

Fungisit tebukonazolün tatlı su midyelerine (*Unio mancus*) toksik etkilerinin çoklu biyobelirteçlerle incelenmesi

Investigation of toxic effects of fungicide tebuconazole on freshwater mussels (*Unio mancus*) with multiple biomarkers

ÖZET

Triazol fungusitler, geniş spektrumlu, steroidal olmayan antiöstrojenler ve çeşitli endüstriyel uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Toprak, su gibi çevresel ortamlarda ve canlı organizmaların dokularında bu fungusitlerin kalıntılarına rastlanmaktadır. Giderek artan toksisite raporları, triazol fungusitlerin çevre ve halk sağlığı açısından endişe verici kirleticiler olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, triazol grubu fungusitlerden en yaygın kullanılan türlerinden biri olan tebukonazolün (TEB) hedef dışı organizmalar olan tatlı su midyeleri (*Unio mancus*) üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada, 96 saat boyunca dört TEB konsantrasyonuna (1.5, 15, 150 ve 1500 µg AI L⁻¹) maruz bırakılan midyelerin solungaç ve sindirim bezlerinde çeşitli oksidatif stres parametreleri [toplam antioksidan konsantrasyonu (TAC), toplam oksidan konsantrasyonu (TOC), oksidatif stres indeksi (OSI), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA)], antioksidan enzimler [(süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR)] ve biyotransformasyon enzimlerinden karboksil esteraz (CaE) aktivitesi değerlendirilmiştir. TEB'e maruz kalmanın hem solungaçta hem de sindirim bezinde kontrole göre önemli oranda TAC, OSI, MDA seviyelerini arttırdığı, TOC ve GSH düzeylerini düşürdüğü, SOD, GPx, GST aktivitelerini arttırdığı, GR ve CaE'yi ise inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, TEB'in *U. mancus*'da önemli toksik etkiler oluşturduğu ve tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midyelerin TEB'e maruz kalma tehdidi altında olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteçler, oksidatif stres, tatlısu midyeleri, tebukonazol

ABSTRACT

Triazole fungicides are widely used as broad-spectrum, non-steroidal antiestrogens and for various industrial applications. Residues of these fungicides are found in environments such as soil and water, and in the tissues of living organisms. Increasing toxicity reports have led to the emergence of triazole fungicides as pollutants of environmental and public health concern. In this study, the toxic effects of tebuconazole (TEB), one of the most widely used triazole fungicides, on freshwater mussels (*Unio mancus*), which are non-target organisms, were investigated. In the study, various oxidative stress parameters [total antioxidant concentration (TAC), total oxidant concentration (TOC), oxidative stress index (OSI), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA)], antioxidant enzymes [(superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR)] and carboxylesterase (CaE) activity from biotransformation enzymes was evaluated in the gill and digestive glands of mussels exposed to four TEB concentrations (1.5, 15, 150 and 1500 µg AI L⁻¹) for 96 hours. It was observed that TEB exposure significantly increased TAC, OSI, MDA levels, decreased TOC and GSH levels, increased SOD, GPx, GST activities, and inhibited GR and CaE activities in both the gill and digestive gland compared to the control. As a result, it can be said that TEB has significant toxic effects on *U. mancus* and mussels living in freshwater ecosystems may be under the threat of TEB exposure.

Keywords: Biomarkers, oxidative stress, freshwater mussels, tebuconazole

How to cite this article

Uçkun M. (2021). Investigation of toxic effects of fungicide tebuconazole on freshwater mussels (*Unio mancus*) with multiple biomarkers. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 284-297. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1014522>

Research Article

Miraç Uçkun

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey

ORCID-

[0000-0002-9018-8515](https://orcid.org/0000-0002-9018-8515)

Correspondence

Miraç UÇKUN

m.uckun@adiyaman.edu.tr

Article info

Submission: 25-10-2021

Accepted: 29-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution

4.0 International License

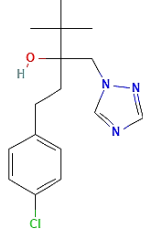


İRİŞ

G Azoller, geniş spektrumlu antifungal aktivitesi ve yüksek stabilitesi nedeniyle mantar enfeksiyonlarına karşı bitki koruması, insan mikozunun tedavisi ve veterinerlik tıbbı için yaygın olarak kullanılan antimikotik ajanlardır (Bhagat vd., 2021). İlaçların yanı sıra azol bileşikleri uçaklarda aşındırıcı inhibitörler (McNeill ve Cancilla, 2009), çamaşır tozu (Janna vd., 2011) ve şampuan, krem, köpük, diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinde de kullanılmaktadır (Allen vd., 2015). Azoller, dünya çapında yıllık 300,000 ton civarında olan

fungisit kullanımının büyük bir kısmını oluşturmaktadır (De vd., 2014). Çevrede yaygın olarak bulunması nedeniyle, suda yaşayan organizmalar üzerindeki zararlı etkileri konusunda endişeler vardır (Nong vd., 2021). Azol bileşikleri güçlü bakterisidal aktiviteye sahiptir ve biyolojik bozunmaya karşı dirençlidir. Azol, hücre zarı bütünlüğü için gerekli olan lanosterolü ergosterole dönüştüren bir sitokrom P450 (CYP) enzimi olan lanosterol 14- α -demetilazı (CYP51A1) inhibe eder. Dolayısıyla hücre zarının kaybı ve inhibisyonu, azolün antifungal doğasının arkasındaki ana mekanizmalardan biridir (García-Valcárcel ve Tadeo, 2012).

Tablo 1. Ticari pestisit formülasyonu ve etken maddenin fiziko-kimyasal özellikleri,^a

Pestisit	
	Orius 25 EW
Ticari konsantrasyon	250 g Al L ⁻¹
Etken madde	Tebukonazol
Etken maddenin fiziko-kimyasal özellikleri	
Yapısal formüller	
Etken madde grubu	Triazol
Pestisit tipi	Fungisit
Toksikolojik sınıf	III
Moleküler ağırlık (g/mol)	307.8
Lipofilite (log <i>K_{ow}</i>)	3.7 (20°C ve pH 7.0)
Toprak afinitesi (log <i>K_{oc}</i>)	2.96 – 3.10
Sudaki çözünürlük (mg/L)	32 (20°C)
GUS potansiyel sızma indeksi	1.86
Sudaki fotoliz yarılanma süresi (DT₅₀, gün)^b	Stabil
Sudaki hidroliz yarılanma süresi (DT₅₀, gün)	Stabil
Topraktaki kalıcılık süresi (DT₅₀, gün, aerobik koşullarda)^c	~800
Yüzey sularındaki konsantrasyon aralığı (µg L⁻¹)	9.1 µg L ⁻¹ ~ 200 µg L ⁻¹

^a Kaynaklar: PPDB, 2021; EFSA, 2008; Nikolaou vd. 2017; IUPAC 2019; Jiang vd. 2021.

