumlar, sperm sayılarında azalmalar, erkek organizmalarda dişilik, dişi organizmalarda da erkeklik özelliklerini arttırdığı tespit edilmiştir (Colborn ve ark., 1993; Sonnenschein ve ark., 1998). Canlıların çevresel östrojene maruz kaldığı dönem (özellikle fetal ve neonatal dönem), aldığı doz ve süresi ortaya çıkacak patolojinin şiddetinde önemli rol oynar (Markey ve ark., 2003). Sentetik olarak üretilen bu maddeler evsel ve endüstriyel atık sulara karışmakta ve göl, ırmak, deniz gibi doğal sularda, içme suyu kaynaklarında, toprakta ve beslenme zincirlerinde birikmektedirler. Bu bileşikler kimyasal kararlılıklarından dolayı onlarca yıl doğada parçalanmadan kalabilmektedir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan PCB, dioksin, DDT ve birçok organoklorlu pestisitler gibi EBB'lar lipofilik yapıda oldukları için memelilerde adipoz ve meme dokuda, kuşlarda ise özellikle yağdan zengin yumurta sarısında birikmektedir. Bu kimyasalların vücutta yarılanma ömürleri oldukça uzundur ve dolayısıyla düşük dozlarda bile vücutta önemli etkilere yol açabilmektedirler (Fry 1995; Colborn 1993).

Bazı bölgelerde alkilfenollerin balıklarda dişileşmeden sorumlu kimyasal olduğu belirlenmiştir (Jobling ve ark., 1995). Alkifenollerin (AP) parçalanma ürünü olan nonilfenol ve oktilfenol'ün balık dokularında oldukça yüksek oranlarda biriktiği (Warhust, 1995; Schwaiger ve ark., 2000), vitellojeninin sentezlenmesine ve testis boyunun küçülmesine neden olduğu rapor edilmiştir (Jobling ve ark., 1996).

Yapılan çalışmalarda omurgalı canlıların embriyo-larval ve ergenlik öncesi devirlerin toksik maddelerin etkilenme konusunda en hassas dönemleri olduğu kanaati oluşmuştur (McKim, 1977; Jin ve ark., 2009).

### 2.4.3. Alkilfenol Etoksilatlar

Alkilfenol etoksilatlar iyonik olmayan surfektanlardır. Etilen oksitle reaksiyona giren dallanmış zincirli alkilfenol içerirler ve etoksilat zinciri oluştururlar. Alkil fenol etoksilatlar (APE), temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşiklerdir. İlk defa tanımlanması 1944 yılında İngiltere’de gerçekleşmiş, evsel ürünlerde ve endüstride geniş yayılım gösterdiği belirlenmiştir (CES, 1993). Biyolojik olarak kolay parçalanma özelliğinde olan alkil fenol etoksilatların parçalanma ürünleri arasında oktilfenol ve nonilfenol gibi ürünler açığa çıkmaktadır. Bu parçalanma ürünleri toksik ve biyolojik olarak parçalamaya karşı dirençli yapılardır (Warhurst, 1995). Ticari olarak satılan APE’ler 100’den fazla izomeri bulunmaktadır (Ieda ve ark., 2005). Nonilfenol etoksilatlar ticari olarak dünya pazarında %80’lik oranda kullanılırken oktilfenol etoksilatlar %20’lik pay almaktadır (White ve ark., 1994). Dünyada yıllık 500000 ton kadar APE üretilmekte (Renner, 1997) ve bunun % 60’ı nonilfenol, oktilfenol gibi metabolitler olarak ırmak, göl ve haliçlere bırakılmaktadır (Jobling, 1996; Ahel, 1994). Çevredeki APE’nin temel kaynakları; lağım suları ile muamele edilmiş bitkiler, yün, yapağı ve et ürünleri gibi hayvansal üretim işlem atıklarıdır (Talmage, 1994). Bu bileşiklerin dünyadaki toplam üretim miktarının % 60’dan fazlası kanalizasyon ve endüstriyel atıklarla sularda toplanmaktadır (İşcan ve ark., 2001). Bu hidrofobik bileşikler atık sularda daha yoğun olarak da tortularda ve sedimentlerde bulunurlar (Giger ve ark., 1984).

Birçok çalışma alkilfenol etoksilatların yüksek derecede östrojenik aktivite gösteren bileşik olduğunu ifade etmesine rağmen bunun mekanizması çok açık değildir (Purdom ve ark., 1994; Sharpe ve ark., 1995; Blake ve Ashiru, 1997; Kwack ve ark., 2002). Kemirgenler üzerinde yapılan deneylerde alkilfenollerin östrojenik etkileri (Owens ve Koeter, 2003), gelişim (Bogh ve ark., 2001) ve üreme sistemi (Darmani

ve Al-Hiyasat, 2004) üzerine olan etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca bazı allerjik inflamasyonları tetiklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Suen, 2012).

Günümüzde ise endüstriyel surfektan olarak ve hala bazı evsel kullanım amaçlı olarak görev yapmaktadırlar (Soto ve ark., 1991). Nonilfenol etoksilatların deterjanlarda kullanılması İngiltere’de 1976 yılında yasaklanmıştır (DoE, 1992). Ayrıca Oktoksinol-9 ve nonoksinol-9 olarak spersisit olarak kullanılmaktadır (Bartman, 2001). Oktoksinol-9 1992 yılında FDA tarafından onaylanmadığı için üretimden kaldırılmıştır (FDA, 2002).

Alkilfenoller gibi birçok EBB yağlarda çözünebilmektedir. Bunun sonucunda insanlar ve hayvanların bu toksik maddeler içeren besinler ile beslenmesi yoluyla vücutlarına girmesi ve yağ dokularına birikmesi söz konusudur. Canlıların yağ dokusunda biriken kimyasalların biyolojik birikimi alınan kimyasalın miktarına bağlıdır (Hall, 1992; Warhust, 1995). Bu kimyasalların birçoğunu yağ dokusundaki seviyeleri bir hayvanın diğerini yemesi ile artmaktadır. Bundan dolayı da en yüksek seviyeler insan, yunus, fok ve balık ile beslenen kuşlar gibi besin zincirinin en üstünde bulunan canlılarda bulunmaktadır. (Allsop ve ark., 1997).

Alkilfenol kullanımı açısından ülkemizde de durum çok farklı değildir, alkilfenollerin kullanımı yaygındır. İşcan ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada, Karadeniz bölgesindeki nehir ve derelerden örnekler alınmıştır. Su örneklerinde alkilfenole rastlanmamakla birlikte, balık dokularında ve sediman örneklerinde alkilfenole rastlanmıştır. İşcan ve arkadaşları alkilfenollerin balık dokularında gözlemlenmesinin, nehirlerimizde alkilfenol varlığını bir göstergesi olduğunu açıklamışlardır (İşcan ve ark., 2001).

### 2.4.3.1. 4-tert Oktilfenol

Oktilfenol, alkilfenol etoksilatlarının biyoparçalanma ürünü olan non-iyonik yüzey aktif maddesidir. Şekil 4.1’de ve Tablo 4.1’de özellikleri belirtilen Oktilfenol, genel formülü  $C_8H_{17}.C_6H_4(OH)$  olan isomerik bileşikler olarak bilinmektedir. Oktil grubu ( $C_8H_{17}$ ) çeşitli yollarla dallanır ya da kuvvetli bir zincir oluşturabilir. Bu izomerlerden oktilfenol ticari olarak büyük bir öneme sahiptir (OSPAR, 2003). Oktilfenoller, deterjanların yapımında, plastik endüstrisinde (Bechmann, 1999; Ying ve ark., 2002), kağıt (Latorre ve ark., 2005), tekstil, deri ve metal (BAFU, 2007) endüstrilerinde, pestisitler, herbisitler, boyalar, antioksidanların sentezinde, kişisel bakım ürünlerinde (Grisolia, 2004; Adachi ve ark., 2005), oyuncaklarda, bebek biberonlarında, kontakt lenslerde (Çakal ve Parlak, 2007), kondomda ve vajinal gebelik önleyici ilaçlarda spermisidal ajan olarak (Leung ve Ballantyne, 1999) fotoğraf kimyasallarında ve ilaçlarda (Markey ve ark., 2001) kullanılmaktadırlar. OP’nin 1999 yılında 9500 ton üretildiği ve bu zamana kadar her yıl satışında 500 ton artış olduğu rapor edilmiştir (OSPAR, 2003).

Oktilfenol etoksilatlar daha kalıcı olan oktilfenole mono ve dietoksilate ve bunlarında parçalanması ile oktilfenole indirgenir (Warhurst, 1995). OP ve NP diğer APE’lere göre daha dayanıklı, daha kalıcı ve daha toksiktir (Naylor ve ark., 1992). Oktilfenolün sudaki yarı ömrü 60 gün, sedimentte ki yarı ömrü ise 180 gün olarak belirtilmiştir (Ahel ve ark., 1994). Canlılarda yarılanma ömürleri canlı türü, cinsiyet ve hatta suşları için büyük farklılık göstermektedir. Winstar erkek ratlarda 5 saat (Certa ve ark., 1996) iken, Han dişi ratlarda 36 saat (Upmeier, 1999), yıllık balıklarında (Killifish, *Oryzias latipes*) 8 saat (Tsuda, 2001) civarındadır.

Birçok OP çevreye endüstriyel atık sular ile doğrudan ulaşmaktadır. Oktilfenol' ün arıtma tesisleri ile ulaştığı nehirler ve akarsularda 1 mg/l nin altında bulunduğu rapor edilmiştir (Blackburn ve Waldock, 1995; Bennie ve ark., 1997; Isobe ve ark., 2001). Suda yaşayan canlıların, kuşların iç organlarında ortamda bulunan seviyelerden 100 kat fazla birikim tespit edilmiştir. (Harris ve ark., 2001, OSPAR, 2003)

OP ve NP Avrupa komisyonu su politikaları alanındaki önemli maddeler listesinde öncelikli zararlı maddeler olarak sınıflandırmış ve kullanımını kısıtlanmıştır (EPC, 2003).

## 2.5. Herbisitler

Herbisitler yabancı otlarla mücadelede kullanılan zirai ilaçlardır. Genel anlamda, yabancı otları öldürmede veya normal gelişimini önlemede kullanılan kimyasal maddelerin tümüne birden herbisit denir. 1900'lü yıllardan itibaren sülfürik asit, demir sülfat, bakır nitrat, amonyak ve bazı potasyum tuzları herbisit olarak kullanılmıştır.

Herbisitler genel olarak iki gruba ayrılırlar;

- Seçici olmayan herbisitler (total herbisitler)
- Seçici herbisitler (selektif herbisitler)

Herbisitler bitkilere etki yerlerine göre de üçe ayrılır:

- Sistemik herbisitler: Bitkinin vasküler sistemine yayılarak etki ederler. Bitkinin kök ve yapraklarıyla temas halinde olduklarından bitkinin damarlarından hızla absorbe edilirler. 2,4-D bu gruba verilebilecek bir örnektir.
- Kök ve tohumları etkileyen herbisitler: Toprağa bırakılan herbisitler tohumlara ve köklere etkiyerek gelişmelerini engeller.
- Kontakt herbisitler: Bitkinin yaprak ve gövdesiyle temas ettiği an ölümüne neden olan herbisit grubudur (WSDE, 2001).

Çalışma konusunu oluşturan 2,4-D, seçici ve sistematik bir herbisittir.

### 2.5.1.2,4-Diklorofenoksiasetik Asit

Herbisitler yabancı otlarla mücadelede kullanılan zirai ilaçlardır. Genel anlamda, yabancı otları öldürmede veya normal gelişimini önlemede kullanılan kimyasal maddelerin tümüne birden herbisit denir. Çalışma konusunu oluşturan 2,4-D

dimetilamin (DMA) formu bir klorofenoksi asetik asit türevidir. Şekil 4.2’de ve Tablo 4.2’de özellikleri belirtilen klorofenoksi asetik asit de, seçici ve sistematik bir herbisittir. Fenoksi asitler grubuna dahil bu kimyasal maddelerin asıl görevleri bitkinin kontrolsüz ve hızlı büyümesine neden olarak ölmesini sağlamaktır. Yüksek derecede seçici herbisitler sınıfına dahildirler (WSDE, 2001). 2,4-D maliyet düşüklüğü ve üretim kolaylığı açısından tercih edilmektedir. 2,4-D ticari olarak satılan ilk herbisitlerden biridir. 1940’ların sonlarına doğru ABD’de satışa sunulmuştur. 2,4-D zirai ve zirai olmayan alanlarda kullanılan bir herbisit olup Türkiye’de de kullanılmaktadır. Tüm dünyada 300 milyon doları aşan, özellikle oldukça büyük bir pazara sahiptir (EPA, 2005).

2,4-D birincil olarak tarım, ormancılık, çim alanların bakım uygulamalarının yanında eğlence alanları, parklar, golf sahaları, sokak kenarları, endüstriyel arsalar ve bahçıvanlıkta da kullanılmaktadır. Bitkiler 2,4-D’yi uygulamadan sonraki 4 ila 6 saat içerisinde absorblar (Kwan ve Chu, 2004). 2,4-D yabancı otların kök ve sürgün büyüme noktalarında birikerek büyümeyi inhibe eder (Shankar ve ark., 2006). Fenoksiherbisitlerin geniş yapraklı bitkileri öldürdüğü, ancak çimleri ve kozalaklı ağaçları etkilemediği belirlenmiştir. Bunların yapısı, protein ve DNA sentezini engelleyen ve meristematik dokuların kontrolsüz gelişimine neden olan doğal oluşumlu bitki hormonlarının -oksinlerin- modifikasyonu şeklindedir. Bu nedenle bu sınıf herbisitler bitki hücre ve dokularına, temel metabolik olaylara zarar verirler. Araştırmalar göstermiştir ki; klorlanmış fenoksiasetik asit türevlerinin düşük konsantrasyonları sürgün ve kök büyümesi, tohum çimlenmesi ve fotosentez hızını stimüle edebilir, ancak fazla miktarları bu prosesleri inhibe edebilir. Bitkilerin iletim sistemlerinin anormal büyümeden ötürü bloke olmasına ve böylece ölmelerine neden olur (Hess, 1993). Hücresel yapı bileşenleri (özellikle glukoz, diğer karbohidratlar ve aminoasitler) ile fenoksiherbisitlerin reaksiyon verebilme özelliklerinden dolayı çimenler fenoksi herbisitlere karşı dirençlidir (Sota ve ark., 2003).

Ancak tarımda ve bahçecilikte yaygın olarak kullanılan fenoksi herbisit, ciddi ekolojik etkiler gösterir. Kuşlar ve faydalı böcekler üzerindeki toksik etkilerinin yanında sudaki yaşam, algler, küçük omurgasızlar, amfibiyanlar ve balıklar 2,4-D tarafından olumsuz etkilenirler. 2,4-D serbest asidinin suda çözünebilirliği ve düşük

toprak adsorpsiyon katsayısına sahip oluğu nedeniyle pestisit sızan sularla yer altı sularına geçebilir (Montiel ve ark., 2006).

Dünya Sağlık Örgütü balıklarda 2,4-D'nin teratojenik etki dozunun 1 ppm olduğunu bildirmiştir (WHO, 1984). Amerika Birleşik Devletlerinde 2,4-D'nin kullanıldığı alanlara yakın sularda yaşayan balık ve midyelerde 0,01 - 1,00 ppm 2,4-D saptandığı belirtilmiştir (Schultz ve ark., 1974). Diğer bir çalışmada yakın çevrede 2,4-D kullanılmasıyla ilişkili olarak yüzey sularında 2,4-D maddesine rastlandığı rapor edilmiştir (Osman ve ark., 1963).

