

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

METHYLPARABENİN

DENİZ KESTANESİ (*Arbacia lixula*)

ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ

Serkan TEZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice PARLAK

Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 15.07.2016

Bornova-İZMİR

2016

Serkan TEZ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Methylparabenin Deniz Kestanesi (*Arbacia lixula*) Üzerindeki Toksik Etkileri” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.07.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

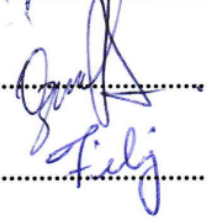
Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Hatice PARLAK



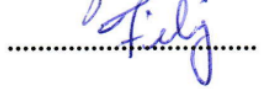
Raportör Üye

: Doc. Dr. Dilek ÇAKAL ARSLAN



Üye

: Prof. Dr. Bina KÜÇÜKSÖZGİN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Methylparabenin Deniz Kestanesi (*Arbacia lixula*) Üzerindeki Toksik Etkileri” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

13 / 06 / 2016

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**METHYLPARABENİN DENİZ KESTANESİ****(*Arbacia lixula*) ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ**

TEZ, Serkan

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice PARLAK

Haziran 2016, 63 sayfa

Methylparaben, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrileri başta olmak üzere, boya ve kağıt üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günlük hayatın her alanında tüketilen ürünlerin içinde koruyucu kimyasal olarak bulunan methylparaben, kullanım ve atılım sonrası tüm diğer kimyasallar gibi sucul ekosistemlere giriş yapmaktadır. İlk kez 1996 yılında sucul ekosistemlerdeki varlıkları üzerine çalışılmış olan methylparabenin, akarsu, göl, deniz, atık su arıtma giriş suları ve işlem gören arıtılmış bazı atık su arıtma tesislerinden alınan örneklerde ng/l-µg/l aralığında varlıklarına rastlanmıştır. Suda çok iyi çözünebilir bir kimyasal olmasına rağmen methylparaben, sürekli kullanım ve atılımına bağlı olarak sucul ekosistemlerde her zaman bulunur durumdadır. Endokrin bozucu kimyasallar olarak sınıflandırılan parabenlerden methylparaben, en yaygın ve yoğun olarak bulunan paraben türüdür. Bu tez çalışmasında, organizmaların çevresel streslere en hassas olduğu erken yaşam evrelerindeki etkinin belirlenebilmesi için *A. lixula* türü deniz kestanesi ile yapılan biyodenemeler ile methylparabenin çeşitli konsantrasyonlarında genotoksik, embriyotoksik ve spermiyotoksik etkileri, fertilizasyon başarısı ile döl kalitesi olarak ortaya koyulmuştur. *A. lixula* türü deniz kestanesinin yumurtaları çok koyu renkli olduğu için genotoksik çalışmalarda kullanılan yöntem geliştirilerek dekolorizasyon işlemi yapılmış ve mitotik bozukluklar belirlenebilmiştir. Denemeler sonucunda, methylparabenin 8 ppm ve üzeri konsantrasyonlarında *A. lixula* embriyolarının larval aşamaya geçemediği ve konsantrasyona bağlı olarak mitotik bozukluklarda artış olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Ekotoksikoloji, deniz kestanesi, *Arbacia lixula*, embriyotoksisite, genotoksisite, spermiyotoksisite

ABSTRACT**TOXIC EFFECTS OF METHYLPARABEN****ON SEA URCHIN (*Arbacia lixula*)**

TEZ, Serkan

MSc in Marine-Inland Water Sciences and Technology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice PARLAK

June 2016, 63 pages

Methylparaben is widely used in industries like paint, paper and especially cosmetic, food and drug. Due to the presence in products as preservatives, which are widely used in daily life, methylparaben have been introduced to the aquatic ecosystems after usage and excretion just like all other chemicals. In 1996, the first study was published reporting methylparaben had been detected in water samples taken from aquatic environment and since then, it has been revealed that methylparaben is present in almost all of the samples collected from rivers, lakes, sea, influent and effluent waters of waste water treatment plants, in range of ng/l- μ g/l. Although it is a fairly water soluble chemical, methylparaben is ubiquitous in aquatic ecosystems due to the continuous usage. Parabens are also classified as endocrine disruptor chemicals and methylparaben is reported to be the most common paraben type found in the environment. In this study, genotoxic, spermotoxic and embryotoxic effects of methylparaben in different concentrations were studied by the bioassays using sea urchin *Arbacia lixula* as the test organism, to determine the effects in the early life stages when the organisms show the highest sensitivity to the environmental stresses. Since the *A. lixula* eggs are dark-coloured, the method used in genotoxicity were modified and developed to decolorize the eggs, therefore the mitotic aberrations could be determined. The results of the bioassays show that *A. lixula* embryos were not able to make it to the larval stage in concentrations of 8 ppm and above of methylparaben and number of mitotic aberrations tended to increase depending on methylparaben concentrations.

Key words: Ecotoxicology, sea urchin, *Arbacia lixula*, embryotoxicity, genotoxicity, spermotoxicity



TEŐEKKÖR

Yüksek lisans yapma konusunda beni ikna eden ve eğitim hayatım boyunca aydınlatan değerli danışmanım, bilim insanı Sayın Prof. Dr. Hatice PARLAK'a tüm emekleri, destekleri ve varlığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması için yapılan arazi çalışmalarının yanı sıra laboratuvardaki çalışmaların her saniyesinde emeği olan Araş. Gör. Dr. Muhammet Ali KARAASLAN'a ve laboratuvar çalışmalarında bilgi birikimi ve tecrübesiyle destek olan Doç. Dr. Özlem ÇAKAL ARSLAN'a teşekkürü borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1 Parabenlerin Genel Özellikleri	18
2.2. Kimyasallar	21
2.3. Deniz Kestanesinin (<i>Arbacia lixula</i>) Genel Biyolojik Özellikleri	21
2.3.1. Üreme ve embryonik gelişim	23
2.4. Arazi Örneklemeleri	25
3. BİYODENEMELER	26
3.1. Spermiotoksisite	27
3.1.1. Fertilizasyon başarısı	27
3.1.2. Döl kalitesi	28
3.2. Embryotoksisite	28
3.3. Genotoksisite	30
3.4. İstatistik	33
4. BULGULAR	34
4.1. Spermiotoksisite Bulguları	34
4.1.1. Fertilizasyon başarısı bulguları	34
4.1.2. Döl kalitesi bulguları	35
4.2 Embryotoksisite Bulguları	37
4.3 Genotoksisite Bulguları	40
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	44