^b Bileşikler anaerobik koşullar altında su ve toprakta çok daha kararlıdır.

^c Bileşikler asidik veya nötr pH koşulları altında hidrolize karşı stabildir, ancak alkali koşullar altında hidroliz meydana gelebilir. (pH 9).

GUS: Groundwater Ubiquity Score; yeraltı suyu yaygınlık puanı, potansiyel sızma indeksi

log *K_{ow}*: oktanol-su bölme katsayısının logaritması

log *K_{oc}*: Organik karbon bölme katsayısının logaritması

DT₅₀: Yarılanma süresi; dağılım süresi 50%.

Al [aktif ingredient]: etken madde

Bununla birlikte, tebukonazolün endokrin bozulması, üreme toksisitesi ve embriyonik toksisite gibi dikkate değer toksikolojik etkileri vardır (Ma vd., 2021) ve insanlar için potansiyel bir kanserojen risk oluşturmaktadır (Liu vd., 2016). Azol bileşiklerinin tarımda, eczacılıkta ve kişisel bakım ürünlerinde aşırı kullanımı, su, toprak ve su organizmalarında kontaminasyona neden olmuştur. Nehirlerde, atık sularında, göllerde ve haliçlerde azollerin biriktiği rapor edilmiştir (Pacholak vd., 2022).

Evsel kanalizasyon ve hastane atık sularının da yüksek miktarda azol bileşikleri içerdiği bildirilmiştir. Atık su arıtma tesisleri bu kaynaklardan büyük miktarda su alır ve azollerin giderilmesinde yetersizdir. Bu atık su arıtma tesislerinden çıkan atık suların doğal çevreye salınması, azol kirliliğinin başlıca kaynaklarından biridir (Peng vd., 2012). Tebukonazol (TEB), ((RS)-1-p klorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol), triazol ailesinin en iyi bilinen ve satılan sistemik fungusitidir. TEB'un ticari formülasyonu ve fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. TEB, yüksek lipofilik özelliklerinden dolayı toprakta çok kararludur ve toprak özelliklerine ve konjugenin başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak yarı ömrü 49-610 gündür (Sehonova vd., 2017). Yüzey sularında ve çiftliklerin yakınındaki sucul ortamlarda ölçülen TEB konsantrasyonlarının $9.1 \mu\text{g L}^{-1} \sim 200 \mu\text{g L}^{-1}$ aralığında olduğu tespit edilmiştir (Jiang vd., 2021). EPA (U.S.EPA, 2020) tarafından belirlendiği üzere, TEB'in balıklar için suda yaşam limit değeri $1135 \mu\text{g L}^{-1}$ 'dir. Midyeler suda yaşayan bentik organizmalar olduğundan sudaki kirleticilerin etkilerini en iyi yansıtan biyoindikatörlerden biridir (Naimo, 1995; Hongyi vd., 2009). *U. mancus*, IUCN Kırmızı Listesinde "Tehdit Altında" olarak listelenmiş olan bir tatlı su midye türüdür (IUCN, 2017). Literatürde TEB'in *U. mancus* üzerine toksik etkileriyle ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Sucul organizmalar

pestisitlere maruz kaldığında, oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen türlerinin üretimi artar. Bu reaktif oksijen türleri, hücredeki biyomoleküllerle etkileşime girerek hücre geçirgenliğini etkiler ve onları temizleyen antioksidan enzim sistemlerini değiştirir. Bu nedenle, sucul ekosistemlerde ksenobiyotiklerin neden olduğu oksidatif hasarın değerlendirilmesinde, sucul organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler ölçülür (Uçkun ve Öz, 2020). Biyolojik izleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan biyokimyasal göstergeler, oksidatif stres ilişkili parametreler ve biyotransformasyon enzimleridir (Perendija vd., 2007). Karboksilesteraz (CaE), suda yaşayan organizmalarda ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılan önemli esteraz enzimlerinden (Narra vd. 2015). Oksidatif stres ilişkili parametrelerden de en yaygın kullanılanları; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon S-transferaz (GST), Glutasyon redüktaz (GR), Glutasyon (GSH), Malondialdehit (MDA), Toplam antioksidan konsantrasyonu (TAC) ve Toplam oksidan konsantrasyonu (TOC)'dir.

Bu çalışmada, dünyada en yaygın kullanılan fungusitlerden TEB'in tehdit altındaki *U. mancus* üzerine kısa süreli (96 saat) toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, midyelerin sindirim bezi ve solungaç dokularında oksidatif stres parametrelerinden SOD, GPx, GST, GR, GSH MDA, TAC, TOC ve Oksidatif stres indeksi (OSI) ve biyotransformasyon enzimlerinden CaE aktivitesindeki değişimler değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METHOD

Hayvanlar ve deney koşulları

Atatürk Baraj Gölü'nün çevresinde tütün, pamuk ve bakliyat tarımı yapılmaktadır (Alkan Uçkun, 2017). Tatlı su midyesi *U. mancus* örnekleri baraj gölünde tarımın en yoğun yapıldığı, dolayısıyla pestisitlerin en çok uygulandığı

bölgelerden Temmuz 2019'da kafesli tırmık aleti yardımıyla temin edilmiştir. Toplanan midyeler, baraj gölü suyu ile doldurulmuş 15 L hacimli polipropilen tanklar ile uygun koşullar altında (seyyar hava motorları ile havalandırılarak) 1 saat içerisinde laboratuvara nakledilmiştir. Midyeler laboratuvara sevk edildikten sonra, damacana / pet su ile doldurulmuş 50 L hacimli polipropilen tanklara nakledilerek 2 hafta süreyle laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Tanklar sürekli hava pompaları yardımıyla havalandırılmış ve midyeler 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık döngüde, oda sıcaklığında (23 ± 1 °C'de) tutulmuştur (Uçkun ve Alkan Uçkun, 2021). Adaptasyon sürecinde midyeler, üç günde bir sucül omurgasızlar için özel üretilmiş ticari konsantre fitoplankton (Roti-Rich™) ile beslenmiştir.