## BÖLÜM 3. LİTERATÜR ÖZETİ

### 3.1. Oktilfenol ile Yapılan Çalışmalar

Alkilfenol etoksilatı olan oktilfenol deterjanlarda, çözücülerde, ıslatma ajanlarında ve dağıtıcılarda (dispersant) yoğun şekilde kullanılmaktadır (Talmage ve ark., 1994; Staples ve ark., 1999).

Sucul ortamda OP'ün 0.084 ppb seviyelerinde bulunduğu Bennie ve arkadaşları (1997), tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca bu kimyasalın balıklarda (Gronen ve ark., 1999), kurbağalarda (Kloas ve ark., 1999) ve farelerde (Majdic ve ark., 1997) endokrin hormon fonksiyonlarını bozduğu belirtilmiştir.

İnsanlar üzerinde yapılan oktilfenolle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Calafat ve arkadaşları 2008 yılında 2517 denekten alınan idrar örneklerinde 0,2 ve 20,6 ng/ml arasında oktilfenol ölçmüştür. Tan ve Mohd 2003 yılında yapıkları çalışmada 180 yenidoğandan alınan kordon kanından 31 tanesinde <0.05 ve 1.15 ng/ml oktilfenol ölçümü yapmışlardır. Ademollo ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada insan sütünde 32 ng/ml nonilfenol ve 0.08 ng/ml oktilfenol tespit etmişlerdir.

Androjen-östrojen dengesindeki bozulmalar yüzünden insanlarda spermatogenezin prematur aktivasyonu görülebilir (Kula ve ark.. 1996). Ayrıca OP'nin ratlarda erken ergenlikle birlikte spermatogenezini önceden başlatma yeteneği olduğu bulunmuştur. (Atanassova ve ark., 2000).

Çevresel östrojenlerin balıklar üzerine etkilerinin belirlenmesinde non-iyonik yüzey aktif maddesi, alkilfenollerin parçalanma ürünü olan oktilfenol kullanılmıştır. Bu kimyasalın toksik ve östrojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla birçok tür ile test yapılmıştır. Sharpe ve arkadaşları (1995), 4-tert oktilfenolü standart protokol



tarafından tanımlanmayan fakat testiküler büyüklükte ve sperm sayısında azalmaya neden olmasına rağmen testiküler morfolojisinde etkisi bulunmayan yeni tayin edilmiş plastik kimyasal olarak tanımlanmışlardır.

Erkek gökkuşuğu alabalığı dört alkilfenole maruz bırakıldığında vitellojeninin (VTG) plazma konsantrasyonunda belirgin bir artışa neden olmuştur, bu artış özellikle en az seviyede 3 ppb oktilfenol de belirgin şekilde gözlenmiştir. Nonilfenol ve iki karboksilikasit APE parçalanma ürünleri de bu çalışmada erkeklerde yüksek konsantrasyonlarda VTG üretimini teşvik etmektedir. Aynı zamanda 4 kimyasalın tümü testiküler büyümeyi engellemektedir. Bu etki özellikle oktilfenolde düşük konsantrasyonlarda belirgin olarak gözlenmiştir (Jobling ve ark., 1998).

Zebra Balığı'nın (*Danio rerio*) yumurtlaması üzerine OP' un sınırlayıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir. 25 µg/l OP konsantrasyonda yumurtlamanın azaldığı rapor edilmiştir (Van Del Belt ve ark., 2001). Bu çalışma sonucunda 12,5 µg/l oktilfenol'ün toksik ve ölümlere neden olduğu rapor edilmiştir. Zebra balığı erkeklerine uygulanan OP'ün fertilizasyon ve testis boyutu üzerine hiçbir etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (Jobling ve ark., 1996).

*Poecilia reticulata* 'ın (Lepistes) eşeyssel karakteristiklerinin gelişimi üzerine östrojenik bileşiklerin etkisinin araştırıldığı çalışmada, haftalık test süresince bireyler 17-β östradiole ve oktilfenole maruz bırakılmışlardır (Toft ve Baatrup, 2003). Yapılan bu çalışmada 17-β östradiolün en düşük konsantrasyonuna maruz bırakılan balıklarda dişi birey sayısında artma ya da sabit kalma gözlenmiştir ama bu miktarda oktilfenole maruz bırakılan balıklarda bir değişim gözlenmemiştir.

Aynı zamanda 0,1-100 ng/l OP arasındaki konsantrasyonlarında erkek bireylerde gonopodium uzunluğu, sperm hücre sayısı ve eşeyssel davranışlarda genel olarak artmaya neden olduğu gözlenmiştir. Dişi bireylerde ise bu konsantrasyonlar, oosit sayısı ve embriyo sayısı üzerinde azalmaya neden olmuştur. Erkek bireyler 100 µg/l OP'e maruz bırakıldığında eşeyssel davranışlar ve sperm sayısında artış belirlenmiştir. Aynı miktarda östradiol'e maruz bırakılan erkek bireylerde ise buna karşılık sperm sayısında azalma gözlenmiştir. Aynı konsantrasyondaki oktilfenolde erkeklerde

gonopodium (Kopüler organ) uzunluğunda artma, dişi bireylerde ise gonad ağırlığında azalma olduğu tespit edilmiştir (Toft ve Baatrup, 2003). Ayrıca bu çalışmada 200 µg/l oktilfenol'ün cinsiyet oranını değiştirmedeği, erkek bireylerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında vücut uzunluklarının etkilendiği belirlenmiştir. Mortaliteye bakıldığında ise kontrol gurubu ile karşılaştırma yapıldığında 200 µg/l OP'ün ölüm oranını % 40 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.

Van den Belt ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada ergin erkek Gökkuşuğu alabalıkları ve Zebra balıklarında 17β-estradiol (5, 10, 25 ng/l) ve oktilfenol (12,5, 25, 50 ve 100 µg/l) etkilerinin karşılaştırmıştır. Bileşiklerin östrojenik etkilerinin olduğunu oktilfenolün özellikle 100 µg/l dozunda vitelogenin seviyesini artırdığını ancak gökkuşuğu alabalığının, zebra balığına göre daha hassas olduğunu bulmuşlardır (Van den Belt, 2003a).

Androjen: östrojen oranı diğer şeylerin yanı sıra aromatazlar belirlenir. Aromatazlar (özellikle *cyp19* enzimi) adrojeni geri dönüşümsüz olarak östrojen biyosenteziyle dönüştürürler (Jones ve ark., 2006; Seralini ve Moslemi, 2001; Simpson ve ark., 2002). OP'nin ovaryum aromataz aktivitesini azalttığı tekir balıklarında (*Mullus barbatus*) tespit edilmiştir (Martin-Skilton ve ark., 2006). NP maruz kalmış zebra balıklarında *cyp19* genini ekspresyonu artmıştır (Kazeto ve ark., 2004). Özet olarak alkilfenollerin aromataz aktivitesinin etkilediği balık, kemirgen ve insanlarda tespit edilmiştir.

Endokrin bozcuların ortaya çıkan birçok aksiyon mekanizması arasında Aryl Hidrokarbon Reseptörleriyle (AhR) olan ilişkileri bulunmaktadır (Safe ve ark., 2002). AhR, poliaromatik hidrokarbonlara karşı gerçekleşen biyolojik reaksiyonlara düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Fujii-Kuriyama ve Mimura 2005; Long ve ark., 2003, 2006). Aynı zaman da *cyp* gen ailesinde ekspresyonunu düzenleyerek ksenobiyotik metabolizmada (Thomae ve ark., 2006), teratojenizde ve immunosupresyonda (Novosad ve ark., 2002) önemli rol oynar. Embriyo ve larvalarda gelişen morfolojik bozukluklardan bu mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülebilir.

### 3.2. 2,4-D ile Yapılan Çalışmalar

Kimyasalın DMA formu sucul ekosistem için daha az zararlı gibi gözükürken, Bütiloksi Etil Ester formu yüksek akut toksisite etkisine sahiptir. Bütiloksi Etil Ester formunun akut LC<sub>50</sub> değerleri *Daphnia magna* için 0,4 mg/l, *Oncorhynchus mykiss* için de 0,3 mg/l olarak verilmektedir. Bu değerlere göre, Bütiloksi Etil Ester formunun yüksek konsantrasyonlarının sucul ekosisteme çok büyük zararlar verebileceği açıktır.

Ancak düşük çözünürlüğü ve süratle hidrolize edilmesi bu riski biraz da olsa azaltmaktadır (WSDE, 2001). 2,4-D'nin asit formunun da sucul canlılara karşı çok zehirli olmayacağı düşünülmektedir. Ancak LC<sub>50</sub> değerleri *Cyclops vernalis*'te 37 mg/l ve hassas bir tür olarak bilinen *Gammarus fasciatus*'da ise 3,2 mg/l olarak saptanmıştır.

DMA formunda kronik toksisite *Daphnia magna* için 27,5 mg/l, *Oncorhynchus mykiss* için de 5,56 mg/l olarak belirlenmiştir (WSDE, 2001). Farklı 2,4-D formlarının çeşitli balık türleri için belirlenen LC<sub>50</sub> değerleri Tablo 3.1'de verilmektedir.

Tablo 3.1. Farklı 2,4-D formlarının çeşitli balıklar üzerindeki akut toksisitesi (WSDE, 2001).

Formül	Tür	Test türü	Yaş	Zaman	LC <sub>50</sub> (mg/l)
2,4-D BEE	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Akışkan	Juvenil	96 sa	2.0
2,4-D BEE	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Statik	Juvenil	96 sa	0,4-1,1 (0,73)
2,4-D DMA Tuz	<i>Pimephales promelas</i>	Statik	Bütün yaşlar	96 sa	266-344 (314)
2,4-D DMA tuz	<i>Lepomis macrochirus</i>	Statik	Erişkin öncesi	96 sa	177
2,4-D Na tuz	<i>Oryzas latipes</i>	Statik	Embriyo	48 sa	>40

Yapılan arazi çalışmalarında 2,4-D'nin Dimetil Asit formunun sucul canlılar üzerindeki etkisinin dolaylı yollarla değişebileceği ortaya konmuştur. Oksijen miktarındaki azalma, mikroorganizmaların popülasyon dinamiklerini değiştirerek oksijensiz solunum yapanlar lehine bir fark oluşturur ve ayrıştırma dengelerinde değişime yol açarak etki derecelenmesini de değiştirir (WSDE, 2001).

2,4-D'nin asit formunun doğadaki miktarı arttığında, fitoplankton popülasyonları azalır ve bu durum bentik organizma biyokütlesini ve balık popülasyonlarını etkiler. Arazi çalışmalarında 2,4-D'nin Bütiloksi Etil Ester formunun, sucul omurgalılarda davranışı etkilemediği, örneğin balığın yuva yapmasına ya da göç yollarında herhangi bir değişmeye neden olmadığı saptanmıştır (WSDE, 2001).

Dünya Sağlık Örgütü balıklarda 2,4-D'nin teratojenik etki dozunun 1 ppm olduğunu bildirmiştir (WHO, 1984). Amerika Birleşik Devletlerinde 2,4-D'nin kullanıldığı alanlara yakın sularda yaşayan balık ve midyelerde 0,01 - 1,00 ppm 2,4-D saptandığı belirtilmiştir (Schultz ve ark., 1974). Diğer bir çalışmada yakın çevrede 2,4-D kullanılmasıyla ilişkili olarak yüzey sularında 2,4-D maddesine rastlandığı rapor edilmiştir (Osman ve ark., 1963).

*Lepomis macrochirus* (Bluegill) ve *Mola mola* (Pervane balığı) ile yapılan çalışmada LD<sub>50</sub> dozu 263 mg/l'dir. Çok ticari bir tür olan gökkuşağı alabalığı ile yapılan

çalışmada ise LD<sub>50</sub> değeri 377 mg/l bulunmuştur. İstiridye ve deniz tarağıyla ilgili yapılan 2 ay boyunca süren gözlemlerde ise 3,8 ppm'lik değer bulundu (Thomas ve ark., 1968). Balıklarda 2,4-D isooktil ester için verilen LD<sub>50</sub> dozu gökkuşağı alabalığı için 62-153 mg/l ve lüfer (*Pomatomus saltatrix*) için 5-68 mg/l'dir (IARC, 1977).

Amerika'da yapılan çalışmada 2,4-D uygulaması yapılan alanlardaki çalışmalarda mantar ve bitkilerde bu herbisit kalıntıları bulunmuştur. Ayrıca sucul herbisitlerin kullanımıyla da, balıklar ve kabukluların 2,4-D'ye maruz kaldıkları gözlemlenmiştir (WHO, 1984). Seçilmiş sekiz pestisit yapılmış bir çalışmada, bu pestisitlerin yılan balığı (*Anguilla anguilla*) üzerindeki karşılaştırmalı akut toksisiteyi incelemiştir (Ferrando ve ark., 1991). Ticari olarak satılan üç herbisit yine ticari değeri olan *Carassius auratus* ve *Oncorhynchus mykiss* balıkları üzerine toksik etkileri incelenmiştir (Anton ve ark., 1994). Bir başka çalışmada radyoaktif işaretli olan 2,4-D ve glyphosate maddelerinin sazan (*Cyprinus carpio*) ve *Tilapia mossambica* balıkları üzerine etkisi tespit edilmiştir.

Balık ve su sümbüllerinde 2,4-D ve glyphosate'ın birikimi ile ilgili bir araştırma yapılmıştır (Wang ve ark., 1994). Nehirlerde ve göllerde çeşitli metal karışımları kimyasalların balıklar üzerine etkileri araştırılmıştır. Elli kimyasal madde içerisinde balık letalitesi bilgisi ve kültüre edilmiş *Leuciscus idus* hücrelerindeki *invitro* sitotoksitesi arasındaki ilişki hakkında bilgi vermişlerdir (Brandao ve ark., 1992).

Böbrekler ile ilgili bir çalışmada 2,4-D maddesinin 96 saat akut dozu temel alınarak *Tinca tinca* bireylerinde oluşturduğu patolojik süreç izlenmiştir. 1, 2, 5, 8 ve 12 günlük zehirlenme dönemlerinden sonra balıklar incelenmiştir. Bulgular böbrek dokusunda küçülme ve bozulmalar, boşaltım sistemini meydana getiren hücrelerde değişimler olduğu gözlenmiştir (Gomez ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda ele alınan zehirlenme süreleri değişmekle birlikte, uzun süreli deneylerde oksijen azalması ve metabolik artıklar önemli problemler teşkil ettiğinden akut deneyler genellikle 96 saat veya daha kısa sürelidir (Anonymous, 1971). PCB ve 2,4-D toksik maddeleriyle yapılan bir testte *Channa punctatus* 'un MN testi değerlerinin yüksek olduğu mikronukleuslarının genotoksik değerlendirmesinde

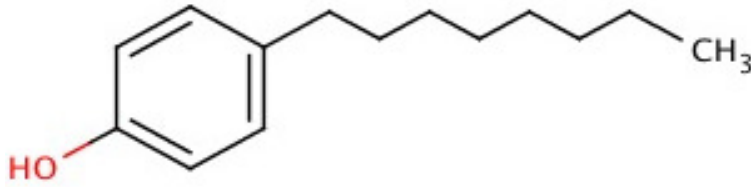
yüksek, düşük ve orta doz ve kontrol gruplarıyla yapılan çalışmada 48, 72 ve 96 saatlik dönemlerde genotoksik oldukları ve 2,4-D'nin hücre morfolojini etkileyerek ekinosit oluşumu gözlemlenmiştir (Farah ve ark., 2003).