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ	46
ÖZGEÇMİŞ	65



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Heberer (2002)'e göre farmasötik ve tüm diğer kimyasalların çevresel dağılımı.....	9
2.1 p-hidroksibenzoik asit.....	18
2.2 Kullanımı en yaygın paraben tiplerinin moleküler şemaları.....	19
2.3 Habitatında gece görüntülenen deniz kestaneleri (<i>A. lixula</i>)	22
2.4 <i>Arbacia lixula</i> türü deniz kestanesinin dağılım gösterdiği bölgeler.....	23
2.5 Dişi (soldaki) ve erkek (sağdaki) <i>A. lixula</i>	24
3.1 Denemelerde yumurta ve sperm elde edilen dişi (soldaki) ve erkek <i>A. lixula</i>	26
3.2 <i>A. lixula</i> yumurta (soldaki) ve spermalarının filtre edilme işlemi.....	26
3.3 Döllenenmiş (alttaki) ve döllenmemiş <i>A. lixula</i> yumurtaları.....	28
3.4 Normal pluteus.....	30
3.5 Embryonik gelişim bozuklukları.....	30
3.6 Dekolorizasyon ve asetokarmin boyama sonrası bir embryo ve mitotik aberasyonlar.....	32
4.1 Metilparabenin fertilizasyon başarısı üzerine etkisi.....	35
4.2 Metilparabene maruz bırakılan spermaların döl kalitesinde görülen değişmeyen plutei sayısı-metilparaben konsantrasyonu ilişkisi.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 N (normal) ve p1 (patolojik 1) statülerindeki ekinopluteus larvaları.....	37
4.4 72 saat metilparabene maruz bırakılan A. lixula embyolarından sağlıklı olarak larval aşamaya geçebilen birey sayıları ve toksikant konsantrasyonu ilişkisi.....	39
4.5 72 saat süreyle metilparabene maruz bırakılan A. lixula embyolarında görülen embryonik bozukluklar ile toksikant konsantrasyonu ilişkisi.....	39
4.6 Embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk-metilparaben konsantrasyon ilişkisi.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 EPA (2007)'ya göre 1986-2002 arasında ABD'de paraben üretim miktarları (ton)	3
2.1 Kullanımı en yaygın paraben tiplerinin genel kimyasal özellikleri.....	18
3.1 Genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan ölçütler.....	32
4.1 Döllenme başarısı çalışmalarında 30 dakika süreyle belirtilen konsantrasyonlarda metilparabene maruz bırakılan spermilerin fertilizasyon oranları (%FO) ve düzeltilmiş endeksleri (DE).	34
4.2 30 dakika süreyle metilparabene maruz bırakılan A. lixula spermi ile elde edilen embryolarıda, fertilizasyondan 72 saat sonra gözlenen toplam gelişim bozuklukları ortalamaları (± standart hata). P1: Sindirim sistemi ve iskelet bozuklukları; P2 larval aşamaya geçemeyen embryo	36
4.3 Embryogenezis süresince metilparabene maruz kalan A. lixula embryolarında görülen larval gelişim bozuklukları. N: normal, P1-patolojik 1, P2-patolojik 2, R-cüce, D-ölü ve p student's t testinin önemlilik derecesi.	38
4.4 Sitotoksisite çalışmaları sonucu elde edilen sayısal veriler. TMB/Emb: embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk; %IE: interfaz embryo yüzdesi; M/A metafaz/anafaz oranı; M/Emb: embryo başına düşen mitoz sayısı.....	40
4.5 Genotoksisite çalışmaları sonucu mikroskop altında gözlenen mitotik bozukluklar. IP: düzensiz profaz, IM: düzensiz metafaz, L-B: laggard kromozom-kromozom köprüsü, FR: fragmentasyonlu kromozom, VC: vagrant kromozom, MP multipolar kromozom.....	42



1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi, günümüzden milyonlarca yıl öncesine dayanmaktadır. Alet kullanabildiği için atalarından farklı olarak sınıflandırılan *Homo* cinsinin tarihe bıraktığı izler, milyonlarca yıllık insanlık tarihinin son birkaç milyon yıllık dönemini daha önemli kılmaktadır. İnsan ailesinin bireyleri, bu birkaç milyon yıllık zaman diliminde, beslenme ve güvenli bir ortamda barınma gibi temel ihtiyaçlarını gidermeye çalışırken, pek çok sorunla karşılaşmış ve bu zorluklar karşısında çözüm aramaya, hatta zorlu yaşam koşullarına adapte olabilmek için mutasyona zorlanmışlardır. Beslenmek için elverişsiz olan bölgelerden göç edilerek (Head and Gibbard, 2005) yeni yaşam alanları keşfedilmiş ve çözüm üretmenin ilk sinyalleri verilmiştir.

Kuru, sert ve lifli bitkilerin yoğunlukta, ağaçların ise nispeten az sayıda olduğu kurak iklimin geniş alanlara hakim olduğu dönemlerdeki ekolojik değişiklikler, hayatta kalma içgüdüleri ile yeni yaşam alanlarına doğru göç etmek gibi kısa vadeli çözümlerin yetersiz kalmasına yol açmıştır. Bu durum, insanın atasını bu zorlu koşullara adapte olmaya zorlayarak, genetik kompozisyonunun değişmesine yol açmış; ilerleyen nesillerde azı diş gelişimi, diş minelerinde kalınlaşma, çene ve kafatası yapılarında güçlenme gibi değişimlere neden olmuştur (Harrison, 1989).

Ekolojik değişikliklere karşı gösterilen yapısal ve fizyolojik adaptasyonlar birkaç milyon yıl boyunca devam ederken, insan ailesi bireyleri, günlük hayatta karşılaştıkları sorunlara karşı anlık çözümler bulmak zorunda kalmış ve keşsettikleri yenilikleri, hayatlarının birer parçası haline getirmişlerdir. Tüketmekte ve sindirmekte güçlük çektikleri besinlerini daha küçük parçalara ayırmak için taş alet kullanmaya başlayarak (Ambrose, 2001); zamanla bakır, tunç ve demiri keşfedip, işleyerek; arkeolojik devirlerin sınırlarını belirlemişlerdir.

Metallere şekil vererek alet ve silah üretmeye başlayan insanlık, zamanla yeryüzünü kendisi için daha güvenli ve yaşanılır bir yer haline getirmeyi başarmış, milyonlarca yıl boyunca adapte olmaya çalıştığı doğayı, kendisine adapte olacak duruma getirmiştir. Doğanın hakimi olmayı başaran insan ailesinin nüfusunun artmasıyla, ihtiyaç duyan toplumlar ve bu ihtiyaçları gideren endüstriler oluşmaya başlamıştır. Başlangıçta sadece hayatta kalma ve günlük hayatı kolaylaştırma amacıyla olan insanlık, zamanla endüstrileşme ve teknolojiyi hayatına dahil etmiş, bununla beraber endüstriyel kirlilik tabirini yeryüzüyle tanıştırmış ve yeryüzünün

asıl sahipleri olan canlılara zarar vermeye başlamıştır. Milyonlarca yıl boyunca doğaya uyum sağlamak için göçe zorlanan, genetik kompozisyonu değişmek zorunda kalan ve tamamen doğanın kontrolü altında olan insanoğluyken, roller değişmiş ve doğa, insanoğlu tarafından yönetilmeye ve ciddi zararlar görmeye başlamıştır.