Toksisite testleri

İki haftalık adaptasyon süreci sonunda TEB'un *U. mancus* üzerindeki subletal toksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla bir kontrol ve dört maruziyet grubu olmak üzere toplam beş test grubu kurulmuştur. Tüm test grupları üç tekrarlı olacak şekilde oluşturulmuştur ve bu amaçla 37x24x16 cm boyutlarında 8.5 L hacimli polipropilen tanklara her doz için kendine ait 5 L pestisit (test) solüsyonu ve 5'er adet midye bırakılarak deney düzeneği kurulmuştur. Her bir tekrar grubunda beş hayvan olacak şekilde her grupta toplam on beş hayvan kullanılmıştır (n=15). Toksisite testlerinde TEB'in ticari formu (Orius® 250 EW, Adama, Türkiye) kullanılmıştır. Bu ticari formun aktif bileşeni 250 g Al L^{-1} olarak etiketlenmiştir. Akvaryum hava pompası yardımıyla test solüsyonu içeren tankların sürekli havalandırılması sağlanmıştır. Deney esnasında midyeler beslenmemiştir. Deneylerin başlangıcında (0. saat) YSI Pro Plus multiparametre cihazı kullanılarak, kontrol ve uygulama gruplarına ait su numunelerinin sıcaklığı, çözülmüş oksijen yüzdesi, pH ve iletkenliği, ölçülmüştür. Ortalama pH, iletkenlik, sıcaklık ve çözülmüş oksijen değerleri sırasıyla 7.44 (7.23 - 7.65), 25.45 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (22.90 - 28.00),

22.7 °C (21.4 - 24.0) ve 7.20 mg L^{-1} (7.00 - 7.40) olarak tespit edilmiştir. Midyeler, 96 saatlik statik yenileme test sisteminde öldürücü olmayan dört TEB konsantrasyonuna (1.5, 15, 150 ve 1500 $\mu\text{g Al L}^{-1}$) maruz bırakılmıştır. En düşük test konsantrasyonu ve diğer konsantrasyonlar geometrik olarak 10 kat fazlası olacak şekilde hesaplanmıştır. Bu aralık, TEB için Jiang vd. (2021) tarafından belirlenen çevresel kabul edilebilir konsantrasyonlar olan 9.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ~ 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığı ve U.S.EPA (2020) tarafından belirlenen balıklar için suda yaşam limit değeri 1135 $\mu\text{g L}^{-1}$ dikkate alınarak belirlenmiştir.

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonlarının belirlenmesi

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda sıvı kromatografisi çift kütle spektrometresi (LCMSMS, Shimadzu Quadropole 8040) kullanılarak belirlenmiştir. TEB'un tutulma süresinin yaklaşık 4 dakika olduğu tespit edilmiştir. TEB konsantrasyonlarının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi 0.5-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığında oluşturulmuştur. Tespit limiti ve ölçüm limiti, sırasıyla 0.95 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 3.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (r^2) 0.997 olarak bulunmuştur. TEB, 308.24 → 125.13 kütle-yük oranları (m/z) ve 308.10 → 70.13 m/z geçişlerinde tespit edilmiştir. Tebukonazol Pestanal analitik standardı, % ≥ 98.0 saflıkla Sigma-Supelco'dan satın alınmıştır. Her numune üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. LCMSMS cihaz koşulları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Biyokimyasal analizler

Midyelerden alınan sindirim bezleri ve solungaçlar tartılarak bıçak uçlu bir homojenizatörle (Heidolph RZR 2021) 0.1 M (0.5 M K_2HPO_4 + 0.5 M KH_2PO_4), pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içerisinde (1: 4 (w / v) oranında) homojenize edilmiştir. Homojenatlar 16.000 x g'de 4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich 460 R). Elde edilen

süpernatantlar, toplam protein konsantrasyonu ölçümleri ve enzim aktiviteleri için ependorf tüplerine aktarılmıştır. Mikroplaka okuyucu spektrofotometrede (Thermo, Varioscan Flash 2000) üç tekrarlı olacak şekilde okuma yapılmıştır. Toplam protein konsantrasyonları, Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde, numunelerin süpernatantları seyreltildikten sonra, 5 µl'si mikroplaka kuyularına pipetlenmiş ve üzerlerine 250 µL Bradford solüsyonu eklenmiştir.

Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Daha sonra seyreltme faktörü dikkate alınarak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplanmıştır. Tüm enzimlerin aktiviteleri, toplam protein seviyeleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol min⁻¹ mg toplam protein⁻¹) cinsinden ifade edilmiştir.

Tablo 2. LCMSMS'in enstrümantal koşulları

Cihaz modeli	Shimadzu LCMSMS-8040
Mobil faz A	1 mM amonyum asetat % 100 su içinde
Mobil faz B	% 100 metanol
Kolon	Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D. × 50 mm L, 3 µm)
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Akış hızı	0.4 mL dak ⁻¹
Arayüz akımı	4.5 kV
Püskürtme gazı akış hızı	3 mL dak ⁻¹
Kurutma gazı akış hızı	15 mL dak ⁻¹
DL sıcaklığı	250 °C
HB sıcaklığı	400 °C

CaE aktivitesini belirlemek için Santhoshkumar ve Shivanandappa (1999) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem mikroplaka okuyucu sistemine uyarlanmıştır. Substrat olarak 26 mM %96 etanol içinde hazırlanan p-nitrofenol asetat (PNPA) kullanılmıştır. Bu amaçla 5 µL numune ve 250 µL Tris tamponu (0.05 M, pH 7.4) mikroplaka kuyularına pipetlenmiş ve 25°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyucuklara 5 µL PNPA eklenerek 0.5 mM nihai konsantrasyon elde edilmiş ve 405 nm'de 2 dakika süreyle distile suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Spesifik CaE aktivitesi nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır (PNPA için 405 nm $\epsilon = 1830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

SOD aktivitesi, Sun vd. (1988) tarafından geliştirilen yöntemle göre ölçülmüştür. Reaksiyonda ksantin ksantin oksidaz ile etkileşimi sonucu süperoksit radikalleri oluşmuştur. Bu süperoksit radikalleri

nitrobluetetrazolium ile etkileşime girerek 560 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilebilen renkli formazan boyası oluşturur.

GPx aktivitesinin ölçümünde Bell ve arkadaşlarının (1985) metodu mikroplaka okuyucu sistemine uyarlanmıştır. Bu yöntemde substrat olarak hidrojen peroksit (H₂O₂), katalaz inhibitörü olarak sodyum azit (NaN₃) kullanılmıştır. 10 µL süpernatant ve 60 µL 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 birim GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN₃ içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu mikroplaka kuyularına pipetlendikten sonra bu karışım 20°C'de 6 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 30 µL 1.67 mM H₂O₂ pipetlenerek reaksiyon başlatılmış, NADPH oksidasyonuna bağlı absorbans değişikliği, 25°C'de 3 dakika boyunca 340 nm'de kaydedilmiştir. Spesifik GPx aktivitesi nmol

min⁻¹ mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır (NADPH için $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 340 nm'de).