## BÖLÜM 4. MATERYAL VE METOT

### 4.1. Materyal

#### 4.1.1.4-tert Oktilfenol

Oktilfenol, (Tablo 4.1) alkilfenol etoksilatlarının biyoparçalanma ürünü olan non-iyonik yüzey aktif maddesidir. Oktilfenol, genel formülü  $C_8H_{17} \cdot C_6H_4(OH)$  olan isomerik bileşikler olarak bilinmektedir (Şekil 4.1). Oktil grubu ( $C_8H_{17}$ ) çeşitli yollarla dallanır ya da kuvvetli bir zincir oluşturabilir (OSPAR, 2003).



Şekil 4.1.4-tert Oktilfenol

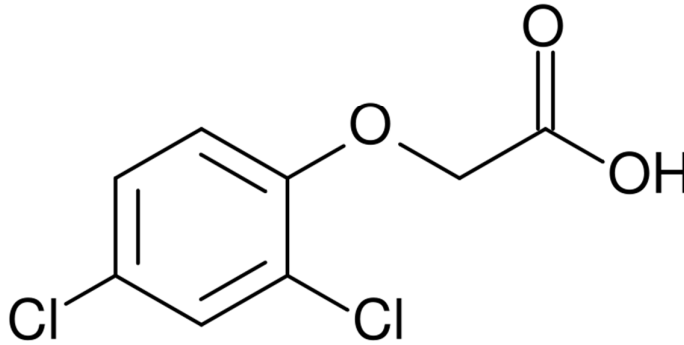
Tablo 4.1.Oktilfenol'ün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	Açıklama
Moleküler formülü	$CH_3(CH_2)_7C_6H_4OH$
CAS numarası	140-66-9
Moleküler ağırlığı	206,36
Fiziksel hali ve rengi	Beyaz kristal veya toz
Erime noktası	79-82 °C
Kaynama noktası	280-283 °C
Yoğunluğu	0,961 g/cm <sup>3</sup>
Buhar basıncı	20 °C'de 0.001 kPA
Suda çözünürlüğü	22 °C'de 19 mg/l

pKa	25 °C'de 10,33
Sinonimleri:	p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenol p-Octylphenol 4-tert-Octylphenol p-tert-Octylphenol Octylphenol pt

#### 4.1.2. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit

2,4-D dimetilamin (DMA) formu bir klorofenoksi asetik asit türevidir. Şekil 4.2'de ve Tablo 4.2'de özellikleri belirtilen klorofenoksi asetik asit de, seçici ve sistematik bir herbisittir. Fenoksi asitler grubuna dahil bu kimyasal maddelerin asıl görevleri bitkinin kontrolsüz ve hızlı büyümesine neden olarak ölmesini sağlamaktır. Yüksek derecede seçici herbisitler sınıfına dahildirler (WSDE, 2001).



Şekil 4.2. 2,4-Dikloro feoksiasetik asit.

Tablo 4.2. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	Açıklama
Moleküler formülü	$C_8H_6O_3Cl_2$
CAS numarası	94-75-7
Moleküler ağırlığı	221,04 g/mol
Fiziksel hali ve rengi	Beyaz yada sarı toz
Erime noktası	138 °C
Kaynama noktası	160 °C



Yoğunluğu	1,24
Buhar basıncı	$1,4 \times 10^{-7}$ mm Hg (25 °C)
Suda çözünürlüğü	900 mg/l
pKa	2,3
Sinonimleri:	2,4-D Hedonal Trinoxol 2',6'-Diethyl-N-butoxymethyl-2-chloroacetanilide

## 4.2. Metot

### 4.2.1. Laboratuvar Ortamı

Zebra balıkları şehirdeki yerel akvaryumculardan temin edilmiştir. Balıklar 24 litrelik akvaryumlarda 1 hafta süre bekletilerek ortama alışmaları sağlanmıştır. Akvaryumlar termostatlı ısıtıcılar 28°C sabitlenmiştir. Akvaryum suyu olarak 48 saat bekletilmiş şehir suyu kullanılmıştır. Ortamın fotoperiyodu 14 saat aydınlık 10 saat karanlık ayarlandı. Işıklandırma süresinin kontrolü için zaman ayarlı elektrik prizleri kullanıldı. Günde 2 defa pul yemle (Tetra Pro) beslendi. Haftada 1-2 kez kankurdu (Tetra Bloodworm Mix) ile beslendi.

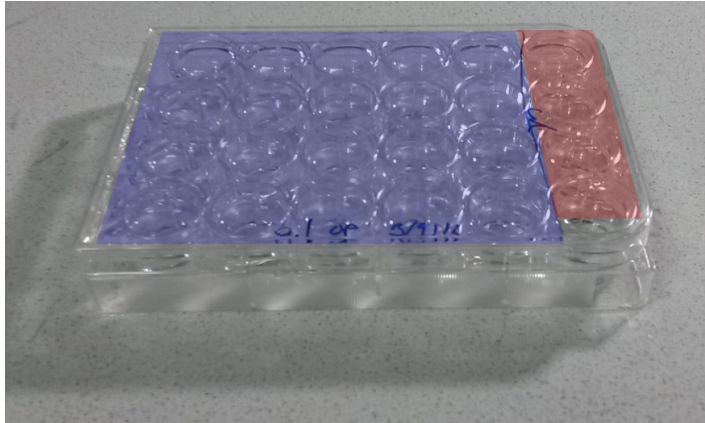
### 4.2.2. Zebra Balığı Yumurtalarının Toplanması

Balıkların alışma sürecinden sonra, yumurta toplanması planlanan tarihten en az 1 hafta önce yumurtlamaya uygun damızlık dişiler ve erkekler ayrıldı. Yumurta toplama tarihinden 1 gün önce damızlık balıklar 8 litrelik çiftleşme akvaryumlarına alındı. 1 dişiye 2 erkek olacak şekilde akvaryumlara 6 şar balık yerleştirildi. Balıkların yumurtalarını yemesini engellemesi için balıklar 26x15x15 cm boyutlarındaki tül yavrukluk içerisine yerleştirildi. Ertesi sabah, aydınlık fotoperiyodun ilk saatinde yumurtalar akvaryumun dibinde gözlemlendi. Önce balıklar çiftleşme akvaryumundan uzaklaştırıldı. Yumurtalar dikkatlice sifonlama yöntemiyle petri kaplarına alındı. Dinlenmiş su ile birkaç kez yıkandı ve içlerinden

döllenmeyen yumurtalar ayıklandı. Daha sonra yumurtalar E3 solüsyonu içinde aktarıldıktan sonra 28°C inkübatör içerisinde beklemeye alındı.

#### 4.2.3. Bileşiklerin Uygulanması

Sucul sistemler için kronik toksisite testleri arasında çok kullanılan testlerden bir FET (Fish Embryo Toxicity Test) testidir. FET testi Zebra balığı embriyo ve/veya larvalarında da yapılan kronik bir toksisite testidir. Test zebra balığı embriyolarının, döllenmeden 2-4 saat sonra incelenecek kimyasal maddeye maruz kalmalarını öngörür. Test polisistren'den yapılmış 24 kuyucuklu mikroplate (24 well plate) içerisinde gerçekleştirilir. 20 kuyucuk test edilecek dozlar için kullanılır (Mavi). Geriye kalan 4 kuyucuk (Kırmızı) ise kontrol grupları için kullanılır.



Şekil 4.3 FET testinin 24 kutucuklu mikroplate üzerine uygulanması

Testin süresi en az 48, en çok 120 saattir. Her kuyucuk içerisinde 2 ml sıvı konması gerekir. Solüsyonların 24 saatte bir değiştirilmesi lazımdır. Bütün embriyolar aynı ortam koşullarında büyütülürler. Test sonucunda Embriyo ve larva mortalitesi, gelişimsel oranı, larvaların yumurtadan çıkabilme başarısı ve morfolojik anormallikler belirlenmektedir. (Lammer, 2009; Embry, 2010)

Deneylerde kullanılan maddelerin suda çözünürlüğü az olduğu için, önce çözücü olarak %1 DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Hallare, 2004) içerisinde çözüldükten sonra

su ile karıştırılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak dinlenmiş çeşme suyu ve çözücü kontrol olarak %1 DMSO çözeltisi kullanılmıştır.

Doz uygulamaları için bütün testler 28°C sıcaklıktaki statik koşullarda ve havalandırması olmayan ortamlarda yapılmıştır. Deneyin yapılacağı plate'lerde her bir kuyucuğun içerisine 2 ml uygulama solüsyonu eklenmiştir. Her 24 saate bir bu uygulama solüsyonu tazelenmiştir. Her bir doz için 60 adet rastgele seçilmiş sağlıklı embriyo kullanılmıştır. Negatif ve çözücü kontrol grupları için 60 adet embriyo kullanılmıştır. Embriyolar Blastula safhasında iken (yaklaşık döllenmeden sonra 2 saat) doz içerisine 1 kuyucuk da 1 embriyo olacak şekilde yerleştirilmiştir. Deney sürecine ilk olarak 8. saatte daha sonra 24 saate bir kontrol edilerek, ölen bireyler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Her doz 3 defa tekrarlanmıştır. Karşılaşılan anormallikler Olympus BX50 görüntüleme sistemiyle kaydedilmiştir.

4-tert-oktilfenol uygulamaları için önce 1 mM stok solüsyonu hazırlanmıştır. 0.1, 0.5, 1, 2, 5 ve 10 µM uygulama solüsyonlarına seyreltilmiştir.

2,4-Diklorofenoksi asetik asit uygulamaları için 5 mM stok solüsyonu hazırlanmıştır. 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 2 mM uygulama solüsyonları hazırlanmıştır.

LC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması için Probit yöntemi kullanılmıştır. LC<sub>50</sub> değerlerinin sonuçları aritmetik ortalama ± standart hata olarak verildi. Dozların birbirleriyle ve kontrol gruplarıyla karşılaştırılması sırasında Dunnett'in t testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda IBM SPSS 20 programıyla kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 düzeyi kabul edilmiştir.

## BÖLÜM 5. BULGULAR

### 5.1. LC<sub>50</sub> Değerlerinin Hesaplanması

OP ve 2,4-D'nin LC<sub>50</sub> değerlerinin tespit edilmesi amacıyla döllenmiş balık yumurtalarının fertilizasyondan itibaren (en geç 4 saat içinde) kimyasallara maruziyeti gerçekleştirilmiş ve 120 saatlik süre sonunda canlı kalan ve ölen embriyolar tespit edilerek Probit analizi ile ortalama değerler %95'lik güven sınırları içinde tespit edilmiştir. Oktilfenol için LC<sub>50</sub> değeri 1,592±0,148 µM, 2,4-Diklorofenoksiasetik asit için 1,185±0,116 mM bulunmuştur. Denemelerdeki değerleri ve %95 güvenlik sınırlarını Tablo 5.1'de bulunmaktadır.

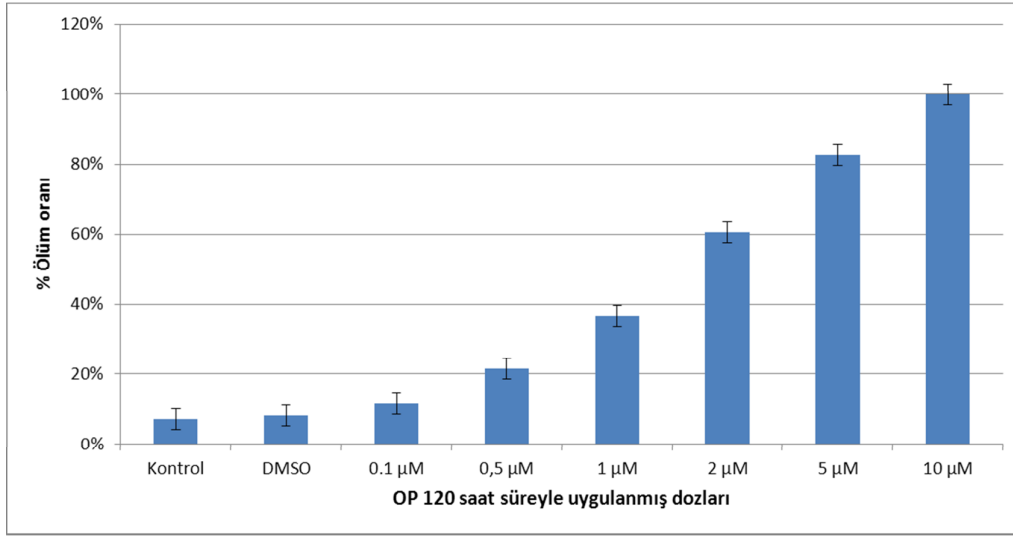
Tablo 5.1. OP ve 2,4-D'nin 120 saatlik LC<sub>50</sub> Değerleri

Test No	LC <sub>50</sub> Değerleri	%95 güvenlik Sınırları
OP		
1	1,532±0,146 µM	1,246 - 1,818
2	1,790±0,160 µM	1,476 - 2,104
3	1,454±0,138 µM	1,183 - 1,724
Ortalama	1,592±0,148 µM	1,301 - 1,882
2,4-D		
1	1,037±0,111 mM	0,820 – 1,254
2	1,107±0,109 mM	0,893 – 1,320
3	1,412±0,129 mM	1,159 – 1,665
Ortalama	1,185±0,116 mM	0,957 – 1,413

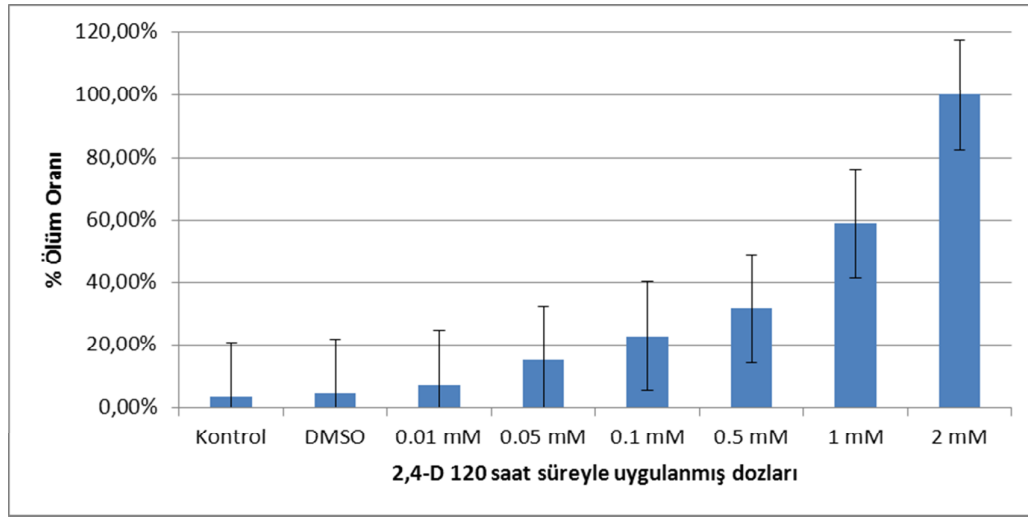
## 5.2. Yumurta ve Embriyo Mortalitesi

OP ve 2,4-D bileşiklerinin embriyo ve larvalarda ölümlere sebep olup olmadığı 2 kez tekrarlanan FET testi sonucu ölüm oranları bulunmuştur. Yüksek dozlarda 120 saat süreyle OP uygulanan embriyo ve larvalarda %100 bulan ölümler gerçekleşmiştir (Şekil 5.1). Bu oranlarla ilgili bilgiler tablo 5.2’de sunulmuştur. OP etkileri, 50 ve 10  $\mu\text{M}$ ’lık dozlarda 5 günün sonunda embriyo ve larvaları tamamı ölürken daha düşük dozlarda bireylerde letal ve subletal malformasyonlar görülmüştür. Kontrol ve çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO’da ise çok az miktarda mortalite gözlenmiştir. 2,4-D’de ise yüksek dozlarda %80 varan ölüm oranı gerçekleşmiştir (Şekil 5.2). Ölüm oranları tablo 5.3’de sunulmaktadır.