Zamanla birincil ihtiyaçlarının çok daha fazlasını elde etmeye başlayan insan ailesinin yaşam düzeyi artış göstermiş ve 16. yüzyıl öncesinde lüks sayılabilecek pekçok ürün, toplumun orta ve alt tabakası tarafından elde edilebilir hale gelmiştir. Deniz taşımacılığının yaygınlaşması ve teknolojinin ilerlemesi, artan ihtiyaçların giderilmesini kolaylaştırmıştır. 16. yüzyıldan itibaren Avrupa'daki yoğun nüfus artışını takip eden endüstri devrimi (Szreter and Mooney, 1998) ile, üreten toplumların sayısı giderek artmıştır. Artan nüfus ile beraber artış gösteren toplumsal ve bireysel ihtiyaçlar, hızlı yükselişine halen devam etmekte olan teknoloji rüzgarını da arkasına alarak, yeni endüstri dallarının oluşmasına ve her alanda üretim miktarlarının ve ürün çeşitliliğinin artmasına yol açmıştır. Artan ürün çeşitliliği ve üretim miktarları, endüstriyel ürünlerin üretimi sırasında oluşan atıkların ve bu ürünlerin kullanımına bağlı olarak, evsel atıkların artmasına yol açmış ve özellikle evsel atıkların kimyasal kompozisyonunu değiştirerek, doğa için bir başka tehdit haline getirmiştir.

Günümüzde, dünyanın dört bir yanında, pek çok endüstri dalına ait tüketim ürünü satışa sunulmakta ve bu ürünlerin tamamının üretiminde, minimum maliyet ve maksimum raf ömrü hedeflenmektedir. Geniş kitlelerce tüketilen ve dolayısıyla oldukça fazla miktarlarda üretilen ürünlerin yapımında da aynı kriterlerin uygulandığı düşünüldüğünde, bu ürünlerin raf ömrünü uzatacak ve aynı zamanda maliyeti minimum oranda etkileyecek katkı kimyasalı ihtiyacı ve kullanım miktarının ne kadar fazla olduğu tahmin edilebilmektedir. Beslenme ve sağlık gibi birincil ihtiyaçlara yönelik tasarlanan ilaç, temizlik, gıda ve kozmetik ürünleri, yüksek miktarlarda üretilip tüketime sunulmaktadır. Ürünlerin yapımında kullanılan katkı kimyasalları, yoğun tüketime bağlı olarak, evsel atık kompozisyonunda yer bulmaktadır.

Üretimi yapılan ürünün bozulmasını engellemek ve raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan katkı kimyasalları, koruyucu kimyasallar olarak adlandırılmaktadır. Ürünün kokusu, rengi, pH'ı üzerinde minimum etkiye sahip olması ve her şeyden önce, antimikrobiyal etkiye sahip olması, koruyucu bir kimyasalın en önemli nitelikleri olarak belirtilmiştir. Bu kriterlerin tamamını yerine

getirebilen kimyasal grubu olan parabenler, koruyucu olarak en yaygın kullanıma sahip kimyasallardır (Soni et al., 2001). İlaç, kişisel bakım ürünleri, temizlik ürünleri ve gıda başta olmak üzere tekstil, deri, cam ve porselen endüstrilerinde kullanılan boya kimyasallarının yanı sıra, iç ve dış cephe boyalarında, sprey boyalarda ve kil hamurlarının üretiminde parabenlerin kullanılmakta olduğu belirtilmiştir (Eriksson et al., 2008). Buna ek olarak, parabenlerin hijyenik bez, banknot ve pekçok kağıt ürününde kullanıldığı bilinmektedir (Haman et al., 2015; Liao and Kannan, 2014).

Dünya genelinde paraben tüketiminin yıllık 8-10 bin ton olduğu bilinmektedir (Ramaswamy et al., 2011). 1987 yılında sadece kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin üretiminde kullanılan paraben miktarının 7000 kg olduğu belirtilmiştir (Soni et al., 2005; Brausch and Rand., 2011). EPA (Environmental Protection Agency) (2007)'nin verilerine göre 1986-2002 yılları arasında ABD'deki yıllık paraben üretim miktarları çizelge 1.1.'deki gibidir. En yaygın kullanıma sahip paraben türlerinden olan ve 60 yıldan fazla süredir, pek çok endüstri dalında kullanıldığı bilinen metilparabenin (Soni et al., 2001), 1986-2002 yılları arasında ABD'de en yüksek miktarda üretimi yapılan paraben türü olduğu görülmektedir. Ayrıca, metilparaben'in 2002 yılında Avrupa'daki tüketiminin 1000 tonun üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Carlsson et al., 2006).

Çizelge 1.1. EPA (2007)'ya göre 1986-2002 arasında ABD'de paraben üretim miktarları (ton)

	Metilparaben	Propilparaben	Etilparaben	Butilparaben
1986	>250 – 500	>5 – 250	>5 – 250	>5 – 250
1990	>500 – 5000	>250 – 500	>5 – 250	>5 – 250
1994	>500 – 5000	>250 – 500	-	>5 – 250
1998	>250 – 500	>5 – 250	-	-
2002	>5 – 250	>5 – 250	>5 – 250	-

İnsan vücuduna giriş yapan parabenlerin ana kaynağının, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri olduğuna işaret edilmiştir (Błedzka et al., 2014). Çin’de ve Danimarka’da, farklı marka ve çeşitli kategorilerdeki kişisel bakım ürünleri üzerinde yapılan çalışmalarda, ürünlerin neredeyse tamamının paraben içerdiği, en çok kullanılan paraben türünün metilparaben olduğu ve özellikle Çin’de üretilen ürünlerde, metilparabenin propilparaben’den yaklaşık 2, diğer paraben türlerinden ise yaklaşık 30 kat daha fazla miktarda kullanıldığı belirtilmiştir (Guo et al., 2014; Eriksson et al., 2008). Besin maddelerinde de oldukça yaygın ve yoğun miktarlarda kullanılıyor olması, vücuda giren paraben miktarını artırmaktadır. ABD, Avrupa ve Japonya’da metilparaben, propilparaben ve etilparaben için kabul edilebilir günlük alım miktarının 0-10 mg/kg vücut ağırlığı/gün aralığında olduğu açıklanmıştır (JECFA, 1974; SCF 1996; Suzuki et al., 1999). 1972 yılında, insanların ortalama günlük metilparaben alımına dair yapılan incelemelerde, 0-5 aylık bebeklerin günde ortalama 5 mg, 6-11 aylık bebeklerin 49 mg, 12-23 aylık çocukların 93 mg, 2-65 yaş arası insanların 222 mg metilparaben alımı yaptığı ve kg vücut ağırlığı başına düşen günlük ortalama metilparaben alım miktarlarının 0-5 aylık bebekler için 1 mg, 6-11 aylık bebekler için 6 mg, 12-23 aylık çocuklar için 8 mg ve 2-65 yaş arası insanlar için 4 mg olduğu açıklanmıştır (LSRO/FASEB, 1972). Vücut ağırlığı başına düşen günlük metilparaben alım miktarı hesaplamalarında, 2-65 yaş aralığındaki bireylerin ortalama vücut ağırlıklarının 60 kg olarak alınmasının, oldukça geniş bir aralığı kapsayan bu gruptaki bireyler için elde edilen sonuçların düşük çıkmasına yol açarak, yanıltıcı olabileceği ve bu geniş yaş aralığında değerlendirilen çocukların vücut ağırlıkları başına düşen metilparaben tüketiminin aslında çok daha yüksek bir sonuca işaret edebileceği belirtilmiştir (Soni et al., 2002). Elder (1984)’in yaptığı incelemelerde ise bebeklerin kg vücut ağırlığı başına düşen günlük paraben alım miktarının 1-16 mg, 2 yaşından büyükler için ise 4-6 mg olduğu belirlenmiştir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada ise, kişi başına düşen günlük paraben alım miktarının 1,06 mg/gün/kişi olduğu açıklanmıştır (Oishi, 2002; Ishiwata et al., 1999).