GST aktivitesinde, Habig ve arkadaşlarının (1974) yöntemi mikrolaka sistemine uyarlanarak ölçülmüştür. Substrat olarak CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen), kofaktör olarak GSH kullanılmıştır. Mikrolaka kuyularına 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu, 100 µL GSH ve 10 µL CDNB karışımı pipetlenmiştir. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildikten sonra 15 saniye karıştırılmış ve 344 nm'de absorbanstaki değişim 25°C'de 2 dakika süreyle kaydedilmiştir.

GR aktivitesi, Cribb vd. (1989) tarafından geliştirilen yöntemin mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmasıyla belirlenmiştir. Reaksiyon, 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), NADPH ve numuneden oluşan reaksiyon çözeltisine oksitlenmiş glutatyon (GSSG) eklenerek başlatılmıştır. Reaksiyon sırasında GSSG'den GSH oluşumuna bağlı olarak DTNB miktarındaki azalmaya göre spesifik GR aktivitesi hesaplanmıştır.

GSH seviyesi, Moron ve arkadaşlarının (1979) metodunun mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış haline göre belirlenmiştir. GSH standart eğrisine karşı örneklerin 412 nm'deki absorban değeri okunarak GSH düzeyi nmol GSH mg protein⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

MDA konsantrasyonu, Placer vd. (1966) tarafından bazı modifikasyonlarla tarif edildiği gibi tiyobarbitürik asit reaktif madde analizine dayalı olarak ölçülmüştür. MDA içerikleri, standart olarak malondialdehit bis (dietyl asetal) kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans değeri 532 nm'de okunmuş ve MDA konsantrasyonu, nmol MDA mg protein⁻¹ olarak ifade edilmiştir. TAC ve TOC analizleri ticari test kitleri (Reel Assay Diagnostics) kullanılarak yapılmıştır (Erel, 2005). TAC analizinin prensibi, koyu mavi-yeşil stabil 2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin sülfonat (ABTS) radikalinin numunedeki antioksidanlar tarafından renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürülmesine

dayanmaktadır. Örnekteki antioksidanların miktarı, bu rengin yokluğu ile ilişkilidir. Analiz, Trolox eşdeğeri olarak bilinen bir E vitamini analogu olan stabil bir antioksidan standart solüsyon kullanılarak kalibre edilmiştir. TAC seviyeleri, 660 nm'de end-point ölçümü sonucu absorban değerlerinden hesaplanmış ve µmol Trolox eşdeğerleri L⁻¹ olarak ifade edilmiştir. TOC testinin prensibi, numunede bulunan oksidanların Fe²⁺ iyon-şelatör kompleksini Fe³⁺ iyonuna oksitlemesidir. Asidik bir ortamda Fe³⁺ iyonu kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur ve renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak belirlenir. Renk yoğunluğu, numunedeki toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır. Tespit için kalibrasyon, hidrojen peroksit ile gerçekleştirilmiştir. TOC seviyeleri, 530 nm'de end-point ölçümü sonucu absorban değerlerinden hesaplanmış ve mmol H₂O₂ eşdeğerleri L⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Oksidatif stres indeksini (OSI) hesaplamak için $[\text{OSI} = \text{TOC}/(\text{TAC} \times 10)]$ formülü kullanılmış ve sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir (Erel, 2005).

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22 (ABD) yazılım paketi ile gerçekleştirilmiştir. Shapiro-Wilk ve Levene testleri kullanılarak, tüm değişkenler sırasıyla normallik ve homojenlik açısından analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farkı test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama değer ± standart hata olarak sunulmuştur. Tüm analizler için p<0.05 ve p<0.01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları

LCMSMS analizinden elde edilen test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları Tablo 3'de gösterilmiştir. 24 saat sonraki gerçek konsantrasyonların, nominal konsantrasyonlardan yaklaşık ~%5-16 arasında daha düşük olduğu belirlenmiştir. Nominal ve gerçek

konsantrasyonlar arasındaki bu farklılıklar, yüzey aktif maddeler, çözücüler ve pestisitlerin ticari formülasyonlarında kullanılan koruyucular

gibi diğer bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir (Korkmaz vd., 2018).

Tablo 3. Test sularındaki gerçek TEB konsantrasyonları (Ortalama±standart hata (N=3)).

Nominal konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gerçek konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1} \pm$ Standart hata)			
	Uygulamadan önce (0. saat)	Geri kazanım (%)	Uygulamadan sonra (24. saat)	Geri kazanım (%)
Kontrol	0	-	0	-
1.5	1.53 \pm 0.05	% 102.00	1.26 \pm 0.09	% 84.00
15	14.95 \pm 0.50	% 99.67	13.84 \pm 0.19	% 92.27
150	156.66 \pm 1.91	% 104.44	136.99 \pm 3.61	% 91.33
1500	1502.14 \pm 13.17	% 100.14	1429.55 \pm 32.21	% 95.30

Biyokimyasal yanıtlar

96 saatlik TEB maruziyeti sonrası *U. mancus*'un solungaç ve sindirim bezlerindeki biyokimyasal yanıtlar Tablo 4'de gösterilmiştir. CaE aktivitesi her iki dokuda da doza bağımlı olarak düşüş göstermiştir. Solungaç dokusunda sadece 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki düşüşler kontrole göre anlamlıyken sindirim bezinde tüm konsantrasyonlardaki düşüşler anlamlı olmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). En yüksek TEB konsantrasyonunda (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) CaE inhibisyonları, solungaçta kontrole göre yaklaşık olarak %35, sindirim bezinde ise %48 olarak hesaplanmıştır. SOD aktivitelerinde hem solungaçta hem de sindirim bezinde doza bağımlı artış gözlenmiştir. Solungaçta en fazla artış en yüksek TEB uygulama dozunda (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) görülürken, sindirim bezinde 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda görülmüştür. Her iki dokuda da 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozu hariç bütün dozlardaki artışlar kontrole göre anlamlı olmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). GPx aktivitesi de solungaç ve sindirim bezlerinde kontrole göre artmıştır. İki dokuda da en fazla artış 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda olmuştur ve kontrole göre anlamlıdır ($p < 0.05$, $p < 0.01$). GST aktivitesi solungaç ve sindirim bezinin her ikisinde de kontrole göre artış göstermiştir ancak bu artış solungaçta uygulanan TEB konsantrasyonu ile koordineli iken sindirim bezinde konsantrasyona bağımlı olmamıştır. Solungaçta 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozu hariç bütün