Şekil 5.1. OP 120 saat süreyle uygulanmış dozları



Şekil 5.2 2,4-D 120 saat süreyle uygulanmış dozları



Tablo 5.2 120 saatlik OP Uygulamalarında zebra balığı embriyo ve larvaların elde edilen doz-yanıt verileri

Dozlar	Birey Sayısı	120 Saat Sonunda Ölüm %	120 Sonunda Anormali
Kontrol	60	7,22% ± 0,015	0,00% ± 0,000
DMSO	60	8,33% ± 0,010	1,04% ± 0,086
0,1 µM	60	11,67% ± 0,025	23,33% ± 0,188
0,5 µM	60	21,67% ± 0,035	35,00% ± 0,287
1 µM	60	36,67% ± 0,044*	61,67% ± 0,217
2 µM	60	60,56% ± 0,053*	80,00% ± 0,109
5 µM	60	82,78% ± 0,056*	91,67% ± 0,188
10 µM	60	100,00% ± 0,000*	100,00% ± 0,000

\*Kontrol ve çözücü kontrol gruplarından istatistik önem derecesinde farklı (p<0,05)

Tablo 5.3. 120 saatlik 2,4-D Uygulamalarında zebra balığı embriyo ve larvaların elde edilen doz-yanıt verileri

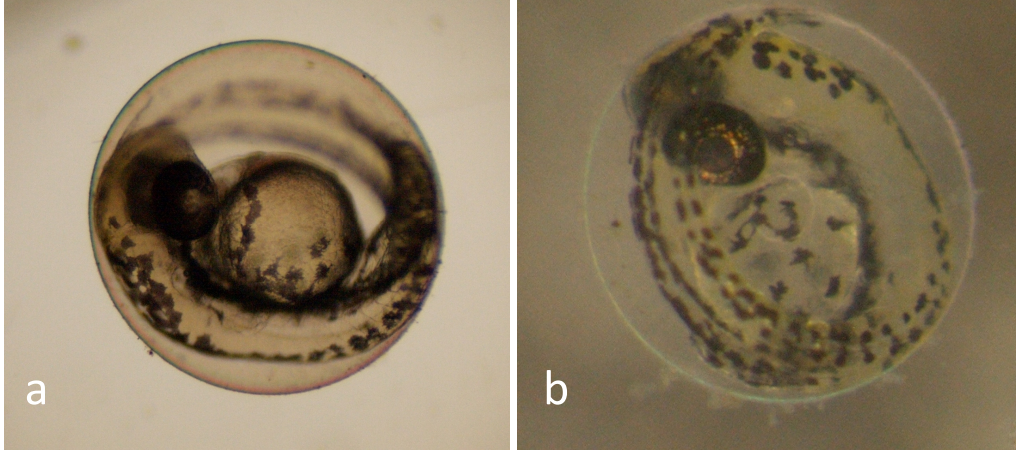
Dozlar	Birey Sayısı	120 Saat Sonunda Ölüm %	120 Sonunda Anormali
Kontrol	60	3,33% ± 0,129	0,00% ± 0,086
DMSO	60	4,44% ± 0,139	1,04% ± 0,086
0,01 mM	60	7,22% ± 0,160	15,00% ± 0,217
0,05 mM	60	15,00% ± 0,210	23,33% ± 0,188
0,1 mM	60	22,78% ± 0,160*	28,33% ± 0,217
0,5 mM	60	31,67% ± 0,183*	31,67% ± 0,266
1 mM	60	58,89% ± 0,409*	36,67% ± 0,217
2 mM	60	100,00% ± 0,000*	43,33% ± 0,109

\*Kontrol ve çözücü kontrol gruplarından istatistik önem derecesinde farklı (p<0,05)

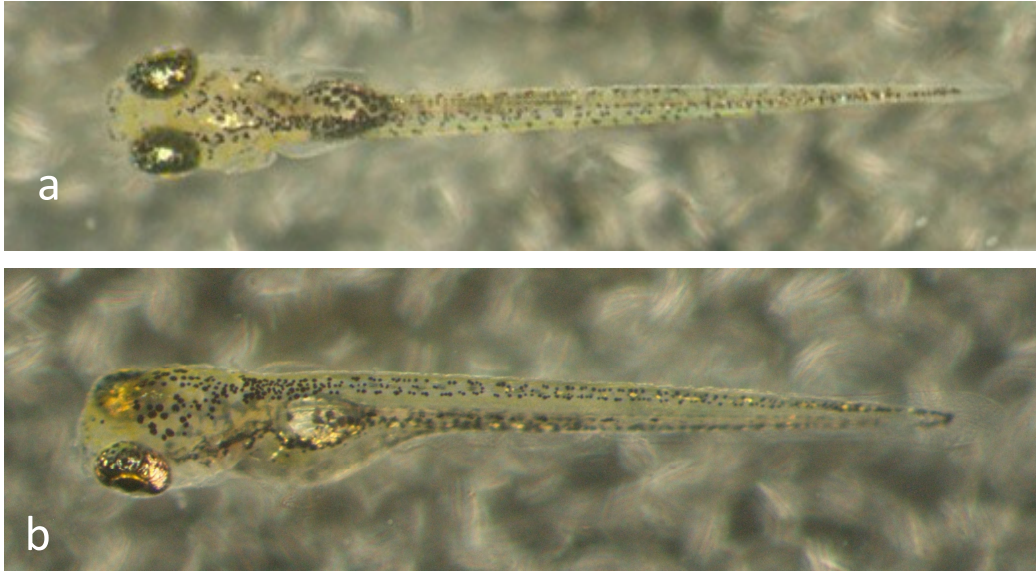
### 5.3. Morfolojik Anormallikler

OP uygulanmış embriyolar 5 günlük süre boyunca gelişimlerinin ilk aşamalarında itibaren ortaya çıkan morfolojik anormallikler takip edilmiş ve Olympus BX-51 marka mikroskopla fotoğrafları çekilmiştir. Buna göre gelişimin erken evrelerinden itibaren embriyo ve larvalarda gözlenen anormallikleri şöyle sıralamak mümkündür. kranofasiyal defekt (Şekil 5.7) vertebra defektleri (Şekil 5.8), vertebra sütün defekti (Omurgada oluşan birden fazla eğrilikler) (Şekil 5.9), lordoz (Omurganın dışa doğru eğilmesi) (Şekil 5.10, 5.28), kifoz (Omurganın içe doğru eğilmesi) (Şekil 5.11, 5.12, 5.14), skolyoz (Omurganın yanlara doğru eğilmesi) (Şekil 5.13, 5.21, 5.22, 5.23, 5.25), perikardial (Şekil 5.8, 5.11, 5.18) ve perivitellin ödemler (Şekil 5.11, 5.12, 5.13, 5.14), kuyruk anomalileri (Şekil 5.29, 5.30, 5.31), hemoralji (Kanama) (Şekil 5.18, 5.19). Ödemler çeşitli şekillerde olup genellikle perikardial ve peritoneal ödem tarzında olduğu bazı durumlar perivitellin alanda gerçekleşmiştir. Doz artışına bağlı olarak anormallik sayısı ve çeşidi artmıştır.

2,4-D uygulamalarında gelişim gerilikleri (Şekil 5.15, 5.16, 5.17, 5.20, 5.26), lordoz (Şekil 5.16, 5.17, 5.20, 5.26, 5.27), kifoz (Şekil 5.24), skolyoz (Şekil 5.21), hava kesesinin aşırı büyümesi (Şekil 5.15, 5.16, 5.17) ve hava kesesinin oluşmaması (Şekil 5.20), perikardial ödemdir (Şekil 5.9). Özellikle vertebra defektleri bulunan ve/veya hava kesesi sorunu olan larvalarda yüzme aktivitelerinde azalma ve ölümler meydana gelmiştir. Negatif kontrol grubunda herhangi bir anormallik gözlemlenmezken DMSO uygulamasında perikardial ödem 1 defa gözlemlenmiştir.

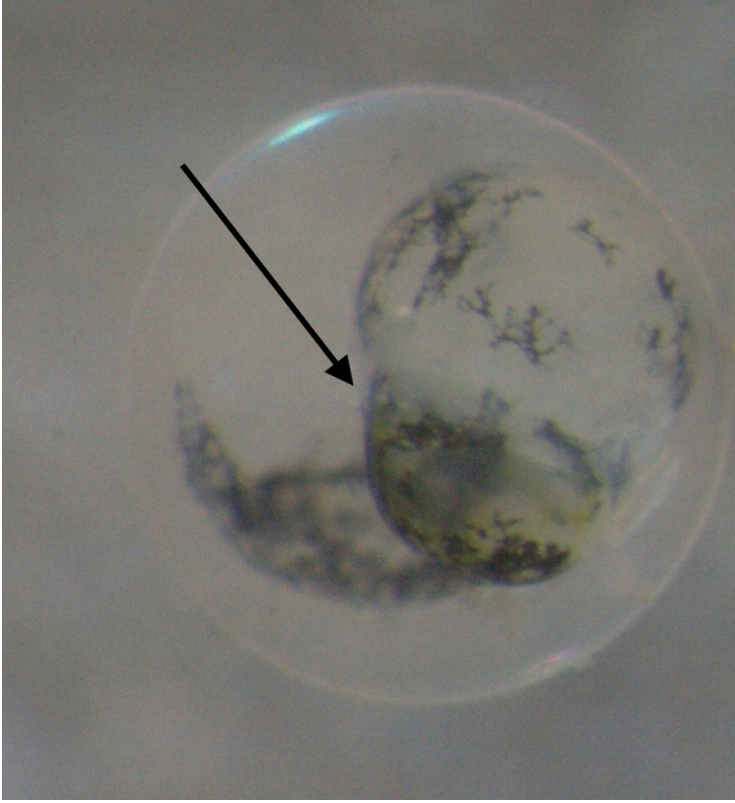


Şekil 5.3. 48 saatlik negatif kontrol ve çözücü kontrol zebra balığı embriyoları



Şekil 5.4.96 saatlik a) negatif kontrol ve b) çözücü kontrol zebra balığı larvaları

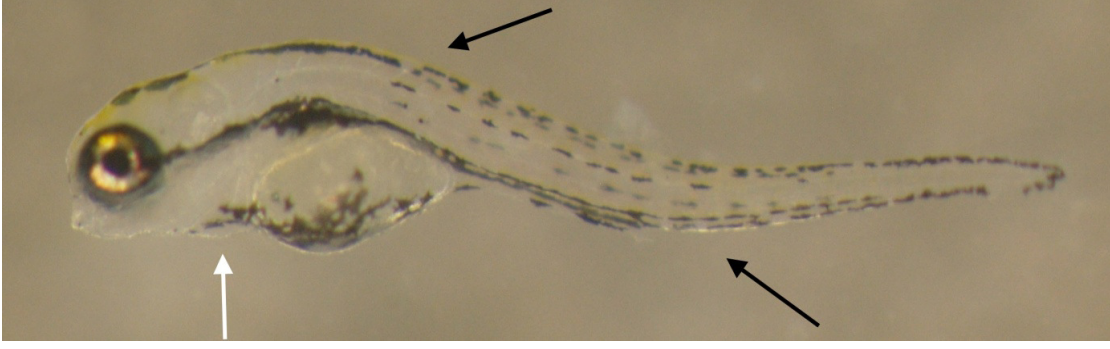




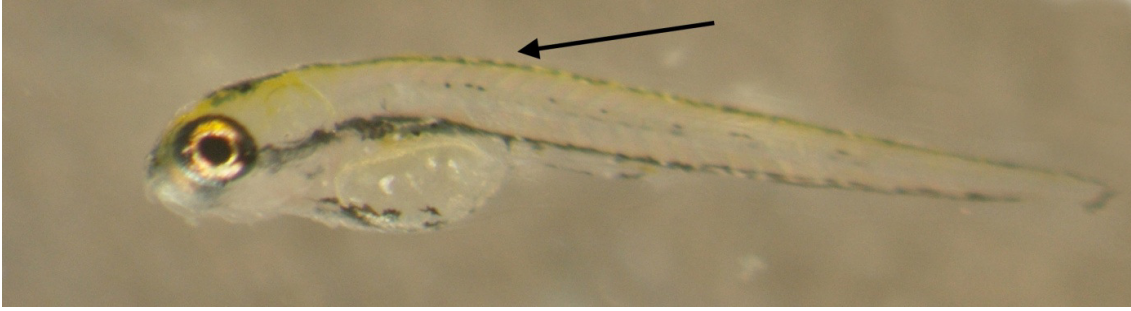
Şekil 5.5. 5  $\mu$ M OP uygulanmış 48 saatlik zebra balığı embriyolarında kraniyofasial defekt



Şekil 5.6. 1  $\mu$ M OP uygulanmış 48 saatlik zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem (Beyaz ok) ve anaksial vücut gelişimi (Siyah ok)



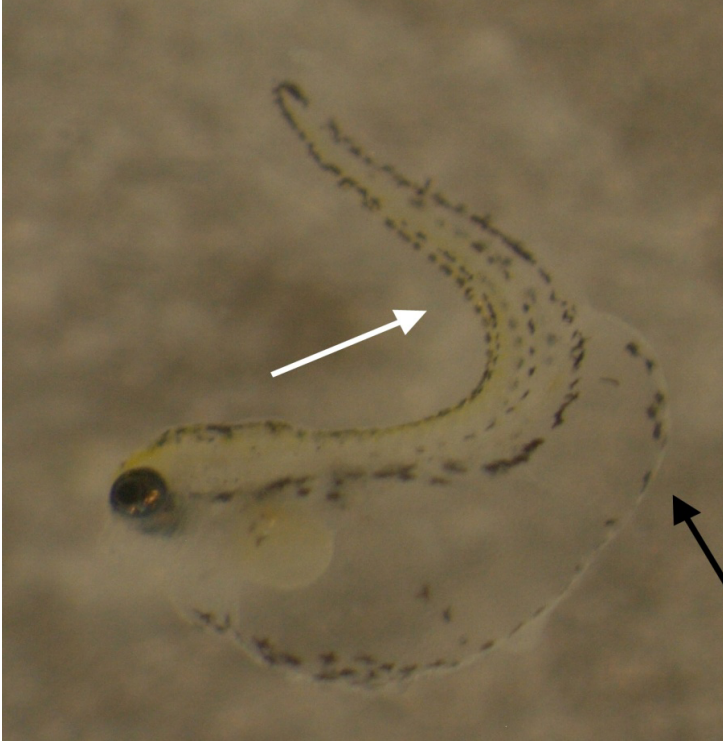
Şekil 5.7. 500  $\mu\text{M}$  2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında vertebra sütün defekleri (Siyah oklar) ve perikardial ödem (Beyaz ok)



Şekil 5.8. 100  $\mu\text{M}$  2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında lordoz