Tavşan, kedi, köpek, rat ve farelerin kullanıldığı çalışmalarda metilparabenin gastrointestinal sistemde tutularak metabolize olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda, kozmetik ürünlerinde bulunan parabenin, dermal yolla absorbe edilerek vücuda alındığı açıklanmıştır (Soni et al., 2002). İnsan vücuduna giriş yapan paraben miktarı, beslenmede uygulanan diyet ve kozmetik ürünü kullanımı sırasında ciltte absorbe edilen paraben miktarına göre değişmektedir (Soni et al., 2002). İnsan vücuduna giriş yapan paraben miktarının belirlenmesi amacıyla, idrar, serum ve meme dokusu örneklerindeki paraben seviyelerinin incelemeye alındığı

çalışmalar mevcuttur (Darbre et al., 2004; Frederiksen et al., 2011). İnsanlardan alınan idrar örneklerindeki paraben miktarları incelenerek, günlük ortalama paraben alım miktarları yaklaşık olarak belirlenmeye çalışılmıştır.

1995-2012 yılları arasında, yaşları 20-29 arasında değişen, eşit sayıda erkek ve kadından düzenli olarak alınan 24 saatlik idrar örneklerinde yapılan bir çalışmada, örneklerdeki paraben miktarları incelenmiş, tüm paraben tiplerine rastlanmakla beraber, metilparabenin en yüksek miktarda bulunan paraben türü olduğu ve metilparabenin üriner konsantrasyonunun 1995 yılından 2012 yılına kadar artış eğilimi gösterdiği belirtilmiştir (Moos et al., 2015). Ye ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada, ABD’de yetişkinlerden alınan idrar örneklerinde bulunan metilparaben konsantrasyonlarının medyan değeri 43,9 ng/ml olarak bulunmuştur. Smith ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında ise demografik veriler ile üriner konsantrasyonlar arasındaki ilişki incelenmiş, çalışma sonucunda metilparabenin en yüksek konsantrasyonlarda rastlanan paraben tipi olduğu, en yüksek paraben konsantrasyonlarının 155 µg/l medyan değeriyle kadınlardan alınan örneklerde bulunduğu belirtilmiştir.

Genuis ve ekibinin (2013) yürüttüğü bir çalışmada, Kanada’da toplanan idrar örnekleri incelenmiş ve paraben konsantrasyonları ile demografik veriler arasında ilişkilendirme yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucuna göre, hamile kadınlardan alınan örneklerdeki paraben konsantrasyonlarının, hamile olmayan kadınlardan alınan örneklerde ölçülen değerlerden daha düşük olduğu ve erkeklerden alınan örneklerde, kadınlara kıyasla daha düşük paraben konsantrasyonlarına rastlandığı açıklanmıştır. Wang ve arkadaşlarının (2013), Çin ve ABD’de çocuk ve yetişkinlerden alınan idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada, 6 paraben tipinin toplamının bulunuş frekansları ve üriner konsantrasyonları incelemeye alınmıştır. Yapılan bu çalışmada, Çin’deki çocuklardan alınan idrar örneklerinde, toplam paraben konsantrasyonlarının medyan değeri 10,1 ng/ml olarak bulunmuştur. İncelenen örneklerde bulunan paraben tiplerinden metilparabenin, 3,66 ng/ml’lik konsantrasyonla en yoğun olarak bulunan paraben tipi olduğu belirtilmiş, ikinci sırayı ise, 1,49 ng/ml’lik konsantrasyon ile propilparaben almıştır. Aynı çalışmada ABD’deki çocuklardan alınan idrar örneklerindeki toplam paraben konsantrasyonlarının medyan değerinin 54,6 ng/ml olduğu saptanmış ve 51,8 ng/ml’lik konsantrasyona sahip metilparabenin, bu total paraben konsantrasyonunun neredeyse tamamını oluşturduğuna dikkat çekilmiştir. Çin’de yetişkin bireylerden alınan idrar örneklerinde, 19,5 ng/ml’lik konsantrasyonla metilparaben, en yüksek konsantrasyonla bulunan paraben tipi olmuş; total paraben

konsantrasyonlarının medyan değeri 33,2 ng/ml olarak bulunmuştur. Ma ve arkadaşlarının (2013) yürüttüğü çalışmada, 41 kadın ve 68 erkek bireyden alınan idrar örnekleri incelenmiş ve çalışma sonucunda en yüksek konsantrasyona sahip olan paraben türünün, metilparaben olduğu açıklanmıştır. Çalışma sonucuna göre kadınlardan alınan örneklerde bulunan metilparaben medyan konsantrasyonu 10 ng/ml, erkeklerden alınan örneklerdeki metilparaben medyan konsantrasyonu ise 3,83 ng/ml olarak açıklanmıştır. Konu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise, Belçika'da toplanan idrar örnekleri incelenmiş ve metilparabenin en yüksek konsantrasyona sahip paraben tipi olduğu belirtilmiştir. Farklı yaş aralıklarının değerlendirilmeye alındığı çalışmada metilparaben konsantrasyonlarının medyan değerleri 1-6 yaş aralığı için 34,8 ng/ml, 7-11 yaş aralığı için 9,1 ng/ml, 12-19 yaş aralığı için 18,0 ng/ml, 20-39 yaş aralığı için 13,3 ng/ml, 40-59 yaş aralığı için 25,6 ng/ml ve 60 yaş ve üzeri için 13,0 ng/ml olarak bulunmuştur (Dewalque et al., 2014). Asimakopoulos ve arkadaşlarının (2014) Yunanistan'da toplanan idrar örnekleriyle yaptıkları çalışmada, paraben tiplerinin bulunuş frekansları ve konsantrasyonları incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, metilparaben bulunuş frekansı %100 olarak bulunurken, metilparabeni %87 ile etilparaben ve %72 ile propilparaben izlemiştir. En yüksek konsantrasyona sahip paraben tipi metilparaben olurken, medyan konsantrasyon değerinin 11,6 ng/ml olduğu belirtilmiştir. Watkins ve arkadaşlarının (2015) Porto Riko'lu hamile kadınlardan alınan idrar örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada, metilparaben konsantrasyonlarının medyan değeri 152 ng/ml olarak bulunmuş ve onu 45,4 ng/ml'lik medyan konsantrasyonuyla propilparaben takip etmiştir. Heffernan ve arkadaşlarının (2015) Avustralya'da yaptığı bir çalışmada, alınan idrar örneklerinde en yüksek metilparaben miktarına sahip olan yaş grubunun, 5-14 yaş aralığı olduğu ve bu gruba ait örneklerdeki metilparaben konsantrasyonlarının geometrik ortalamasının 552 ng/ml olduğu ve metilparabeni 107 ng/ml'lik geometrik ortalamayla propilparabenin izlediği sonucuna varılmıştır. Asimakopoulos ve arkadaşlarının (2015) Suudi Arabistan'da toplanan idrar örneklerinde ksenobiyotikler üzerine yaptıkları çalışmada, metilparaben konsantrasyonlarının medyan değeri 11,7 ng/ml olarak bulunmuştur ve 1,66 ng/ml'lik medyan değeriyle propilparaben, ikinci sırada yer almıştır. Jiménez-Díaz ve arkadaşlarının (2016) yürüttüğü bir çalışmada ise Tunus'lu kadınlardan alınan idrar örnekleri incelenmiştir. Alınan örneklerde propilparaben konsantrasyonlarının medyan değeri 3,06 ng/ml olarak bulunurken, metilparaben konsantrasyonlarının medyan değerinin 34,94 ng/ml olduğu belirtilmiştir. Tüm bu çalışmalarda kadın ve erkek bireylerden alınan örneklerdeki paraben konsantrasyonları arasında yüksek farklar