dozlardaki GST aktivitesi artışları kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Sindirim bezinde ise 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki artış kontrole göre $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ düzeylerinde önemliyken 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarındaki artışlar sadece $p < 0.05$ düzeyinde önemli, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki artış önemsiz bulunmuştur. GR aktivitesi solungaç ve sindirim bezinde tüm TEB dozlarında kontrole göre inhibisyona uğramıştır, ancak bu inhibisyonlar doza bağımlı olmamıştır. Sindirim bezindeki inhibisyonların tamamı kontrole göre önemliyken ($p < 0.05$, $p < 0.01$) solungaçta 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki inhibisyon $p < 0.05$ seviyesinde, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozundaki inhibisyon $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. En fazla inhibisyon, solungaç ve sindirim bezinde sırasıyla %60 ve %50 oranlarında 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ uygulama dozunda olmuştur. GSH düzeyi solungaç ve sindirim bezinde TEB uygulamasına bağlı olarak kontrole göre düşmüştür. Bu düşüşler, solungaçta 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemsizken, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda $p < 0.05$ seviyesinde, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozunda ise $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemli bulunmuştur. Sindirim bezinde ise tüm uygulama dozlarında kontrole göre $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemli bulunmuştur. MDA seviyelerinde sadece 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemli artışlar

olmuştur. Bu fark sindirim bezinde $p < 0.05$, $p < 0.01$ seviyelerinde önemliyken solungaçta $p < 0.05$ seviyesinde önemlidir. TAC seviyesi, hem solungaçta hem de sindirim bezinde bütün TEB uygulama dozlarında doza bağımlı olarak ve kontrole göre önemli derecede düşmüştür ($p < 0.05$, $p < 0.01$). TOC seviyesi ise solungaçta

bütün dozlarda, sindirim bezinde sadece $150 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ dozlarında kontrole göre önemli oranda artmıştır ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Oksidatif stres indeksinde (OSI) her iki dokuda da bütün dozlarda kontrole göre önemli artışlar olmuştur.

Tablo 4. 96 saat TEB maruziyeti sonrası *U. mancus*'un solungaç ve sindirim bezlerindeki biyokimyasal yanıtlar: (Enzim aktiviteleri, $\text{nmol dakika}^{-1} \text{mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata; GSH, MDA, TAC and TOC düzeyleri sırasıyla, $\text{nmol GSH mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata, $\text{nmol MDA mg protein}^{-1} \pm$ ortalama standart hata, $\mu\text{mol Trolox Equiv./L}$ ve $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{Equiv./L}$; OSI ise, AU (Arbitrary Unit) olarak ifade edilmiştir.) (n=15).

		Konsantrasyonlar				
Biyobelirteçler		Control	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	15 $\mu\text{g L}^{-1}$	150 $\mu\text{g L}^{-1}$	1500 $\mu\text{g L}^{-1}$
Solungaç	CaE	307.54±14.45	261.30±33.17	238.02±	203.77±9.08**	200.11±14.32**
	SOD	5.38±0.19	6.81±0.38	7.93±0.66**	8.15±0.21**	10.34±0.50**
	GPx	15.31±0.75	19.24±0.58	21.15±1.59*	24.72±1.96**	22.35±1.57**
	GST	35.44±2.77	44.30±1.88	48.57±2.69**	51.32±1.54**	52.55±2.75**
	GR	26.60±1.26	16.69±3.98	17.11±3.29	16.15±1.55*	10.77±1.05**
	GSH	0.21±0.01	0.15±0.03	0.15±0.01	0.14±0.01*	0.09±0.01**
	MDA	0.95±0.08	1.44±0.26	1.45±0.02	1.52±0.07*	1.56±0.11*
	TAC	1.91±0.01	1.62±0.02**	1.56±0.02**	1.09±0.01**	1.00±0.02**
	TOC	1.27±0.03	2.73±0.09**	2.57±0.03**	2.45±0.01**	3.78±0.11**
	OSI	0.064±0.002	0.17±0.008**	0.16±0.002**	0.22±0.002**	0.38±0.004**
Sindirim Bezi	CaE	1036.69±33.20	765.46±82.15**	640.27±51.58**	611.48±31.64**	543.07±23.45**
	SOD	6.45±0.14	7.55±0.47	8.33±0.44**	9.00±0.33**	8.15±0.04**
	GPx	9.81±0.39	11.48±0.75	12.88±0.41**	12.98±0.37**	12.51±0.10**
	GST	30.69±1.45	48.42±6.33*	42.63±3.44	50.33±3.06*	83.56±4.59**
	GR	16.73±0.77	9.44±0.54**	9.31±0.64**	9.57±0.59**	8.32±0.50**
	GSH	0.13±0.002	0.12±0.001**	0.11±0.002**	0.11±0.001**	0.09±0.001**
	MDA	0.60±0.03	0.77±0.05	0.82±0.10	1.07±0.08**	1.30±0.12**
	TAC	1.98±0.04	1.39±0.01**	0.87±0.03**	0.84±0.04**	0.77±0.06**
	TOC	0.38±0.08	0.52±0.02	0.56±0.04	0.72±0.02**	1.22±0.02**
	OSI	0.02±0.005	0.03±0.001*	0.04±0.002**	0.06±0.002**	0.12±0.001**

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

** : $p < 0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

TARTIŞMA

Pestisitler de dahil olmak üzere birçok ksenobiyotik, hücre zarı boyunca elektron taşınmasının bozulması, Fenton reaksiyonunun kolaylaştırılması, antioksidan enzimlerin inaktivasyonu ve serbest radikal süpürücülerin tükenmesi gibi çeşitli biyokimyasal mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyebilir (Winston ve Di Giulio,

1991). Bu reaktif oksijen türlerini temizlemek için organizmalarda antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir ve bu antioksidan sistemlerin aktivasyon / inhibisyon düzeyi değerlendirilerek ksenobiyotiklerin organizmaya verdiği oksidatif hasar tahmin edilmektedir (Di Giulio ve Meyer, 2008). Bu çalışmada, TEB'in tatlı su midyelerine toksik etkileri, solungaç ve sindirim bezlerinde oksidatif stres parametreleri, antioksidan enzim seviyeleri ve