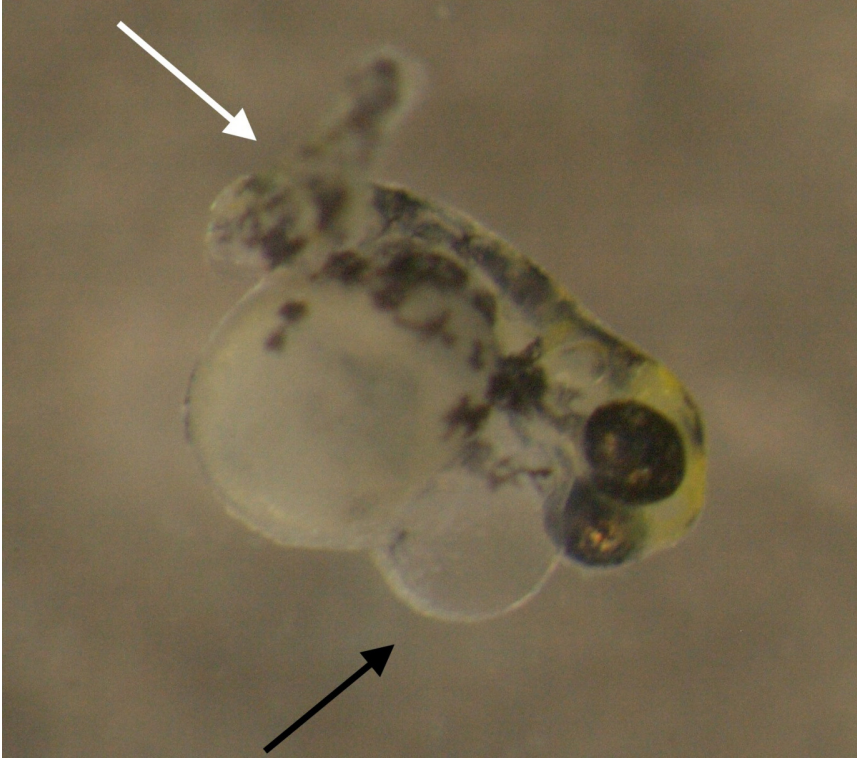
Şekil 5.9. 2  $\mu\text{M}$  OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz (Siyah ok), perikardiyal ve perivertebral ödemler (Beyaz oklar)



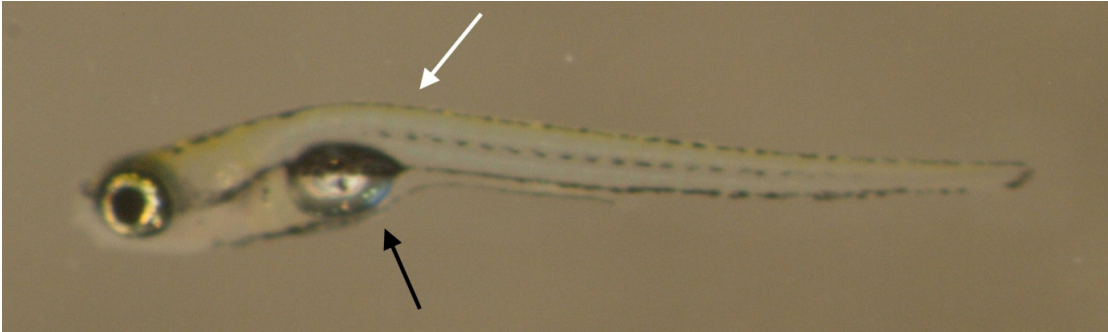
5.10. 1  $\mu$ M OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz (Siyah ok) ve perivitellin ödemler (Beyaz ok)



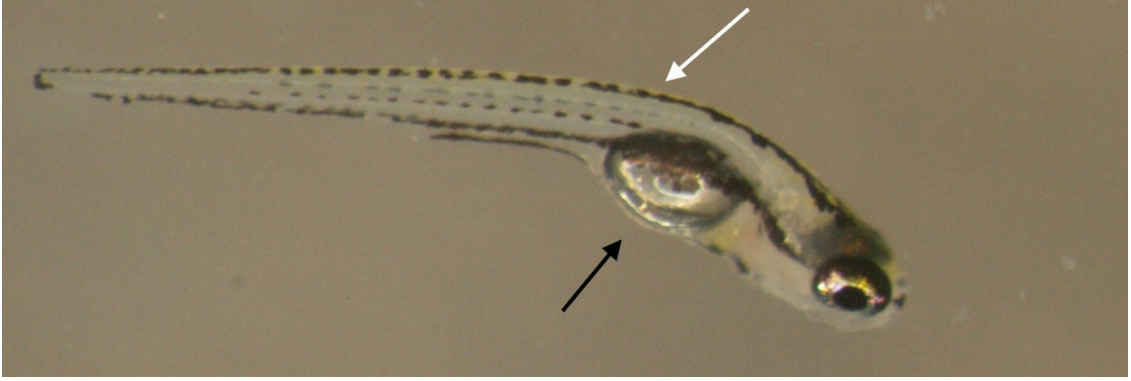
Şekil 5.11. 1  $\mu$ M OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz ve perivitellin ödemler (Siyah ok)



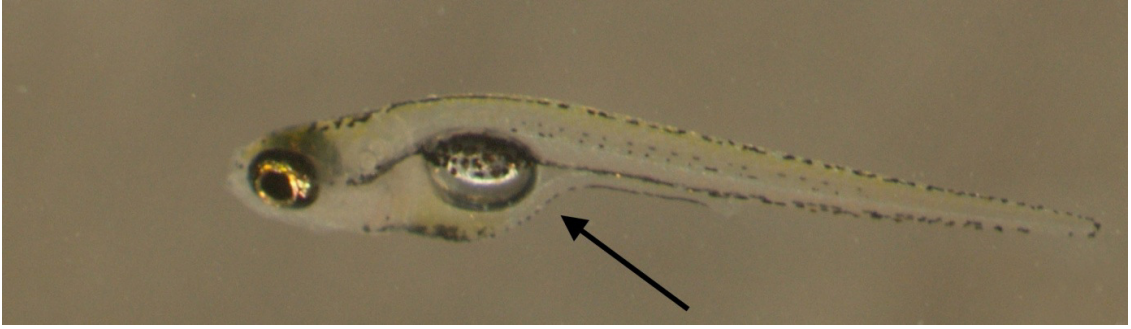
Şekil 5.12. 0,5 $\mu$ M OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoz (Siyah ok), perikardiyal ve perivitellin ödemler (Beyaz oklar)



Şekil 5.13. 200  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz (Beyaz ok) ve aşırı büyümüş hava kesesi (Siyah ok)



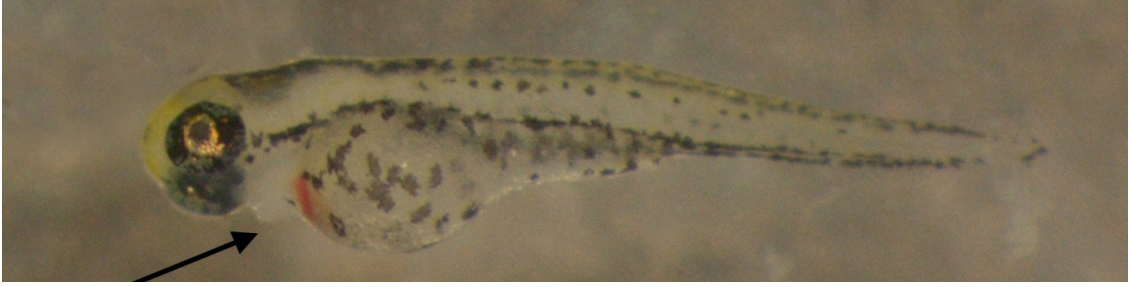
Şekil 5.14. 50  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz (Beyaz ok) ve aşırı büyümüş hava kesesi (Siyah ok)



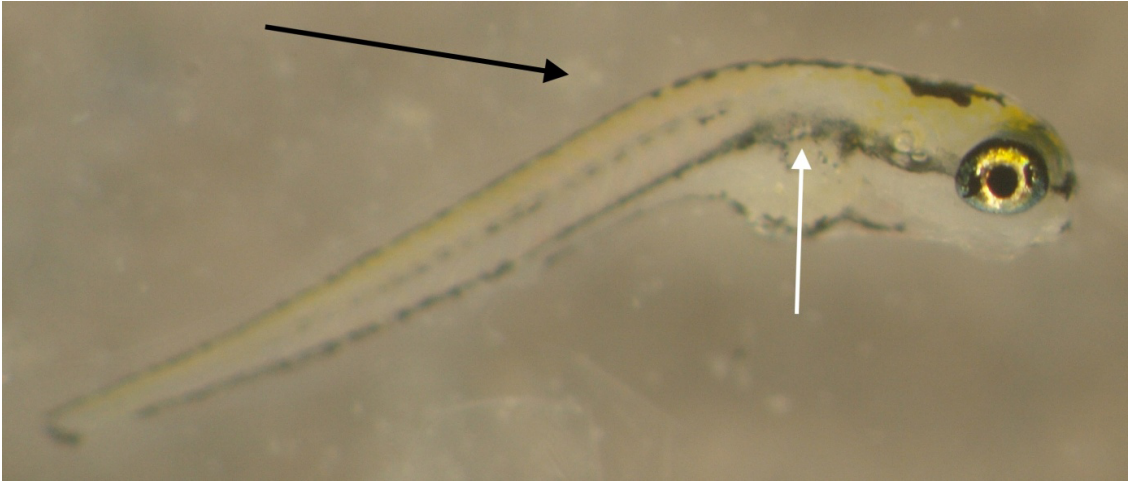
Şekil 5.15. 20  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz ve aşırı büyümüş hava kesesi (Siyah ok)



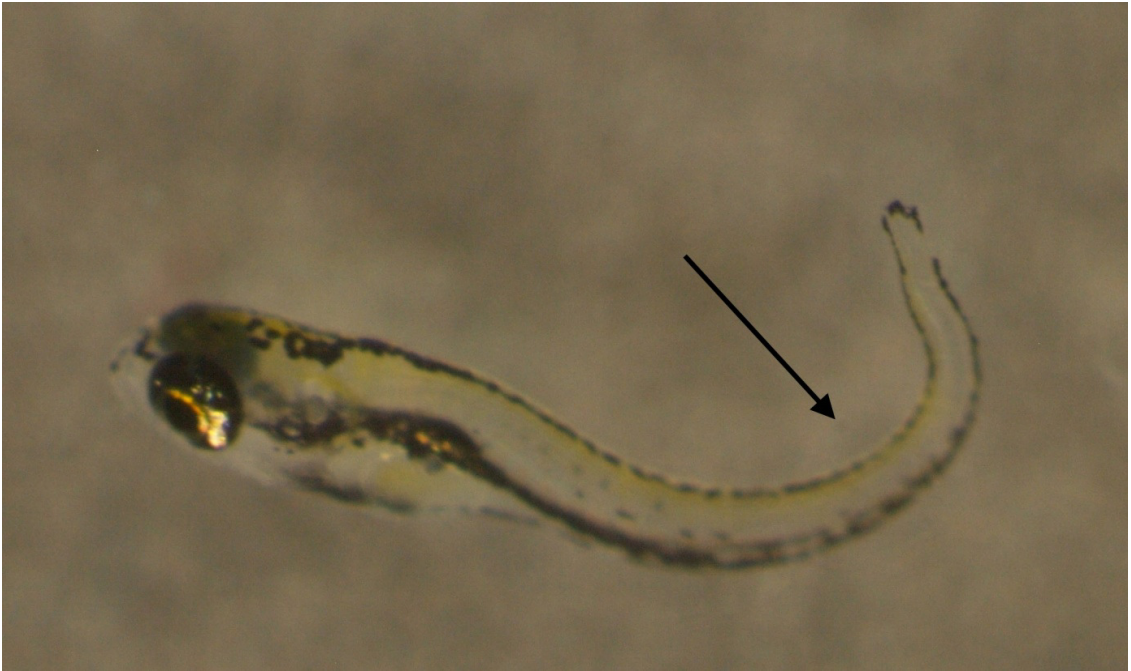
Şekil 5.16. 0,5  $\mu$ M OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında perikardiyal ödem ve hemorajji (Beyaz ok)



Şekil 5.17. 1  $\mu$ M OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında hemoraji (Siyah ok)



Şekil 5.18. 20  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz(Siyah ok) ve hava kesesi oluşmaması (Beyaz ok)



Şekil 5.19. 50  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz (Siyah ok)



Şekil 5.20. 5  $\mu$ M OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz (Siyah ok)



Şekil 5.21. 1  $\mu$ M OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz (Siyah ok)



Şekil 5.22. 50 µM 2,4-D uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kifoza (Siyah ok)

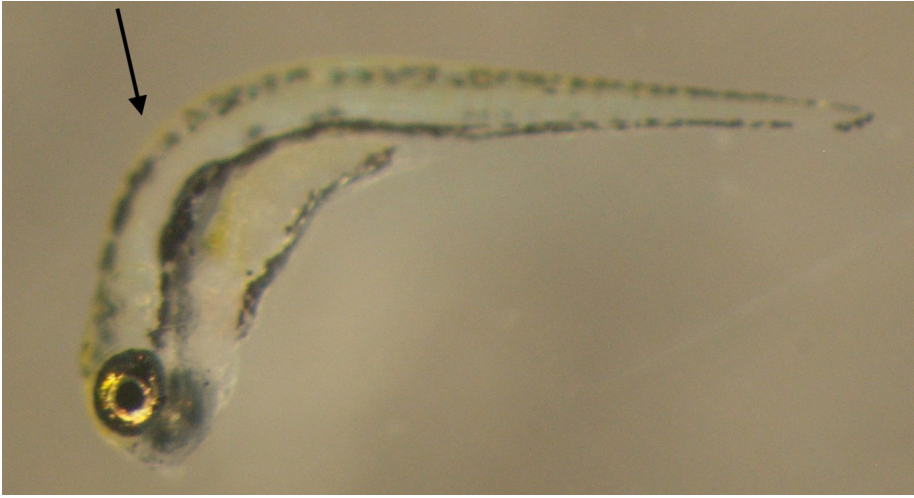


Şekil 5.23. 0,5 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında skolyoz (Siyah ok)





Şekil 5.24. 50  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz (Siyah ok)



Şekil 5.25. 100  $\mu$ M 2,4-D uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında gelişim geriliği, lordoz (Siyah ok)



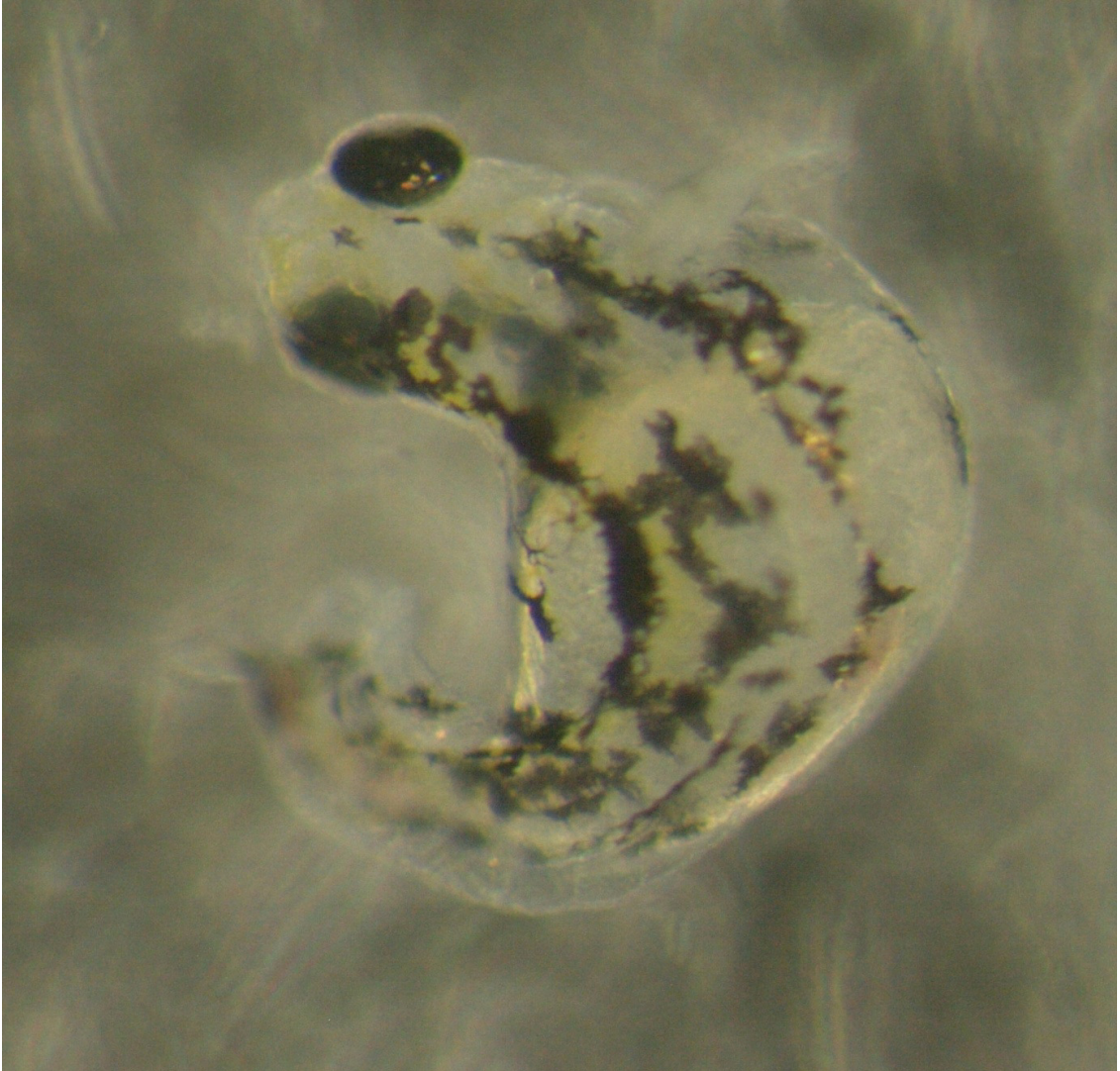
Şekil 5.26. 1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında lordoz (Siyah ok)