olmasının nedeni, kadınlarda kişisel bakım ve kozmetik ürünleri kullanımının çok daha yaygın olmasıdır (Moos et al., 2015; Biesterbos et al., 2013; Ma et al., 2013).

Frederiksen ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada ise Danimarka'lı 60 genç erkek bireyden alınan idrar örneklerinin yanı sıra, serum ve seminal plazma örneklerinde inceleme yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda benzilparaben hariç tüm paraben tiplerinin ölçülebilir seviyelerde olduğu ve ayrıca en yüksek konsantrasyona sahip paraben tipinin 17,7 ng/ml medyan değerine sahip olan metilparaben olduğu belirtilmiştir. Serum örneklerinde yapılan incelemede 1,53 ng/ml'lik medyan konsantrasyonuyla metilparabenin en yoğun bulunan paraben tipi olduğu belirtilmiştir. Seminal plazma incelemelerinde ise sonuç yine değişmemiş, 0,99 ng/ml'lik medyan konsantrasyonla metilparaben en yoğun olarak bulunan paraben tipi olmuştur.

Parabenler ile meme kanseri arasında bir ilişki olup olmadığı konusunda araştırmalar yapan Darbre ve arkadaşları (2004), kanserli meme dokusu örnekleri üzerinde çalışma yapmıştır. İncelemeye alınan örneklerde 20,6 ng/g'lık toplam konsantrasyonda parabenlere rastlandığı ve bu değer 12,8 ng/g'ını metilparabenin oluşturduğu açıklanmıştır.

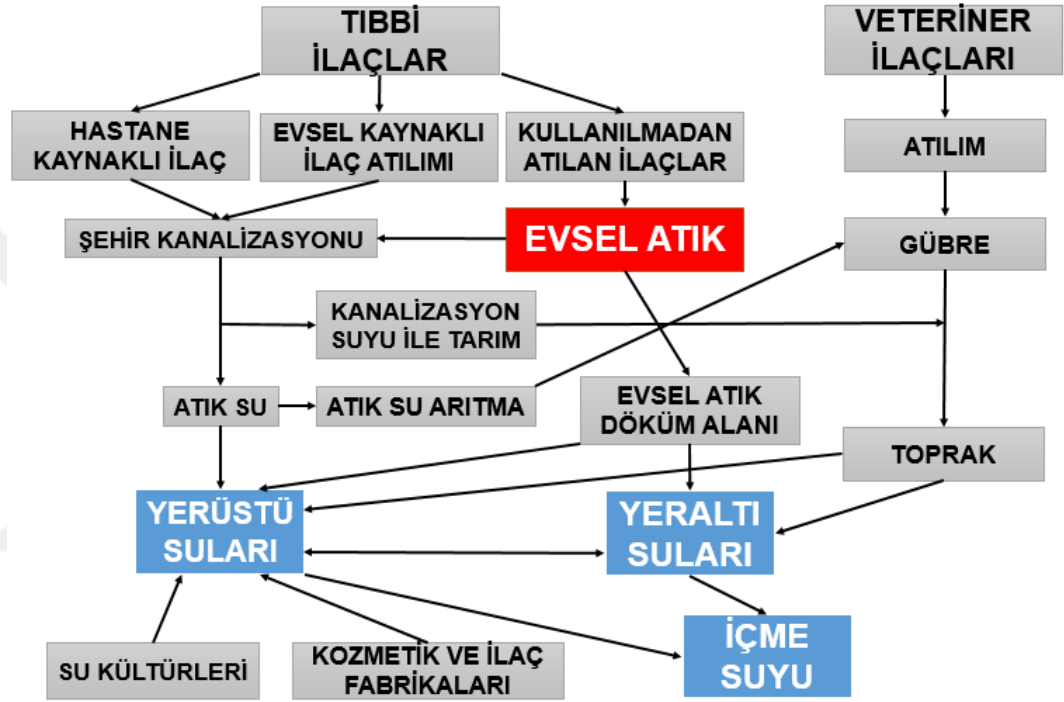
Dermal absorpsiyon ve beslenme dışında vücuda giriş yapan parabenlerin, aynı zamanda solunum yoluyla da vücuda alındığı belirtilmiş ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır (Guo et al., 2014).

Wang ve arkadaşları (2012), ABD, Çin, Kore ve Japonya'daki, ev ve ofis gibi kapalı alanlarda bulunan tozlardan aldıkları örnekleri incelemiş ve 6 paraben türünün yanı sıra, bunların hidrolizi sonucu oluşan p-hidroksibenzoik asitin varlığına rastlamıştır. Toz örneklerindeki paraben miktarlarından yola çıkılarak, solunum yoluyla vücuda giriş yapan paraben miktarları konusunda tahmini verilere ulaşmaya çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada, 4 ülkeden alınan toz örneklerinin tamamında parabenlere rastlanmış ve en yoğun olarak bulunan paraben türünün metilparaben olduğu belirtilmiştir. ABD'den alınan örneklerdeki metilparaben konsantrasyonlarının medyan değeri 760 ng/g olarak bulunurken, Çin'deki örneklerde bu değer 320 ng/g, Kore'deki örnekler için 1310 ng/g ve Japonya'dakiler için 1470 ng/g olarak belirtilmiştir. Bu değerlerden yola çıkılarak, kapalı alanda solunum yoluyla vücuda giriş yapan tahmini paraben miktarları belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, solunum yoluyla en fazla metilparabene maruz kalan bireylerin çocuklar olduğu ve kg vücut ağırlığı başına günlük tahmini