biyotransformasyon enzimindeki değişimler gözlemlenerek değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda önemli bir biyotransformasyon enzimi olan CaE, kontrole göre inhibisyona uğramıştır. CaE'ler, karboksilik esterler, tiyoesterler, amidler, karbamatlar ve çeşitli ksenobiyotikler gibi substratların hidrolizini katalize eden esteraz ailesinin üyeleridir. CaE'ler lipid metabolizması, ön ilaç aktivasyonu, pestisit metabolizması ve ftalatların hidrolizi gibi önemli fizyolojik süreçlerde yer alırlar (Lenfant vd., 2012). CaE aktivitesindeki inhibisyonlar, organizmanın strese adaptasyonu olarak düşünülebilir (De Lima vd., 2013). Sindirim bezleri, oral yolla alınabilen esterleri içeren yüksek konsantrasyonlarda toksinler nedeniyle CaE ekspresyonu için özellikle önemlidir (Ross vd., 2010). CaE'nin inhibisyonu, TEB maruziyetinin midyelerde normal detoksifikasyon fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak, literatürde, çeşitli sucul canlılarda pestisit maruziyetine bağlı olarak CaE inhibisyonu olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Denton vd., 2003; Wheelock vd., 2005; Uçkun ve Öz, 2020; Uçkun vd., 2021). SOD, organizmayı oksidatif stresten korumak için süperoksit anyonlarını ve hidrojen peroksiti temizleyen antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşenidir. Çalışmamızda önemli ölçüde artan SOD aktivitesi, ROS'u ortadan kaldırmak ve oksidatif stresi azaltmak için antioksidan savunma sisteminin aktive olduğunu göstermektedir (Van Rensburg vd., 1995). Sonuçlarımıza paralel olarak, Cao vd. (2018) larva zebra balıklarına 4 gün boyunca 0.05 mg/L dozunda azoksistrobin uygulamasına bağlı olarak SOD aktivitesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Uçkun ve Öz (2020) konazol grubu pestisitlerden olan penkonazolü 96 saat boyunca uyguladıkları kerevitlerin hepatopankreas dokularında SOD aktivitesinin kontrole göre önemli oranda arttığını gözlemlenmiştir. GPx, GSH varlığında hidrojen peroksit ve lipid peroksit düzeylerinin

azalmasını katalize eden bir antioksidan enzimdir (Moreno vd., 2005). GPx enzimindeki inhibisyon, antioksidan sistemin pestisit yıkıcı etkisini önlemedeki başarısızlığını gösterebilir veya hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin bu enzimin sentezine doğrudan etkisi ile ilişkili olabilir (Yonar vd., 2014). Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda gözlemlenen GPx artışı, hücrede TEB'un neden olduğu oksidatif hasara karşı GPx'in koruyucu rolünü yansıtabilir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Jiang vd. (2018), yetişkin zebra balıklarında 24 saat azoxystrobine maruz kalmanın bir sonucu olarak tüm doz gruplarında GPx aktivitesinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. GST, Faz I detoksifikasyon ürünlerini suda daha çözünür bir forma dönüştüren konjugasyon işlevini yerine getiren bir Faz II detoksifikasyon enzimidir. Bu sayede reaktif serbest radikal birikimini ve hücre hasarı önler (Chahine ve O'Donnell, 2011). Çalışmamızda TEB konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak GST aktivitesinin artması, TEB'in solungaç ve sindirim bezinde GST üzerine doza bağlı toksik etkiye sahip olduğunu ve GST'nin de bu TEB'i detoksifiye etmek için aktivitesini arttırdığını düşündürmektedir. Aynı zamanda GST aktivitesindeki artış, H₂O₂'nin artan detoksifikasyonuna veya TEB'in faz II biyotransformasyonunun bir parçası olarak konjugasyon işlevine bağlanabilir (Hemalatha vd., 2015). Benzer şekilde, Korkmaz vd. (2018), zebra balıklarında (*Danio rerio*) 96 saat maruziyetten sonra GST'nin fosolon bazlı ve sipermetrin bazlı pestisitler tarafından indüklendiğini gözlemlenmiştir. Literatürde pestisit uygulanan sucul canlılarda GST aktivitesinin arttığını ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır (Sayeed vd., 2003; Oruç, 2010; Moreira vd., 2010; Uçkun ve Öz, 2021; Uçkun ve Özmen 2021). GR, hücrede genel homeostatik oksido indirgeyici denge sağlayarak azaltılmış glutatyon durumunu korur, böylece hücreleri reaktif oksijen metabolitlerine karşı korur (Djordjevic vd., 2010). Çalışmamızda GR'nin inhibe olmasının nedeni, yüksek konsantrasyonlarda TEB uygulamasından dolayı

meydana gelen oksidatif stres olabilir. GR, GSSG'den GSH'nin geri dönüşümüne katılarak hücreye antioksidan koruma sağlar (Elia vd., 2003). GR'nin etkisi ile hücre içindeki GSH ve GSSG arasındaki denge, GSH'nin geri dönüşümü ile sağlanır (Schafer ve Buettner, 2001). Bu nedenle GSH, GSSG ve toplam glutatyon içerikleri de azalır, dolayısıyla glutatyon içeren savunma sistemi yüksek doz TEB maruziyetine karşı zayıf kalır. GSH, pestisit maruziyeti nedeniyle ROS üretimini kontrol etmede rol oynayan enzimatik olmayan bir antioksidandır (Parke ve Piotrowski, 1996). Oksijen radikallerine maruz kalmak GSH düzeyinde artışa neden olur (Dickinson ve Forman, 2002). Çalışmamızda GSH düzeyindeki düşüş, TEB uygulamasının neden olduğu oksidatif stres koşullarında tüketilen GSH'nin üretilen GSH'den daha hızlı olduğunu göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden biri olan MDA, hücre zarlarındaki iyon geçirgenliğini bozar, zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve enzimlerin aktivitesini bozar (Mercan, 2004). Çalışmamızda, uygulanan TEB konsantrasyonunun artması nedeniyle MDA düzeyindeki artışlar, MDA'nın lipid peroksidasyonunun son ürünü olması nedeniyle, TEB'in biyomoleküllerde önemli oksidatif hasara neden olduğunu ve yüksek düzeyi, serbest radikallerin aşırı üretildiğini ve hücre zarlarına hasarının olduğunu göstermektedir (Abhijith vd., 2016).

TAC, biyolojik numunelerde toplam antioksidan kapasiteyi bulmak için kullanılan bir test solüsyonu tarafından temizlenen serbest radikal miktarının bir ölçüsüdür. TOC ise tüm antioksidan sistemin serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneğini ölçmek için kullanılan bir parametredir. TAC ve TOC, organizmaların ksenobiyotiklerin neden olduğu oksidatif strese karşı biyolojik tepkilerini tahmin etmede faydalı biyobelirteçlerdir (Pinchuk vd., 2012; Regoli, 2000). TAC'nin enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların toplamı olduğu