Şekil 5.27. 1 µM OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anormalisi



Şekil 5.28. 0,5  $\mu$ M OP uygulanmış 120 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anormalisi



Şekil 5.29. 2  $\mu$ M OP uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarında kuyruk anormalisi

## BÖLÜM 6. TARTIŞMA

Bu çalışmada amaçlanan ana hedef endokrin bozucu maddeler olarak kabul edilen Oktilfenol ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asidin LC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi ve Zebra balığının embriyo ve larval dönem gelişimi üzerine oluşturduğu teratolojik hasarların belirlenmesidir. Bu hasarların belirlenmesinde Balık Ekotoksisite Testi kullanılmıştır (FET, Fish Ecotoxicity Test). FET testinin kronik uygulamaları azami 5 gün (120 saat) olması gereklidir (Embry, 2010). 5 günden fazla yapılan çalışmalarda özellikle Oktilfenol çalışmalarında yumurta ve embriyoların ödem ve vertebra defektlerine bağlı olarak öldüğü ve sağlıklı veriler alınmadığı tespit edilmiştir. Embriyolara ilk 4 saat içerisinde Oktilfenol ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asit uygulaması yapılmış, ölüm oranları ve morfolojilerindeki değişiklikler not alınmıştır.

Endokrin bozucular arasında önemli bir yeri olan ksenoöstrojenler ya da çevresel östrojenler, doğal östrojeni taklit etmekte ve bu sebeple daha fazla araştırılmaktadır. (WHO/IPCS, 2002; Goksøyr ve ark., 2003). Bu kimyasallar arasında alkil fenoller, dioksinler, fungusitler, organoklorin pestisitleri, poliklorinli bifeniller ve fitalatlar yer almaktadır.

Alkilfenoller arasında Oktilfenol ve Nonilfenol en çok dikkat çeken kimyasallardır. Nonilfenol ve Oktilfenol etoksilat, Alkilfenol etoksilatların degradasyonu sonucunda oluşan non-iyonik surfaktan ürünlerdir ve pestisitlerde, spermisitlerde, boyalarda, ıslatma ajanlarında, tekstillerde, plastik ve kâğıt ürünlerinde kullanılmaktadır. (Soto ve ark., 1991). OP ve NP ana bileşiklerine (etoksilatlarına) göre daha dayanıklı ve toksiktir. (Naylor ve ark., 1992). Bu bileşikler östrojen reseptörünün doğal ligantı olan estradiole nazaran daha zayıf olsalar da, neredeyse bütün ortamda var olmaları ve canlılarda birikim yapmaları nedeniyle (Ying ve ark., 2002) estradiol (E<sub>2</sub>) ile benzer etkiler oluşturabilirler. Örnek olarak OP estradiole göre  $3.7 \times 10^{-5}$  kat daha az

afinitesi vardır. NP'ün afinitesi ise % 25 daha azdır (Servos, 1999). Sucul canlılar üzerinde yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışma da ki OP doğal östrojeni taklit ederek östrojenik etkileri gösterilmiştir (Jobling ve Sumpter, 1993, Gray and Metcalfe, 1999b; Knörr ve Braunbeck, 2002).

Oktilfenolün sucul canlılar üzerinde diğer bir etkisi erkek bireylerde normalde bulunmayan vitellogenin (VTG) düzeyini arttırmasıdır. VTG vitellüs prekürsör proteindir. Sadece yumurta üretmeye hazırlanan dişi bireylerde bulunur. Van den Belt ve arkadaşlarının (2003b) çalışmada OP'nin zebra balığı embriyoları üzerine östrojenik etkilerini VTG düzeylerini arttırarak göstermiştir (Van den Belt ve ark., 2003b).

Bütün bu sebeplerden Avrupa komisyonu bu kimyasalları su politikaları alanında öncelikli maddeler listesinde, öncelikli zararlı kimyasallar sınıfına sokmuş ve kullanımlarının 2003 yılından beri kısıtlamıştır (EPC, 2003).

Cruz-Li'nin 2004 yılında doktora tezinde yaptığı çalışmada zebra balıkları embriyolarında uygulanan OP için 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerini 2,8 µM bulmuştur. Ancak testlerinde OP dozunu döllenmeden 12 saat sonra verdiği için LC<sub>50</sub> değerlerinin daha düşük bulması beklenen bir durumdur. Cruz-Li ayrıca çalışmalısında OP'ün Zebra balığı larvalarının davranışlarının incelemiş, OP'nin larvaların hareketlerinde, avcudan kaçınma davranışlarında azalma tespit etmiştir. Aynı durum yaptığımız çalışmada da gözlemlenmiştir. 180 günlük bireylerde üreme performansını ölçmüş, döllenme oranında ve toplam yumurta üretiminde azalma bulmuştur.

Dumitrescu ve arkadaşlarının (2009) OP ile yaptığı çalışmada 1,5 ve 60 µg/l dozlara maruz bırakılan embriyolarda gelişimde gerilik ve yüksek dozda ölüm oranında artış görülmüştür. 77 saatlik deneyin sonunda düşük dozda embriyoların % 90 koryondan çıkmış ve % 10 ölmüş, yüksek dozda ise ölüm oranı % 60 çıkmıştır.

Bizim çalışmamızda kullandığımız en düşük OP dozu yaklaşık 100 µg/l civarında olmaktadır. 120 saatlik deney süresi içinde çalışmamızda yaklaşık % 40 civarındadır.

Aradaki farkın değerlendirilmesinde Dumitrescu ve arkadaşlarının yaptığı bazı bilinmeyen noktalar olması zorluk çıkarmaktadır. Çözücü bir kimyasalın kullanıp kullanılmadığı, doz uygulamasının döllenmeden sonra kaç saat içinde yapıldığı gibi şartların bilinmemesi gibi durumlar deney düzenini etkileyerek ölüm oranında önemli değişikliklere neden olabilirler.

2010 yılında yaptıkları histolojik çalışmalarda 21-115 günlük zebra balıklarına 60 ve 100 µg/l dozlarda OP uygulanmış ve feminizasyon, gonadlarda oogenez oluşumunda yavaşlama, karaciğer dokularında hepatositlerde hipertrofi ve kapiler ektazi ve böbreklerde nefronların epitel dokularında bozulma lökosit infiltrasyonu bulunmuştur.

Segner ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı çalışmada zebra balıklarına 1.2, 3.7, 11.9 ve 38 µg/l dozlarında OP uygulanmıştır. Zebra balığının tüm yaşam döngüsü incelenmiş ve üreme başarısının düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmada rekombinant maya assay'i kullanılarak OP için EC<sub>50</sub> (Efektif konsantrasyon) 1,6 ± 0,59 µM bulunmuştur. Bu değer bizim çalışmamızda OP konsantrasyonlarının belirlenmesi için bir çıkış noktası olmuştur. Çalışmada ayrıca etinilöstradiol ve BPA kullanılmıştır. Segner'in yaptığı çalışmada, maya assayinde OP'nin BPA'dan 6 kat güçlü olduğu, yaşam döngüsü testinde 45 kat güçlü olduğu belirtilmiştir.

Gray ve arkadaşlarının 1999 yılında medaka balıkları (*Oryzias latipes*) üzerinde yapmış olduğu çalışmada OP'ye 0, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/l dozlarında maruz bırakılmıştır. Embriyolar döllenmeden 2-3 saat sonra doza konmuştur. 17 günlük LC<sub>50</sub> değerlerini sırayla 450, 830 ve 940 µg/l bulmuşlardır. Balık embriyo ve larvalarında gelişim bozukları, dolaşım problemleri, yüzme kesesi bozuklukları bulunmuştur. Ancak koryonda çıkma başarısını azaltırken, çıkma süresini etkilememiştir. Bizim çalışmamızda çözücü olarak aseton yerine daha az zararlı olarak bilinen DMSO kullanılmıştır. LC<sub>50</sub> değeri olarak 17 günlük bir test söz konusu olduğu için OP LC<sub>50</sub> değerleri çok yüksek ve düzensiz çıkmıştır. Bizim çalışmamızda 5 günlük LC<sub>50</sub> değeri yaklaşık 328 µg/l'dır. Medaka balıklarında OP etkisiyle rastlanılan bütün gelişim bozuklarına zebra balıklarında da rastlanılmıştır.

Ayrıca zebra balıklarında kuyruk ve baş bölgesinde gelişim bozuklukları, kanama ve hareketlerde azalma gibi diğer etkiler de mevcuttur (Gray, 1999a).

Koryondan çıkmayı sağlayan enzimlerin faaliyetleri kontaminatlar tarafından etkilenerek erken koryondan çıkmayı ya da geciktirebilir (Von Westernhagen, 1988). Zebra balıkların kimyasal toksisitenin koryondan çıkışı geciktirebileceği konusunda yapılmış çok sayıda çalışma vardır (Dave ve ark., 1987; Oliveira ve ark., 2009). Ayrıca Gray ve Metcalfe (1999a) yapmış olduğu bir çalışmada OP'nin medaka balıklarında koryondan çıkış başarısında negatif korelasyon olduğu ve yüksek konsantrasyondaki OP'nin embriyoların çıkışını büyük oranda düşürdüğünü göstermiştir. Bizim çalışmamızda gözlenen zebra balığı embriyolarının koryondan çıkma başarısının düşmesi ve çıkışlarının gecikmesi bu bağlamda açıklanabilir.

Puy-Azurmendi ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada alkifenollerin ve OP'nin diğer isomerlerinin de östrojenik olduğunu koryondan çıkış süresinde gecikme, *vtg* ve *cyp19* genlerinin ekspresyonunda artış olduğunu rekombinant maya assay'i ile göstermiştir.

Çakal ve arkadaşlarının 2007 yılında denizkestaneleri (*Arbacia lixula*) üzerinde yapmış oldukları embriyo toksisite çalışmasında, 5-160 µg/l arasında dozlarda döllenmeden 10 dakika sonra OP uygulanmıştır. Denizkestanelerinde düşük dozlarda gelişim gerilikleri, iskelet bozuklukları, yüksek dozlarda ise gelişim blastula/gastrula safhasında tamamen durması, gelişim bozuklukları ve ölüm oranının yükselmesi gözlenmiştir. *Arbacia lixula* türü için OP ölümcül dozu 40 µg/l olarak tespit edilmiştir.

Sıklıkla kullanılan bir hebisit olan 2,4-D ilk olarak 1941 yılında sentezlenmiş ve 1944 yılından itibaren ticari olarak kullanılmıştır. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda 2,4-D'nin, genel olarak düşük akut toksisite etkilerine sahip olduğu, yüksek dozlarda 2,4-D maruziyeti ratlarda ve tavşanlarda böbreklere anyon taşıma kapasitesine zarar vermektedir. Oluşan diğer etkiler arasında göz irritanı olmasıdır (Kirsch, 1983). Subkronik ve kronik etkileri arasında gözler tiroit, böbrekler, adrenal

bezler ve gonadlar bulunmaktadır (EPA, 2005). Ayrıca maternal toksisite konusunda yapılan çalışmalarda, rat fetal vücut ağırlığının azaldığı ama tavşanlarda etkilerinin çok az olduğu görülmüştür.

Gelişim toksisitesi konusunda yapılan çalışmalar Ton ve arkadaşları (2006) 6 saatlik zebra balığı embriyolarına verilen 2,4-D'nin 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerlerini 132 µM bulmuşlardır. FET testi ile yapılan 4 saatlik embriyolara verilen 120 saatlik FET test bulduğumuz (1,185 mM) uyumlu değerlere sahip değildir. Ton, çalışmasında 48 saatlik ve 96 saatlik maruziyetlerde Zebra balığı embriyolarında yavaşlamış kalp atışı, hareketlilikte azalma, kanama ve perikardial ödem, gelişim geriliği tespit etmiştir. Nörotoksik etkileri bulunduğu özellikle beyin bölgesinde yüksek hücre ölümlerinin bulunduğunu ve motor nöronlar aksonların büyümesinin bozulduğunu bulmuşlardır. Arada oluşan farkın, embriyoların 2,4-D'ye daha erken maruz kalması ve deney süresinin 120 saatlik olmasıyla açıklanabilir.

Holcombe ve arkadaşlarının 2003 yılından 2,4-D ve Medaka balıklarında (*Oryzias latipes*) yaptığı çalışmada, balık embryo ve larvalarına 96 saatlik kronik toksisite testi ve 28 günlük kronik teste maruz bırakılmışlardır. 96 saatlik akut testte balık embriyolarına, 567, 1100, 2250, 4560 ve 8970 mg/l 2,4-D verilmiş ve LC<sub>50</sub> 2780 mg/l olarak bulunmuştur. Deney sırasında 4650 ve 8970 mg/l dozlardaki embriyoların hepsi ölmüştür. 28 günlük kronik teste 1. Tekrarda 27.2, 56.5, 113, 221 ve 425 mg/l düzeyinde 2,4-D'ye maruz bırakılmış, 221 ve 425 mg/l konsantrasyonlarındaki balıkların hepsi öldüğü için deney 2. kez tekrarlanmıştır. 2. Tekrarda, 2.37, 5.73, 13.5, 30 ve 60 mg/l dozları kullanılmıştır. Elde edilen LC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 39,2 ve 42,5 mg/l'dir. Ölçülen LC<sub>50</sub> değerleri Ton ve arkadaşlarının 2006 yılında çalışma ile bizim çalışmamızdaki değerlere (262 mg/l) yakın değildir.

Alexander ve arkadaşlarının 1985 yılında farklı 3 tür balıkla yaptığı 96 saatlik 2,4-D ile LC<sub>50</sub> testinde koca golyan balığı (Fathead minnow, *Pimephales promelas*), *Lepomis macrochirus* (Bluegill) ve gökkuşacağı alabağı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanmıştır. Ölçülen değerler sırasıyla, 320, 263 ve 358 mg/l'dir. Bizim çalışmamızla kıyaslandığında, 120 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri göz önüne alındığında, Alexander ve arkadaşları ölçülen değerlerinden çok farklı olmadığı görülecektir.