alım miktarları (ng/kg vücut ağırlığı/gün) ABD’li bebekler için 2,35; ABD’li 1-3 yaş arası çocuklar için 2,80; ABD’li 4-11 yaş arası çocuklar için 1,40; Çin’li çocuklar için 0,53; Kore’li çocuklar için 3,24 ve Japon çocuklar için ise 3,90 ng/kg va/gün olarak belirtilmiş ve kapalı alanlardaki tozlarda bulunan parabenlerin ana kaynağının, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri olduğunun altı çizilmiştir (Wang et al., 2012). Guo ve arkadaşlarının (2014) Çin’de yaptığı bir incelemede, parabenlerin üriner konsantrasyonlarından yola çıkılarak solunum ve beslenme yoluyla alınan tahmini paraben miktarları belirlenmeye çalışılmış ve günde 0,02 µg metilparaben ve 0,001 µg propilparabenin solunum yolu ile vücuda giriş yaptığı ileri sürülmüştür. Canosa ve arkadaşlarının (2006b) İspanya’da yaptığı bir çalışmada, toplanan toz örneklerinde ortalama 468 ng/g konsantrasyonda metilparabene ve 406 ng/g konsantrasyonda propilparabene rastlanırken, aynı ekibin 2007 yılına yaptığı çalışmada ortalama 667 ng/g konsantrasyonla metilparabene ve 404 ng/g konsantrasyonla propilparabene rastlanmıştır. Ramírez ve arkadaşlarının 2011’de yaptıkları çalışmada, ortalama 912 ng/g konsantrasyonda metilparabene rastlanmış ve onu 425 ng/g’lık ortalama konsantrasyonla propilparabenin izlediği belirtilmiştir. Rudel ve arkadaşlarının (2003) ABD’de yaptıkları çalışmada, toplanan toz örneklerinde 978 ng/g ortalama konsantrasyonlarda metilparaben bulunmuştur. 2010 yılında Fan ve arkadaşlarının tamamladığı çalışmada, Kanada’da iki farklı metotla evlerden toplanan toz örneklerinde 1080-1120 ng/g medyan konsantrasyonlarda metilparabene rastlanırken, 463-618 ng/g medyan konsantrasyonlarda propilparaben bulunduğu belirtilmiştir.

İdrar örneklerinde bulunan metilparabenin yaklaşık %86’sının doğrudan, bir kısmının ise hidrolize olarak p-hidroksibenzoik asite indirgediği, konjuge olduğu ve konjugatlarının idrar yoluyla 24 saat içinde vücuttan atıldığı belirtilmiştir (Soni et al., 2002). Bu durum, evsel atık kompozisyonuna paraben türlerinin de eklendiğini göstermektedir. Başta farmasötikler olmak üzere pek çok kimyasalın son durağı, sucul ekosistemler olmaktadır (Şekil 1.1). Yeraltı ve yüzey sularında, atık su artıma tesislerinin çıkış sularında ve hatta bazı ülkelerin içme sularında, varlıklarına rastlanan kimyasal türü ve miktarının her geçen yıl arttığı rapor edilmektedir (Corcoran et al., 2010; Heberer, 2002). Sucul ekosistemlere ulaşan farmasötiklerin ana kaynağı, ilaç tedavisi altındaki hastalardır ve tedavi boyunca kullanılan farmasötikler, insan vücudunda komple elemine olmadan/olamadan, ana bileşik ya da metabolitleri olarak vücuttan atılmakta ve evsel atıklar aracılığıyla sucul ekosistemlere giriş yapmaktadır (Heberer, 2002; Williams and Cook, 2007). Evsel atıkların yanı sıra, katı atık depolama alanlarında yağmur sularıyla topraktan süzülen kimyasallar ve kimyasal üreticilerinin atıkları, sucul ekosistemlere ulaşan

kimyasalların miktarını artırmaktadır (Corcoran et al., 2010; Bound and Voulvoulis, 2005). Dünya genelinde ilaç üretim ve tüketim miktarları, ülkelerin ekonomik statüleri, sağlık hizmeti gereksinimleri, yerel üretim kapasiteleri veyürürlüğe alınan yasal kısıtlamalar ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle farmasötik ilaç piyasası, gelişmiş ülkeler statüsündeki uluslar tarafından domine edilmektedir (Corcoran et al., 2010). Bu durum, gelişmiş ülke statüsündeki ulusların buldukları coğrafyalardaki yeraltı ve yerüstü sulara, daha fazla miktarlarda farmasötik ve metabolitlerinin bulunmasına yol açmaktadır (Corcoran et al., 2010).



Şekil 1.1. Heberer (2002)'e göre farmasötik ve tüm diğer kimyasalların çevresel dağılımı.

2000'li yılların başlarında, çok sayıda ülkede atık su, yeraltı ve yerüstü sularında yapılan çalışmalarda, $\mu\text{g/l}$ seviyelerinde 80'den fazla sayıda farmasötiklere ait aktif bileşenlere rastlandığı belirtilmiştir (Heberer, 2002). Sucul ekosisteme giriş yapan farmasötikler, diğer kimyasallardan daha kritik olan bir özelliğe sahiptir. Farmasötikler, fizyolojik fonksiyonları istenen doğrultuda değiştirebilecek özellikte tasarlanmışlardır ve giriş yaptıkları sucul ekosistemlerde birincil fonksiyonunun ve amacının dışında etkiler göstererek, olumsuz sonuçlara yol açmaktadır (Corcoran et al., 2010). Yapılan araştırmalarda, çok sayıda farmasötiklerin, su arıtma tesislerinde işlem gören çıkış sularında varlıklarını korudukları ve bulunış konsantrasyonlarının ng/L ile $\mu\text{g/L}$ aralığında olduğu belirtilmiştir (Trudeau et al., 2005). Bu durum, bazı farmasötik ve diğer kimyasalların yeraltı sularında (Hinkle et al., 2005; Domagalski et al., 2007),

okyanuslarda (Weigel et al., 2004), ve hatta içme sularında (Watts et al., 2007) her zaman bulunur durumda olmasını açıklamaktadır.

Su arıtma tesisine giriş yapan kimyasalların akıbeti konusunda 3 ana durum söz konusudur. Bunlardan ilkinde göre, söz konusu ksenobiyotik, su ve karbondioksit mineralize olarak son bulur (Richardson and Bowron, 1985). İkincisine göre, sucul ekosisteme giriş yapan kimyasal lipofilik yapıya sahip ise bozunmadan ortamdaki varlığını sürdürür. Son olarak, üçüncü duruma göre ise, söz konusu kimyasal metabolize olarak lipofilik halinden daha hidrofilik bir yapıya kavuşur ancak kalıcı özelliğini yitirmez ve böylelikle arıtma tesisini atlatarak, sucul ekosisteme yeniden giriş yapar (Halling-Sørensen et al., 1998; Richardson and Bowron, 1985). Bazı çalışmalarda parabenlerin atık su arıtma işleminde biyolojik filtrasyon aşamasında elemine olduğu belirtilmişse de (Haman et al., 2015; Andersen et al., 2007; Trenholm et al., 2008; Yu et al., 2011), parabenlerin atık su arıtma tesislerinde tam olarak elemine olmadığına; methyl protocatechuate (OH-MeP) ve ethyl protocatechuate (OH-EtP) gibi bileşiklerinin yanı sıra, parabenlerin hidroksilasyonu sonucu oluşan 4-hidroksibenzoik asit (4 HB) ve 3,4-dihidroksibenzoik (3,4 HB) asit gibi metabolitlerinin, atık su arıtma tesislerinin çıkış sularında varlıklarını koruduğuna işaret eden çalışmalar mevcuttur (Wang and Kannan, 2016).