varsayılmaktadır (Mahfouz vd., 2009). Çalışmamızda TAC seviyesinin TEB uygulamasına bağlı olarak düşmesinin nedeni, TEB'in solungaç ve sindirim bezinde yarattığı oksidatif strese tepki olarak enerji tüketimi olarak açıklanabilir. Bulgularımıza paralel olarak Hamed vd., (2020), mikroplastiklere maruz bıraktıkları *Oreochromis niloticus*'ta doz arttıkça TAC seviyesinin düştüğünü gözlemlemiştir. Uçkun ve Uçkun (2021), su ve sedimentinde yoğun metal bulunan bölgelerden topladıkları sazan balıklarının karaciğerinde TAC seviyesinin temiz bölgelere göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. TOC, bir kimyasal indükleyicinin organizmada oluşturduğu toplam oksidan molekül miktarını yansıtır. Çalışmamızda TOC seviyesinin artması, TEB'in oksijen radikallerine bağlanarak onları hücrede ROS üretimini artıran ve antioksidan enzimleri inhibe eden çeşitli reaktif metabolitlere dönüştürmesine yorulabilir (Vahdati Hassani vd., 2018). OSI, organizmada oksidatif strese neden olan serbest radikal oluşturucu ajanlar ile bunlara karşı antioksidan savunma sistemleri arasındaki ilişkinin derecesini gösteren bir göstergedir (Sayed ve Khalil, 2016). Çalışmamızda uygulanan TEB konsantrasyonu arttıkça OSI değerinin kontrole göre anlamlı olarak artması TAC ve TOC bulgularımızı desteklemektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, TEB'in, antioksidan enzimlerin aktivitesini bozarak ve GSH, MDA, TAC ve TOC seviyelerini değiştirerek oksidatif stresi indüklediği söylenebilir. Ayrıca TEB uygulaması nedeniyle CaE inhibisyonun gözlenmesi, TEB'in kısa süreli uygulamalarda biyotransformasyon sistemini uyarabileceği bilgisini vermektedir. Literatürde *U. mancus* üzerine pestisitlerden penkonazol (Yoloğlu, 2019) ve imidaklopritin (Uçkun ve Alkan Uçkun, 2021) toksik etkilerine yönelik çalışmalar mevcuttur ancak TEB'e ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda

çalışmamız TEB'in hedef dışı organizmalar üzerindeki toksik etkileri ile ilgili literatüre önemli bir katkı sağlamıştır. Sonuçlarımız, TEB'in düşük konsantrasyonlarda bile *U. mancus* üzerinde önemli toksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle TEB'in kullanıldığı tarım alanlarına yakın tatlı sularda yaşayan *U. mancus* 'un tehdit altında olabileceğini söyleyebiliriz.

AÇIKLAMALAR

Etik beyan: Çalışma, tatlısu midyesi (mollusca-bivalvia) ile yapıldı. Tatlı su midyeleri omurgasız hayvanlar grubuna girdiğinden dolayı bu gruptaki hayvanlara etik kurul raporu gerekmemektedir.

Çıkar çatışması: Yazar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abhijith, B.D., Ramesh, M., Poopal, R.K. (2016).** Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 77, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.11.002>
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R., Perfect, J. (2015).** Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(6), 787-98. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032939>
- Alkan Uçkun, A. (2017).** Ecotoxicological evaluation of pesticide pollution in Ataturk dam Lake (Euphrates River), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(2), 313-321. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_2_10
- Bell, J.G., Cowey, C.B., Adro, J.W., Shanks, A.M. (1985).** Some effects of vitamins and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 53, 149–57. <https://doi.org/10.1079/BJN19850019>
- Bhagat, J., Singh, N., Nishimura, N., Shimada, Y. (2021).** A comprehensive review on environmental toxicity of azole compounds to fish. *Chemosphere*, 262, 128335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128335>
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cao, F., Wu, P., Huang, L., Li, H., Qian, L., Pang, S., Qiu, L. (2018).** Short-term developmental effects and potential mechanisms of azoxystrobin in larval and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 198, 129-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.023>
- Chahine, S., O'Donnell, M.J. (2011).** Interactions between detoxification mechanisms and excretion in malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 214, 462-8. <https://doi.org/10.1242/jeb.048884>
- Cribb, A.E., Leeder, J.S., Spielberg, S.P. (1989).** Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 183, 195–6. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90188-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90188-7)
- De Lima, D., Roque, G.M., De Almeida, E.A. (2013).** In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research*, 91, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.005>
- De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. (2014).** Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles. Springer India, New Delhi, pp 59–81.
- Denton, D.L., Wheelock, C.E., Murray, S.A., Deanovic, L.A., Hammock, B.D., Hinton, D.E. (2003).** Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(2), 336-341. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220214>
- Di Giulio, R.T., Meyer, J.N. (2008).** Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 273-324.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J. (2002).** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019–26. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3)
- Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Niciforovic, A., Radojic, M.B. (2010).** Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiological Research*, 59(5), 729-36.
- EFSA. (2008).** European Food Safety Authority, Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penconazole. *EFSA Scientific Report*, 175, 1–104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.119r>
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L. (2003).** Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55,162-7. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00123-9)
- Erel, O. (2005).** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-11. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008>

- García-Valcárcel, A.I., Tadeo, J.L. (2012).** Influence of moisture on the availability and persistence of clotrimazole and fluconazole in sludge-amended soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 501-7. <https://doi.org/10.1002/etc.1711>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974).** Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hamed, M., Soliman, H.A.M., Osman, A.G.M., Sayed, A.E.H. (2020).** Antioxidants and molecular damage in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 14581-8. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07898-y>
- Hemalatha, D., Amala, A., Rangasamy, B., Nataraj, B., Ramesh, M. (2015).** Sublethal toxicity of quinalphos on oxidative stress and antioxidant responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*, 31, 1399-406. <https://doi.org/10.1002/tox.22145>
- Hongyi, N., Wenjing, D., Qunhe, W., Xingeng, C. (2009).** Potential toxic risk of heavy metals from sediment of the Pearl River in South China. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 1053-58. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62381-5](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62381-5)
- IUCN. (2021, October 24).** *Unio mancus*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2014*: e.T22737A42466471. (Lopes-Lima, M., Seddon, M.B. (2014)). <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-3.RLTS.T22737A42466471.en>.
- IUPAC (2021, October 5)** Tebuconazole (Ref: HWG 1608), Environmental fate-ecotoxicology-human health-A to Z index. Retrieved from <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/610.htm>.
- Janna, H., Scrimshaw, M.D., Williams, R.J., Churchley, J., Sumpter, J.P. (2011).** From Dishwasher to Tap? Xenobiotic Substances Benzotriazole and Tolytriazole in the Environment. *Environmental Science and Technology*, 45(9), 3858-64. <https://doi.org/10.1021/es103267g>
- Jiang, J., Chen, L., Liu, X., Wang, L., Wu, S., & Zhao, X. (2021).** Histology and multi-omic profiling reveal the mixture toxicity of tebuconazole and difenoconazole in adult zebrafish. *Science of The Total Environment*, 795, 148777.
- Jiang, J., Shi, Y., Yu, R., Chen, L., Zhao, X. (2018).** Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. *Chemosphere*, 202, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.055>
- Korkmaz, V., Güngördü, A., Ozmen, M. (2018).** Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 265-72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.055>
- Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., Chatonnet, A. (2012).** ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Research*, 41, 423-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1154>
- Liu, N., Dong, F., Xu, J., Liu, X., Zheng, Y. (2016).** Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.007>
- Ma, F., Li, Y., Yu, Y., Li, Z., Lin, L., Chen, Q., Xu, Q., Pan, P., Wang, Y., Ge, R.S. (2021).** Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal leydig cells. *Chemosphere*, 262, 127792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127792>
- Mahfouz, R., Sharma, R., Sharma, D., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2009).** Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 91, 805-11. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.022>
- McNeill, K.S., Cancilla, D.A. (2009).** Detection of triazole deicing additives in soil samples from airports with low, mid, and large volume aircraft deicing activities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 265-9. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9626-z>
- Mercan, U. (2004).** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-6.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Rendón-von Osten, J., Da Silva, E.M., Ribeiro, R., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. (2010).** Ecotoxicological tools for the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 893-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.04.007>
- Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gomez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C. M., Camean, A. M. (2005).** Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol*, 45(4), 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.11.001>
- Moron, M.S., Depierre, J.W., Mannervik, B. (1979).** Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 582(1), 67-78. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(79\)90289-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(79)90289-7)
- Naimo, T.J. (1995).** A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*, 4, 341-62. <https://doi.org/10.1007/BF00118870>
- Narra, M.R., Rajender, K., Reddy, R.R., Rao, J.V., Begum, G. (2015).** The role of vitamin C as antioxidant in protection biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere*, 132, 172-8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.006>