Koç ve Akbulut (2012) yaptığı Zebra balığı embriyoların ovaryumları üzerine yaptıkları çalışmada 0,1, 0,5 ve 1 ppm 2,4-D maruziyetine bırakılan embriyolarda, oogeneizde yavaşlama, atretik foliküllerin sayısında ve bağ doku miktarında artış tespit edilmiştir.

Günümüzde OP sınırlamalarına rağmen kullanımının sürekli artışı ve sucul ortamda çok az miktarda bile bile bulunmasının yaratabileceği tehlikeler ortadadır. Model organizma olarak seçilen zebra balığının ksenobiyotik metabolizmasının, insanla çok büyük benzerlikler bulunması ve literatür çalışmalarının da destekleyeceği gibi yaratacağı tehlikenin boyutlarına dikkat çekmelidir. Bu yüzden özellik arıtma tesislerinin biyolojik arıtma sistemlerini APE gibi ksenoöstrojenik kimyasallar için düzenlenmeli ve bu gibi kimyasalların kullanımına daha fazla sınırlama getirerek kullanımı mümkün olduğunca azaltılmalıdır.

2,4-Diklorofenoksiasetik asidin herbisit olarak kullanımı çok yüksek olması ve direk ya da indirek yollarla yeraltı suyu ve/veya sucul ekosistemde dağılması nedeniyle ekosistemde oluşacak hasarlar yüzünden kullanımına sınırlandırma getirilmesi, ekosisteme daha az zarar veren farklı herbisit alternatifleri kullanılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

ADACHI, T., YASUDA, K., MORI, C., YOSHINAGA, M., AOKI, N., TSUJIMOTO, G., TSUDA, K., Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol via intracellular estrogen receptors, *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43:713 – 719.

ADEMOLLO, N., FERRARA, F., DELISE, M., FABIETTI, F., FUNARI, E., Nonylphenol and octylphenol in human breastmilk. *Environ. Int.* 2008. 34:984–987.

AHEL, M., GIGER, W., KOCH, M., Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. *Water Res.*, (1994) 28:1131-1142.

AL-ARABI, S. A. M., ADOLFSSON-ERICI, M., et al. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged fish exposed to effluents from anthropogenic sources in the Kamaphuly River, Bangladesh, *Environ. Toxicol. Chem.*, (2005). 24, 1968-1978.

ALEXANDER, H.C., GERSICH, F.M., MAYES, M.A., Acute Toxicity of Four Phenoxy Herbicides to Aquatic Organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* (1985) 35:314-321

ALLSOPP, M., SANTILLO, D., JOHNSTON, P., Impacts of Endocrine- Disrupting Chemicals on Wildlife and Human Health. 1997. <http://www.greenpeace.nl/Global/nederland/report/2007/6/poisoning-the-future.pdf>  
Erişim tarihi:02/11/2013

ANONYMOUS, “Standart methods for the examination of water and wastewater” APHA, AWWA, WPCF, Washington, (1971).

ANTÓN, F.A., LABORDA, E., ARIZ, M., Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. *Chemosphere* 1994, 28(4):745–753

ATANASSOVA, N., MCKINNELL, C., TURNER, K.J., WALKER, M., FISHER, J.S., MORLEY, M., et al. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*. 2000. 141(10):3898–3907.

BAFU, Annex 1.8: Octylphenol, nonylphenol and their ethoxylates, Ordinance on the Reduction of Risks relating to the Use of Certain Particularly Dangerous Substances, Preparations and Articles. 2007, The Swiss Federal Council, Switzerland. [http://www.admin.ch/ch/e/rs/814\\_81/app9.html](http://www.admin.ch/ch/e/rs/814_81/app9.html) Erişim tarihi:01/07/2013

BALIN, I.T., FERENCZY, J., KATAI, F., KISS, I., KRACZER, L., KUFCSAK, O., LANG, G., POLYHOS, C., SZABO, L. SZEGLETES, T., NEMCSOK, J., Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in lake Balaton in 1991 and 1995, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, (1997). 37.(1):17-23

BARTMAN, K.T., STOLPEN A., PRETORIOUSE, S., MALAMUD, D., "Distribution of a spermicide containing Nonoxynol-9 in the vaginal canal and the upper female reproductive tract". *Human Reproduction* 2001, 16 (6): 1151–1154.

BECHMANN, R.K., Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *Sci. Total Environ.* 1999, 233:33 – 46.

BENNIE, D.T., SULLIVAN, C.A., LEE, H.B., PEART, T.E., MAGUIRE, R.J., Occurance of Alkylphenols and Alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of Laurentian Great Lakes basin and the upper St Lawrence River. *Science Total Environment.* 1997. 193:263-275.

BLACKBUM, M.A., WALDOCK, M.J., Concentrations of Alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research.* 1995. 29:1623-1629.

BLAKE, C.A., ASHIRU, O.A., Disruption of rat estrous cyclicity by the environmental estrogen 4-tert-octylphenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997, 216:446-451.

BOGH, I.B., CHRISTENSEN, P., DANTZER, V., GROOT, M., THOFNER, I.C., RASMUSSEN, R.K., et al. Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations. *Theriogenology* 55(1):131–150.

BRANDÃO, J.C., BOHETS, H.H.L., VAN DE VYVER, I.E., DIERICKX, P.J., Correlation between the in vitro cytotoxicity to cultured fathead minnow fish cells and fish lethality data for 50 chemicals. *Chemosphere*, 1992, 25(4):553–562

BRIGGS, J. P., The zebrafish: a new model organism for integrative physiology, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2002. Vol. 282 No. R3-R9

BUSCH, W., DUIS, K., et al. The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany *Rep Toxicol*, 31 (2011), pp. 585–588

CALAFAT, A.M., YE, X., WONG, L.-Y., REIDY, J.A., NEEDHAM, L.L., Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116:39–44.

CERTA, H., FEDTKE, N., WIEGAND, H.J., MUÈLLER, A.M.F., BOLT, H.M. Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, (1996) 71:112-122

CES, Uses, Fate and Entry to the Environment of Nonylphenol Ethoxylates. 1993. Consultants in Environmental Sciences Ltd (for the Department of the

Environment), Beckenham, Kent, UK

COLBORN, T., DAVIDSON, A., GREEN, S.N., HODGE, R.A., JACKSON, C.I., LIROFF, R.A., "Great Lakes Great legacy?" 1990, The Conservation Foundation, Washington, D.C. U.S.A.

COLBORN, T., SAAL, F.S., SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, (1993). 101(5), 378-384.

COOK J.C., KAPLAN, A.M., DAVIS, L.G., OCONNOR, J.C., Development of a Tier 1 Screening Battery for Detecting Endocrine Active Compounds (EACs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997. 26:60-68.

CRUMP, D., LEAN, D., TRUDEAU, V.L., Octylphenol and UV-B radiation alter larval development and hypothalamic gene expression in the leopard frog (*Rana pipiens*). *Environ Health Perspect.* 2002; 110(3): 277-284.

CRUZ-LI E.I., Effects of Ammonium Perchlorate, 4(tert/-octyl) Phenol, and Their Mixture on Zebrafish (*Danio rerio*) Zebrafish. 2004, 1(3): 313-317.

ÇAKAL A.O., PARLAK, H., Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*, *Ecotoxicology*, 2007, 16(6):439 – 444.

DANZO, B.J., Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environmental Health Perspective*, 1997, 105(3):294-301

WINGSPREAD, Statement from the work session on chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. Wingspread Conference Center, Racine, Wisconsin, July 1991.

DARMANI, H., AL-HIYASAT, A.S., Reproductive toxic effect of bisphenol A dimethacrylate in mice. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004. 69(4):637-643

DAVE, G., DAMGAARD, B., GRANDE, M., MARTELIN, J.E., ROSANDER, B., VIKTOR, T., Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 1987; 6:61-71

DoE, First report of the technical committee on detergents and the environment. 1992. U.S. Department of the Environment.

DUMITRESCU, G., et al. Evaluation of octylphenol effect on embryo development in zebra fish (*Danio rerio*) and common carp (*Cyprinus carpio*) *Archiva Zootechnica*. 2009, 12:4, 76-84,

DUMITRESCU, G., et. al./ Evaluation of Octylphenol Effect on Development and Survival on Zebra Fish (*Danio Rerio*) During Different Ontogenic Period *Animal Science and Biotechnologies*, 2010, 43 (1)

EMBRY, M.R., BELANGER, S.E., BRAUNBECK T.A., The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk. Assessment and scientific research Aquatic Toxicology (2010) 97:79–87.

EMBRY, M.R., BELANGER, S.E., BRAUNBECK T.A., The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk. Assessment and scientific research Aquatic Toxicology (2010) 97:79–87.

EPA, Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report. (1998). U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm> Erişim tarihi:01/07/2013

EPA, Health Effects Div. Hemicals Meeting the Criteria For Listing Via the Authoritative Bodies Mechanism: (2,4-D). 2005. [http://www.oehha.org/prop65/CRNR\\_notices/admin\\_listing/intent\\_to\\_list/pdf\\_zip/24DN OILjust.pdf](http://www.oehha.org/prop65/CRNR_notices/admin_listing/intent_to_list/pdf_zip/24DN OILjust.pdf) Erişim tarihi: 11/09/2014

EPA, Special Report on Endocrine Disruption, Fact Sheet, 1997. U.S. EPA, Washington, D. C.

EPA, U. S. Environmental Protection Agency, Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D Prevention, Pesticides and Toxic Substances EPA 738-R-05-002List A Case 0073 June 2005 [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/24d\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/24d_red.pdf) Erişim tarihi: 11/09/2014

EPC, European Parliament Council, Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Vol. Directive 2003/53/EC Off J Eur Union (2003) [L178/124-L178/127]

FARAH, M.A., ATEEQ, B., ALI, M.N, AHMAD, W., Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 2003. 54(1):25–29

FDA, Food and Drug Administration, "Status of Certain Additional Over-the-Counter Drug Category II and III Active Ingredients". Federal Register. Food and Drug Administration. May 9, 2002.

FERRANDO, M.D., SANCHO, E., ANDREU-MOLINER, E., Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla Anguilla*. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 1991 (5-6):491-498

FINKELSTEIN, J.S., MCCULLY, W.F., MACLAUGHLIN, D.T., GODINE, J.E., CROWLEY, W.F., The mortician's mystery. Gynecomastia and reversible hypogonadotropic hypogonadism in an embalmer. N. Eng. J. Med. (1988). 318:961-965

FRY, D.M., Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals.

Environmental Health Perspectives, (1995). 103(7), 165-171

FUJII-KURIYAMA, Y., MIMURA, J., Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 338(1):311–317

GIGER, W., BRUNNER, P.H., SCHAFFNER, C., SCHNEIDER, J., Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, Science, 1984, 225:623-625

GOKSØYR, A., ARUKWE, A., LARSSON, J., CAJARAVILLE, M.P., HAUSSER, L., NILSEN, B.M., et al. Molecular/cellular processes and the impact on reproduction. Effects of Pollution on Fish. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd; 2003. p. 179

GOMEZ, L., SOLER, S., MARTINEZ, A., GAZQUEZ, E., DURAN, V., “2,4-D Treatment in tench (*Tinca tinca* L.): pathological processes on the excretory kidney”, Bull Environ. Contam. Toxicol. (1999). 62: 600–607.

GRAY, M.A., METCALFE, C.D., Toxicity of 4-tert-octylphenol to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol. 1999a;46:149–54

GRAY, M.A., TEATHER, K.L., METCALFE, C.D. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999b. 18:2587-2594.

GRISOLIA, C.K., BILICH, M.R., FORMIGLI, L.M., A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate, Ecotoxicol. Environ. Saf., 2004, 59:123–126.

GRONEN, S., DENSLOW, N., MANNING, S., BARNES, S., BARNES, D., BROUWER, M., Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. Environ. Health Perspect. 1999, 107 (5):385-390

GRUNWALD, D.J., EISEN, J.S., Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. Nature Reviews Genetics (2002). 3, 717–724.

HARRIS, C.A., EDUARDO, M., JONBAKHSH, S.A., POTTINGER, T.G., TYLER, C.R., SUMPTER, J.P., Nonylphenol affects Gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. Environmental Science and Technology, 2001. 35:2909-2916.

HESS, F.D., Herbicide Effects on Plant Structure, Physiology and Biochemistry, In: Pesticide Interactions in Crop Production: Beneficial and Deleterious Effects, Boca Raton: CRC Press, Florida, 1993, 75:198–207.

HILL AJ, TERAOKA H, HEIDEMAN W, PETERSON RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci. 2005. 86:6–19.

HIRANO, M., ISHIBASHI, H., et al., Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters, *J. Health Sci.*, (2004). 50(1):97-100.

HOFFMAN, D.J., RATTNER, B.A., BURTON, G.A., CAIRNS J, 2003. *Handbook of Ecotoxicology*. Second Edition.

HOLCOMBE, G.W., et al., Acute and Long-Term Effects of Nine Chemicals on the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* (1995)28, 287-297

HUTCHINSON, T.H., PICKFORD, D.B., Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment, *Toxicology*, (2002). 181-182. 383-387,

IARC, "Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic risk of chemical to man", International Agency for Research on Cancer, (1977). 41, Lyon.

IEDA, T., HORII, Y., PETRICK, G., YAMASHITA, N., OCHIAI, N., KANNAN, K., Analysis of nonylphenol isomers in a technical mixture and in water by comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry *Environ Sci Technol*, (2005), 39:7202–7207

İŞCAN, M., TOGAN, İ., TABAK, İ., UĞUZ, C., ERGÜVEN, A., EROĞLU, Y., ZENGİN, M., AKTAŞ, M., ZENGİN, B., Deniz ve akarsulardaki kirliliğin Karadeniz'deki ekonomik değeri yüksek balıkların stok ve üremesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi. 2001, Proje sonuç raporu, Tagem/Haysüd 98/12/02/00.

ISOBE, T., NISHIYAMA, H., NAKASHIMA, A., TAKADA, H., Distribution and behaviour of Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol monoethoxilate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environmental Science and Technology*. 2001. 35:1041-1049.

JIN Y., CHEN R., SUN L., QIAN H., LIU W., FU Z., Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals *Comp Biochem Physiol C*, (2009), 150:414–420

JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C.R., BRIGHTY, G., SUMPTER, J.P., Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Tchnology*, 1998, 32:2498-2506.

JOBLING, S., REYNOLDS, T., WHITE, R., PARKER, M.G., SUMPTER, J.P., A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly oestrogenic. *Environmental Health Perspectives*, 1995. 103 (6): 582-587.

JOBLING, S., SHEAHAN, D., OSBOME, J. A., MATTHIESSEN, P. AND SUMPTER, J.P., Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic Alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. (1996), 15:194-202.