Farmasötiklerin yanı sıra, gıda, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin formülasyonlarında bulunan parabenler, evsel ve endüstriyel atıklarla sucul ekosistemlere giriş yapan kimyasallar arasındadır. Üretiminde oldukça yaygın ve yoğun bir şekilde paraben kullanılan ürünlerin kesintisiz olarak tüketiliyor olması nedeniyle, parabenler ve metabolitleri evsel atıklar aracılığıyla sürekli olarak sucul ekosistemlere taşınmaktadır. Bu sürekli taşınım nedeniyle parabenler, biyobozunur özellikte olmalarına rağmen, sucul ekosistemlerde her zaman bulunur durumdadır (Haman et al., 2015; Moos et al., 2015).

Parabenlerin sucul ekosistemlerdeki bulunuşlarıyla ilgili ilk çalışma, 1996 yılında Paxéus tarafından yapılmıştır (Haman et al., 2015). Liao ve arkadaşlarının (2013) ABD, Japonya ve Kore'de belirlenen istasyonlardan aldıkları kanalizasyon çamuru ve sediment örnekleri üzerinde yürüttükleri çalışmada, ABD'den toplanan sediment örneklerinde 4,31, Japonya'dan alınan örneklerde 4,69 ve Kore'den alınan örneklerde 4,44 ng/g (kuru ağırlık) medyan konsantrasyonlar ile metilparabene rastlanmıştır. Kore'de atık su arıtma tesislerinden alınan kanalizasyon çamur örneklerinde ise 73,5 ng/g (ka)'lık medyan konsantrasyonlarda metilparaben

bulunmuştur. Aynı çalışmada total organik karbon içeriği ve paraben konsantrasyonları arasında kayda değer pozitif korelasyon gözlenmiş ve bunun, parabenlerin sedimentte organik maddeye tutunduğunun bir göstergesi olduğu belirtilmiştir. Zhang ve arkadaşlarının 2015'te Çin'in doğusundaki Sha Nehri üzerinde, hiçbir atık su arıtma tesisinin olmadığı bölgelerdeki 15 istasyondan aldıkları su ve sediment örnekleri incelemeye alınmıştır. Su örneklerinde 9,23 ng/L medyan konsantrasyonla metilparabene rastlanırken, bu değerlerin sediment örneklerinde 8,02 ng/g olduğu ve paraben türlerinden en yoğun konsantrasyona metilparabenin sahip olduğu belirtilmiştir. Albero ve diğerlerinin 2012 yılında İspanya'da yaptıkları çalışmada, Madrid'de bulunan 19 farklı atık su arıtma tesisinden alınan çamur örneklerinde 5,1-26,2 ng/g aralığında konsantrasyonlarda metilparaben bulunmuştur. Gorga ve ekibinin (2014) ise yine İspanya'da yürüttüğü bir çalışmada, Ebro Nehri havzasındaki atık su arıtma tesislerinden alınan çamur örneklerinde 360-751 ng/g aralığındaki ortalama konsantrasyonlarda metilparaben varlığı saptamıştır.

Metilparabenin atıksulardaki yarılanma ömrü 35.2 saat olarak bulunmuştur (González-Mariño et al., 2011). Parabenlerin biyodegradasyon sürelerinin, bağlı oldukları alkil zincir sayılarıyla ters orantılı olduğu ve metilparabenden daha uzun alkil zincirli yapıya sahip olan butilparabenin yarılanma ömrünün 9,6 saat, metilparabenden sonra en genel kullanıma sahip olan propilparabenin yarılanma ömrünün ise 20,3 saat olduğu belirtilmiştir (González-Mariño et al., 2011).

Paraben türlerinin $9,29 \times 10^{-5}$ - $1,86 \times 10^{-4}$ mm Hg aralığında değişen tahmini buhar basınçları, düşük uçucu özelliğe sahip olduklarını göstermektedir (DEPA, 2013). Bu nedenle, su yüzeyinden volatilizasyon yolu ile uzaklaşmaları beklenmemektedir (Haman et al., 2015). 7 ve üzeri pH'ta hidrolize olan parabenler, güçlü alkali solüsyonlarda, kendilerini oluşturan hidroksibenzoik asite indirgenmekte olduğundan, sucul ekosistemlerde hidrolize olması da beklenmez (Madsen et al., 2001). Tüm paraben türleri gibi metilparaben, aerobik koşullar altında kolayca biyobozunabilir özelliktedir (Haman et al., 2015; Hernández Leal et al., 2010). Anaerobik koşullarda kısmen bozunabilen parabenler arasında metilparaben, bu koşullarda en hızlı biyodegrade olabilen paraben türüdür (Madsen et al., 2001). Metabolitlerini karbon kaynağı olarak kullanmak için parabenleri fenol ve hidroksibenzoik asitlere indirgeme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar mevcuttur (Close and Nielsen, 1976; Valkova et al., 2001; Amin et al., 2010; Haman et al., 2015). Parabenlerin anaerobik şartlar altında izole bakteri suşu ile indirgenme prosesi iki adımdan oluşmaktadır; bunlardan birincisi,

p-hidroksibenzoik asit üretmek için ester bağlarının hidrolizasyonundan oluşmaktadır. İkinci adım ise, sonucunda fenol elde edilen bir dekarboksilasyon ile son bulmaktadır (Valkova et al., 2001). Parabenlerin halojenli türevleri, daha yavaş biyobozunma kinetikleri göstermektedir (Haman et al., 2015; González-Mariño et al., 2011).

Çevresel konsantrasyonların belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalarda, paraben konsantrasyonlarının mevsimlere göre değişim gösterdiği, kış mevsiminde akarsu ve lagün kanallarındaki artan debinin, akarsulardaki paraben konsantrasyonlarında az bir artışa neden olduğu (Jonkers et al., 2010), daha sıcak ve kuru geçen aylarda yapılan örneklemelerde ise paraben konsantrasyonlarının daha yüksek seviyelerde arttığı gözlemlenmiştir (Loraine and Pettigrove, 2006).

Carmona ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada atıksu arıtma tesislerinin giriş ve çıkış sularından alınan örneklerin yanı sıra, nehirden alınan örnekler, çeşme suyu örnekleri ve 11 farklı markaya ait şişelenmiş maden suları incelemeye alınmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, nehirden alınan 22 su örneğinin 17'sinde, ortalama 119 ng/L konsantrasyonla metilparabene rastlanırken; nehirden alınan 22 sediment örneğinin tamamında, ortalama 152 ng/g konsantrasyonla metilparaben bulunmuştur. 11 farklı markaya ait şişelenmiş maden suyu örneklerinin tamamında, ortalama 40 ng/L; 8 çeşme suyu örneğinin 6'sında ortalama 12 ng/L; atıksu arıtma tesislerinin giriş sularından alınan 21 örneğin tamamında ortalama 334 ng/L ve atıksu arıtma tesislerinde arıtma işleminden çıkan 11 su örneğinin tamamında ortalama 11 ng/L konsantrasyonlarla metilparaben bulunmuştur. Atıksu arıtma tesislerinin bazılarında parabenleri elemine etme işlemi %99,9 başarı gösteriyor olmasına rağmen parabenler, yeraltı ve yerüstü sularda varlık göstermektedir (Velegriki et al., 2015).