- Nikolaou, S., Efstathiou, P., Tiggiridou, M., Arabatzis, N., Piera, Y., Aletrari, M. (2017). Monitoring of pesticides in drinking, surface and ground water of Cyprus by liquid-liquid and solid phase extraction in combination with GC/MS and UPLC/MS/MS. *Journal of Water Resource and Protection*, 9, 1184–98. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2017.910077>
- Nong, Q.Y., Liu, Y.A., Qin, L.T., Liu, M., Mo, L.Y., Liang, Y.P., Zeng, H.H. (2021). Toxic mechanism of three azole fungicides and their mixture to green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere*, 262, 127793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127793>
- Oruç, E.Ö. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), 160-6. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- Pacholak, A., Burlaga, N., Frankowski, R., Zgola-Grzeškowiak, A., Kaczorek, E. (2022). Azole fungicides:(Bio) degradation, transformation products and toxicity elucidation. *Science of the Total Environment*, 802, 149917. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149917>
- Parke, D.V., Piotrowski, J.K. (1996). Glutathione: its role in detoxication of reactive oxygen species and environmental chemicals. *Toxicology*, 4(1), 1–13.
- Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, Z., Wang, C. (2012). Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Science of the Total Environment*, 426, 311-17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.067>
- Perendija, B.R., Borkovic, S.S., Kovacevic, T.B., Pavlović, S.Z., Stojanović, B.D., Paunovic, M.M., Cakic, P.D., Radojicic, R.M., Pajović, S.B., Saičić, Z.S. (2007). Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Archives of biological sciences*, 59(3), 169-75. <http://dx.doi.org/10.2298/ABS0703169P>
- Pinchuk, I., Shoal, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. (2012). Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165, 638-47. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.05.003>
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- PPDB. (2021, October 24). Pesticide Properties DataBase. University of Hertfordshire. Retrieved from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/509.htm>
- Regoli, F. (2000). Total Oxylradical Scavenging Capacity (TOSC) in Polluted and Translocated Mussels: A Predictive Biomarker of Oxidative Stress. *Aquatic Toxicology*, 50, 351-61. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00091-6)
- Ross, M.K., Streit, T.M., Herring, K.L., Xie, S. (2010). Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Journal of Pesticide Science*, 35, 257–64. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-07>
- Santhoshkumar, P., Shivanandappa, T. (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 119, 277–82. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(99\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(99)00037-x)
- Sayed, A.E.H., Abu Khalil, N.S. (2016). Oxidative Stress Induction in Monosex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758): A Field Study on the Side Effects of Methyltestosterone. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000416>
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 295-301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1191-212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Sehonova, P., Phalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Prokes, M., Tichy, F., Fiorino, E., Faggio, C., Svobodova, Z. (2017). Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere*, 188, 414–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.151>
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497–500. <https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497>
- U.S.EPA (2020). Aquatic life benchmarks and ecological risk assessments for registered pesticides. Retrieved April 7, 2021, from <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk>.
- Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2020). Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), 35626-37. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09595-2>
- Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2021). Evaluation of the acute toxic effect of azoxystrobin on non-target crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) by using oxidative stress enzymes, ATPases and cholinesterase as biomarkers. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(5), 550-7. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1774604>
- Uçkun, A.A., Uçkun, M. (2021). Evaluation of Some Biomarkers in Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) Depending on Water and Sediment Pollution of Atatürk Dam Lake. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10(3), 744-53. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.898021>
- Uçkun, M., Alkan Uçkun, A. (2021). Tatlı Su Midyelerine (Unio mancus) İmidakloprid Uygulanmasının Solungaç ATPaz Aktiviteleri Üzerine Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 37(1), 91-98.

- Uçkun, M., Özmen, M. (2021). Evaluating Multiple Biochemical Markers in *Xenopus laevis* Tadpoles Exposed to the Pesticides Thiacloprid and Trifloxystrobin in Single and Mixed Forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(10), 2846-60. <https://doi.org/10.1002/etc.5158>
- Uçkun, M., Yoloğlu, E., Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. (2021). Acute Toxicity of Insecticide Thiamethoxam to Crayfish (*Astacus leptodactylus*): Alterations in Oxidative Stress Markers, ATPases and Cholinesterase. *Acta Chimica Slovenica*, 68(3), 521-31. <http://dx.doi.org/10.17344/acsi.2021.6823>
- Vahdati Hassani, F., Abnous, K., Mehri, S., Jafarian, A., Birner-Gruenberger, R., Yazdian Robati, R., Hosseinzadeh, H. (2018). Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.021>
- Van Rensburg, S.J., Carstens, M.E., Potocnik, F.C.V., Van Der Spuy, G., Van Der Walt, B.J., Taljaard, J.J.F. (1995). Transferrin C2 and Alzheimer's disease: another piece of the puzzle found? *Medical Hypotheses*, 44(4), 268-72. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90178-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90178-7)
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A., Hammock, B.D. (2005). Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 172-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.009>
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, 19(2), 137-61. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6)
- Yonar, S.M., Ural, M.Ş., Silici, S., Yonar, M.E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 202-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.007>
- Yoloğlu, E. (2019). Assessment of Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, and Total-ATPase Activities in Gills of Freshwater Mussels Exposed to Penconazole. *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 88-92. <https://doi.org/10.31594/commagene.632082>