- JOBLING, S., SUMPTER, J.P., Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study, using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 1993;27:361–372
- JONES, M.E., CHINBOON, W., PROIETTO, J., SIMPSON, E.R., of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006. 17(2):55–64.
- KAZETO, Y., PLACE, A.R., TRANT, J.M., Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat. Toxicol.* 2004. 69(1):25–34.
- KELCE, W.R., STONE, C.R., LAWS, S.C., GRAY, L.E., KEMPPAINEN, J.A., WILSON, E., Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 1995, 375:581-585.
- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R.; ULLMAN, B., SCHILLING, T.F., "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish", *Dev. Dyn.*, 203 (1995) 253-310.
- KIRSCH, P. Report on the Study of the Irritation to the Eye of the White Rabbit Based on Draize of 2,4-D: Doc. No. BASF: 83/ 0192. Unpublished study Prepared by BASF Aktiengesellschaft. (1983) 10 p.
- KLOAS, W., LUTZ, I., EINSPANIER, R., Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* (1999), 225:59-68
- KNÖRR, S, BRAUNBECK, T., Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Eco. Toxicol. Environ. Saf.* 2002; 51:187–196.
- KOC, N.D., AKBULUT, C., Histological analysis of acute toxicity of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in ovary of zebrafish. *Animal Cells and Systems.* 2012 (16)5:400-407
- KONANTZ, M., BALCI, T.B., HARTWIG, U.F., DELLAIRE, G., ANDRE, M.C., BERMAN, J.N., LENGGERKE, C. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Ann NY Acad. Sci.* 2012. 1266:124–137.
- KULA, K., SLOWIKOWSKA-HILCZER, J., ROMER, T.E., METERA, M., JANKOWSKA, J., [Precocious maturation of the testis associated with excessive secretion of estradiol and testosterone by Leydig cells] [in Polish]. *Pediatr. Pol.* 1996. 71(3):269–273
- KWACK, S.J., KWON, O., KIM, H.S., KIM, S.S., KIM, S.H., SHON, K.H., LEE, R.D., PARK, C.H., Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2002, 65(Part A):419-431.
- KWAN, C.Y., CHU, W., A study of the reaction mechanisms of the degradation of 2,4-



dichlorophenoxyacetic acid by oxalate-mediated photooxidation, *Water Research*, 2004, 38:4213-4221.

LANGHEINRICH U., Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 2003. 25:904-912.

LATORRE, A., LACORTE, S., BARCELLO, D., MONTURY, M., Determination of nonylphenol and octylphenol in paper by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2005,1065:251 – 256.

LEE, H.J., CHATTOPADHYAY, S., GONG, E.Y., AHN, R.S., LEE, K., Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol. Sci.* 2003.75(1):40-46.

LELE, Z., KRONE, P.H., “The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research” *Biotechnology Advances*, (1996) 14(1):57-72.

LEUNG, H. W., BALLANTYNE, B., Developmental toxicity evaluation of rats dosed orally or cutaneously with Octoxynol-9, *J. Appl. Toxicol.*, 1999, 19:267-273

LINTELMANN, J., KATAYAMA, A., KURIHARA, N., SHORE, L., WENZEL, A., Endocrine disrupters in the environment, *Pure Appl Chem.* 2003, 75: 631-681.

LONG, M., ANDERSEN, B.S., LINDH, C.H., HAGMAR, L., GIWERCMAN, A., MANICARDI, G.C., et al. Dioxin-like activities in serum across European and Inuit populations. *Environ. Health.* 2006. 5:14.

LONG, M., LAIER, P., VINGGAARD, A.M., ANDERSEN, H.R., LYNGGAARD, J., BONEFELD-JORGENSEN, E.C., Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cellline. *Toxicology*, 2003. 194(1-2):77-93

MAFFINI, M.V., RUBIN, B.S., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A.M. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A, *Molecular and Cellular Endocrinology*, (2006), 254-255, 179-186.

MAJDIC, G., SHARPE, R.M., SAUNDERS, P.T.K., Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in fetal rat testis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997, 127:91-98.

MARKEY, C.M., MICHAELSON, C.L., SONNENSCHNEIN, C. AND SOTO, A. M., Alkylphenols and Bisphenol A as environmental estrogens. In: Metzler, M. (Ed.), *Endocrine Disruptors Part I*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001. pp. 127-153.

MARKEY, C.M., RUBIN, B.S., SOTO, A.M., SONNENSCHNEIN, C., Endocrine disruptors from Wingspread to environmental developmental biology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (2003). 83:244-253.

- MARTIN-SKILTON, R., LAVADO, R., THIBAUT, R., MINIER, C., PORTE, C., Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 2006; 141(1):60–68
- MCKIM, J.M., Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity *J. Fish Res. Board Can.*, (1977), 34 pp. 1148–1154
- MILLER, K.A., ADDISON, R. F., BANDIERA, S. M., Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour. *Mar. Environ. Res.* 2003; 57:37-54.
- MONCAUT, N., NOSTRO, F.L., MAGGESE. M.C., Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17p. *Effectson liverand gonads, Agual. Toxicol*, (2003). 63(2):127-137,
- MONTIEL-MARRON, E., ORDAZ-RUIZ, N., RUBIO-GRANADOS, C., JUAREZ-RAMIREZ, C., GALINDEZ-MAYER, C.I., 2,4-D-degrading bacterial consortium isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community, *Process Chemistry*, 2006; 41: 1522-1528.
- NAGEL R., DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. 2002. *ALTEX* 19 (Suppl 1):38–48.
- NAGEL, S.C., VOMSAAL, F.S., WELSHONS, W.V., Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by anin vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999. 69(1-6):343–357
- NAYLOR C.G., MIEURE J.P., ADAMS, W.J., WEEKS, J.A., CASTALDI, F.J., OGLE, L.G., ROMANO, R.R. Alkylphenol ethoxylates in the environment *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1992), 69:695-703
- NAYLOR, C.G., Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Text. Chem. Color.* 1995, 27:29-33
- NORTON, W., BALLY-CUIF, L., Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci* 2010. 11:90.
- NOVOSAD, J., FIALA, Z., BORSKA, L., KREJSEK, J., Immunosuppressive effect of polycyclic aromatic hydrocarbons by induction of apoptosis of pre-B lymphocytes of bone marrow. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2002. 45(4):123–128.
- OECD, SIDS, Phenol, 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)- Initial Assessment Report for SIAM 3 13 – 16 February 1995. Williamsburg, Virginia, USA
- OLIVEIRA, R., DOMINGUES, I., GRISOLIA, C.K., SOARES A.M., Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2009; 16:679–88
- OSMAN, M.A. AND FAUST, S.D., Determination of 2,4-D in surface waters, *Jour*

AWWA, 1963. 639-646

OSPAR (2003) Hazardous substance series Number 273, Background document on octylphenol. OSPAR Commission (Protection for the Marine Environment of the North-east Atlantic).

[http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00173\\_octylphenol.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00173_octylphenol.pdf)

OWENS, W., KOETER, H.B., The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ. Health Perspect.* 2003. 111:1527–1529

PAGE L.M., Zebrafish as developmental models. *Science*, 1990, 250:1320.

PARIS, F., BALAGUER, P., TEROUANNE, B., SERVANT, N., LACOSTE, C., CRAVEDI, J.P., et al. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cellines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002. 193(1-2):43–49

PURDOM, C.E., HARDIMAN, P.A., BYE, V.J., ENO, N.C., TYLER, C.R., SUMPTER, J.P., Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 1994, 8: 275-85.

PUY-AZURMENDI, E., et al Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers in vitro by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. *Science of the Total Environment* (2014) 466–467 1–10

REIM, G., The role of pou2/spiel-ohne-grenzen (spg) in brain and endoderm development of the zebrafish, *Danio rerio*, Thesis (PhD), 2003, der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, Germany

RENNER, R., European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environ. Sci. Tech.* (1997) 31:316-320.

ROUSH, W., Zebrafish embryology builds better model vertebrate. *Science* 1996. 272:1103.

ROY, P., SALMINEN, H., KOSKIMIES, P., SIMOLA, J., SMEDS, A., SAUKKO, P., et al. Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004. 88(2):157–166.

SAFE, S.H., PALLARONI, L., YOON, K., GAIDO, K., ROSS, S., MCDONNELL, D., Problems for risk assessment of endocrine-active estrogenic compounds. *Environ. Health. Perspect.* 2002.110(suppl 6):925–929

SCHULTZ, D.P. HARMAN, P.D. Residue of 2,4-D in pond waters, mudand fish. *Restic Monit. J.* 1974, 8(3):173-179

SCHWAIGER, J., SPIESCR, O.H., BAUER, C., FCRLING, H., MALIOW, U. Chronic toxicity of Nonylphenol and ethinylestradiol: haematologic and histopatologic effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology.* 2000. 51, 69-78

SEGNER, H. et al. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2003) 54:315–322.

SERALINI, G., MOSLEMI, S., Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001. 178(1-2):117–131

SERVOS, M.R., Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenolpolyethoxylates. *Water Quality Res. J. Canada.* 1999. 34(1):123-177.

SHANKAR, M.V., ANANDAN, S., VENKATACHALAM, N., ARAINDOO, B., MURUGESAN, V., Fine route for an efficient removal of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by zeolite-supported TiO<sub>2</sub>, *Chemosphere*, 2006, 63:1014-1021.

SHARPE, R.M., FISHER, J.S., MILLAR, M.M., JOBLING, S., SUMPTER, J.P., Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Persp.* 1995, 103(12):1136-1143.

SIMPSON, E.R., CLYNE, C., RUBIN, G., BOON, W.C., ROBERTSON, K., BRITT, K., et al. Aromatase—a brief overview. *Annu. Rev. Physiol.* 2002. 64:93–127

SIPES, N.S., PADILLA, S., KNUDSEN, T.B., Zebrafish as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2011. 93:256–267.

SONNENSCHNEIN, C., SOTO A.M., An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (1998). 65(6), 143-150.

SOTA-GRABINSKA, E., WISNIOWSKA, E., KALKA, J., Toxicity of selected synthetic auxines—2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants, *Crop Protection*, 2003, 22: 355-360.

SOTO, A.M., JUSTICIA, H., WRAY, J.W., SONNENSCHNEIN, C., P-Nonylphenol, an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene, *Environ. Health Perspect.* 1991, 92, 167-173.

SOTO, A.M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K.L., FERNANDEZ, M.F., OLEA, N., OLEA-SERRANO, M. F., The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspective*, 1995. 103: 113-122.

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE C., SMITH C., The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio Biol. Rev.* (2008), 83, pp. 13–34.

STAPLES, C.A., WILLIAMS, J.B., BLESSING, R.L., VARINEAYU, P.T., Measuring

the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates and nonylphenol. *Chemosphere*, 1999, 38:2029-2039

STRÄHLE, U., SCHOLZ, S., GEISLER, R., GREINER, P., HOLLERT, H., RASTEGAR, S., et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments — a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Rep Toxicol*, (2012)33, pp. 128–132

SUEN J.L., HUNG C.H., YU H.S., HUANG S.K., Alkylphenols—potential modulators of the allergic response. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2012; 28:S43–S48.

SULLIVAN, F.M., BARLOW, S.M., Congenital malformations and other reproductive hazards from environmental chemicals. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1979). 205:91-110

SULTAN, C., BALAGUER, P., TEROUANNE, B., GEORGET, V., PARIS, F., JEANDEL, C., et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001. 178(1-2):99–105

SUMPTER, J.P., JOBLING, S., Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment, - *Environ. Health Perspect.* (1995). 103 (Suppl 7):173-178

TALMAGE, S.S., Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. The Soap and Detergent Association. (1994) Lewis Publishers Boca Raton Ann Arbor London, Tokyo.

TALWAR, P.K. JHINGRAN, A.G. Inland fishes of India and adjacent countries. Oxford & I. B. H. Publishing, Calcutta. (1991).

TAN, B.L.L., MOHD, M.A., Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cordblood by gaschromatograph–mass spectrometer. *Talanta* 2003. 61:385–391.

THOMAE, T.L., STEVENS, E.A., LISS, A.L., DRINKWATER, N.R., BRADFIELD, C.A., Theteratogenic sensitivity to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is modified by a locus on mouse chromosome 3. *Mol. Pharmacol.* 2006. 69(3):770–775.

THOMAS, M.L.H., DUFFY J.R., “Butoxyethanol ester of 2,4-D in the control of eel grass (*Zostera marina* L.) and its effects on oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) and other benthos” *Proc. Northeast. Weed Control*, (1968).22: 186,

TOFT, G., BAATRUP, E., Altered sexual characteristics in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol during sexual development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, 56:228-237

TON, C., Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Testing Birth Defects Research (Part A) 2006. 76:553–567

TSUDA, T., TAKINO, A., MURAKI, K., HARADA, H., KOJIMA, M., Evaluation of 4-

nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments, *Wat. Res.* 2001, 35(7):1786–1792,

UPMEIER A., DEGEN, G.H., SCHUHMACHER, U.S., HERMANN, H.C., BOLT, M., Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application, *Arch Toxicol* (1999) 73: 217-222.

USEPA, U.S. Environmental Protection Agency: Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report, 1998. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H., Comparison of Vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following Exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003b. 56:271-281.

VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H., Effects of 17[alpha]-ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*):effects on growth, gonads and female reproductive success. *Sci. Total Environ.* 2003a.309:127 – 137

VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H., Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*).*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2001.41:458 – 467

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.F., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* 2003. 13(3):57-149.

VASCOTTO, S.G., BECKHAM, Y. & KELLY, G.M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and Cell Biology* (1997). 75, 479–485.

VONWESTERNHAGEN, H., Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. *Fishphysiol.* 1988; 11:253–346.

WANG, Y.S., JAW C.G., CHEN. Y.L., “Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth”, *Water air soil pollut*, (1994), 74:397- 403,

WARHURST A. M. An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols, 1995. Friends of the Earth, London, UK [http://www.foe.co.uk/sites/default/files/downloads/ethoxylates\\_alkylphenols.pdf](http://www.foe.co.uk/sites/default/files/downloads/ethoxylates_alkylphenols.pdf) Erişim tarihi: 11/09/2014

WSDE, WASHINGTON STATE DEPARTMENT OF ECOLOGY, Herbicide Risk Assessment for the Aquatic Plant Management Final Supplemental Environmental Impact Statement, 2001, Appendix C, 3: Publication number: 00-10-043.

WHITE, R., JOBLING, S., HOARE, S., SUMPTER, J., PARKER, M., Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology*, 1994, 135:178-182.

WHO, Environmental Health Criteria 29: 2,4- Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D), Geneva, World Health Organization, 151.1984,

WILLIAMS, K., MCKINNELL, C., SAUNDERS, P.T., WALKER, M., FISHER, J.S., TURNER, K.J., et al. Neonatal exposure to potent and environmental estrogens and abnormalities of the male reproductive system in threat: evidence for importance of the androgen-estrogen balance and assessment of the relevance to man. Hum. Reprod. Update. 2001. 7(3):236–247

WORLD HEALTH ORGANIZATION. IPCS Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van der Kraak G. (eds.), 2002. WHO/PCS/EDC/02.2, pp. 35-50.

WWC (World Water Council). Water Crisis, 2006. <http://www.worldwatercouncil.org/index.php?id=25&L=0%2F> Erişim tarihi: 11/09/2014

XU, L.C., SUN, H., CHEN, J.F., BIAN, Q., QIAN, J., SONG, L., et al. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol invitro. Toxicology, 2005. 216(2-3):197–203

YANG, L., HO, N.Y., ALSHUT, R., LEGRADI, J., WEISS, C., REISCHL, M., MIKUT, R., LIEBEL, U., MULLER, F., STRAHLE, U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. Reprod. Toxicol. 2009. 28:245–253.

YING, G. G., WILLIAMS, B., KOKANA, R., Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review, Environment International, 2002, 28, 215 – 226.

Zebra Fish, [http://www.sphere.be/media/1691/download/Zebra%20fish%20Dries\\_edited-1.jpg](http://www.sphere.be/media/1691/download/Zebra%20fish%20Dries_edited-1.jpg) Erişim tarihi: 11/06/2014

## ÖZGEÇMİŞ

Tarık Dinç 02.10.1980 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da, lise eğitimini İzmir'de tamamladı. 1999 yılında başladığı Fatih Üniversitesi Biyoloji bölümünü 2004 yılında bitirdi. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Biyoloji bölümünde başladığı lisansüstü eğitimine devam etmektedir. Halen aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve 2 erkek çocuk babasıdır.