İnsan aktivitelerinin etkilerinin açıkça ortaya konduğu bir çalışmada, insan aktivitesinin olmadığı bölgeden alınan sediment örnekleri incelenmiş ve sedimentin paraben kontaminasyonuna uğramadığı belirtilmiştir (Viglino et al., 2011).

Çeşme sularında da varlığına rastlanan metilparabenin, İspanya'da yapılan bir çalışmada 40 ng/l konsantrasyonla bulunduğu tespit edilmiştir (Blanco et al., 2009). Almanya'da çeşme sularında yapılan bir çalışmada ise ortalama 17 ng/L konsantrasyonda metilparabene rastlanmıştır (Ferreira et al., 2011).

Portekiz’de denizel ortamda yapılan incelemelerde Ria de Aveiro lagününden alınan su örneklerinde ortalama 9,7 ng/L, Aveiro Limanı’ndan alınan örneklerde ortalama 13 ng/L, denize atıksu deşarjının yapıldığı bölgeden alınan örneklerde ortalama 9,9 ng/L ve nehir ağızından alınan örneklerde ortalama 26 ng/L konsantrasyonlarda metilparaben bulunduğu belirtilmiştir (Jonkers et al., 2010). Yamamoto ve arkadaşlarının (2011) yürüttüğü çalışmada, Japonya’nın Tenpozan Limanı’ndan alınan su örneklerinde 26 ng/L’lik konsantrasyonla metilparaben varlığı tespit edilmiştir. Liao ve ekibinin yaptığı çalışmada (2013) Tokyo Körfezi’nin iç kesimlerinden ve ve Tokyo Körfezi’nde bir estuarin bölgesi yakınından 1989-2011 yılları arasında düzenli olarak alınan sediment örnekleri incelenmiş, 1989 yılından 2011’e kadar sedimentteki paraben miktarının kademeli olarak artış gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada estuarin bölgesinden alınan örneklerde total paraben konsantrasyonu 2,88-46,2 ng/g (ka) aralığında değiştiği, iç körfezden alınan örneklerde bu aralığın 3,92-8,96 ng/g (ka) olduğu ve alınan örneklerin tamamında metilparabene rastlanıldığı belirtilmiştir. Metilparabene en yakın frekansa sahip propilparabenin bulunuş frekansının %39 olarak bulunmuştur.

Sucul organizmalar, çevrelerinde sürekli olarak bulunur durumda olan, maruz kaldıkları kimyasalları, vücutlarında biriktirme eğilimi göstermektedir (Kim et al., 2011). Filipinler’de Manila Körfezi’nden elde edilen 3 ayrı balık türünde (*Valamugil buehanani*, *Epinephelus corallicola*, *Mugil cephalus*) yapılan çalışmalarda balıkların kas dokularında paraben türlerine rastlanmıştır. Kas dokularında akümüle olan paraben türleri arasında metilparabenin açık ara farkla daha yoğun olarak bulunduğu belirtilmiştir (Kim et al., 2011). Yapılan bu çalışma sonucunda, *E. corallicola* türünün kas dokusunda bulunan metilparaben konsantrasyonu 3450 ng/g (lipid ağırlık) olarak bulunurken; *V. buehanani* türü için 2770 ng/g ve *M. cephalus* için 1000 ng/g olarak açıklanmıştır. Yine Filipinler’de yapılan bir başka çalışmada, Manila Körfezi’nden toplanan, 13’ü demersal olmak üzere 20 farklı türe ait bireylerin kas dokularında yapılan incelemede, bireylerin tamamının kas dokularında 3600 ng/g’a varan konsantrasyonlarda, başta metilparaben olmak üzere, paraben türlerine rastlanmış ve pelajik türlerin kas dokularındaki paraben birikiminin, daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ramaswamy et al., 2011). Jakimsa ve arkadaşlarının (2013), İspanya’da Akdeniz’e dökülen 4 nehirden toplanan 12 balık türü üzeride yaptıkları çalışmada, balık vücudundaki homojenatlarda, en yoğunu metilparaben olmak üzere paraben türlerine rastlanmıştır ve bulunan metilparaben konsantrasyonunun $84,69 \pm 6,58$ ng/g (ka) seviyelerinde olduğu belirtilmiştir. Xue ve ekibinin (2015) yürüttüğü bir çalışmada,

8 denizel memeli türüne ait karaciğer, yağ, böbrek ve beyin dokularından 129 örnek üzerinde araştırma yapılmış ve çalışma sonucunda parabenin cetacean türlerin dokularında birikim gösterdiği ve karaciğer dokularında 865 ng/g (yaş ağırlık)'a varan konsantrasyonlarda metilparabene rastlandığı açıklanmıştır. Bunun yanı sıra, parabenleri oluşturan p-hidroksibenzoik asitin de dokularda yüzlerce ng/g'lık konsantrasyonlarda biriktiği gözlemlenmiştir.

Memeli sınıftaki canlıların endokrin sistemini bozan, kanserli tümör, doğum kusuru ve gelişimsel bozukluklara yol açan kimyasallar, endokrin bozucu olarak adlandırılmaktadır. Sucul organizmaların dokularında birikim yapan ve hemen her ekosistemde bulunan parabenler, zayıf endokrin bozucu kimyasallar olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* denemeler sonucunda, parabenlerin östrojenik aktiviteye sahip oldukları ortaya konmuş (Boberg et al., 2010), benzer östrojenik yapıda kimyasallar olmaları nedeniyle, bir endokrin bozucu kimyasal sınıfı olan ksenoöstrojen bileşikler sınıfına dahil edilmiştir (Londoño et al., 2015; Vo et al., 2010). Geçmişte yapılan çalışmalarda, parabenlerin *Oryzias latipes* ve *Pimephales promelas* gibi türler üzerinde narkotik ve endokrin bozucu etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Zhang et al., 2015; Dobbins et al., 2009; Yamamoto et al., 2011).

Parabenler, diğer ksenoöstrojenler gibi, östrojen benzeri hareket edebilen kimyasallar oldukları için, meme, uterus gibi hedef dokularda ve bu dokuların işlevlerinde iyi ya da kötü yönde değişimlere neden olabilmektedir (Guadarrama et al., 2008). Paraben tiplerinden olan butylparabenin aktivitesinin, insan vücudunda doğal olarak bulunan bir östrojen formu olan estradiol aktivitesinden yaklaşık 10000–100000 kat daha düşük olduğundan, parabenler, zayıf östrojenik kimyasallar olarak nitelenmiştir (Routledge et al., 1998).

Sucul ekosistemlerde her zaman bulunur durumda olan metilparabenin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır.

Geçmişte yapılan çalışmalarda metilparabene 48 saat süreyle maruz bırakılan su piresi (*Daphnia magna*) üzerindeki denemelerde EC₅₀ değerinin 11,2–62 mg/L (Madsen et al., 2001; Kamaya et al., 2005; Terasaki et al., 2009; Dobbins et al., 2009); 72 saat süreyle maruz bırakılan yeşil alg (*Pseudokirchneriella subcapitata*) üzerindeki denemelerde EC₅₀ değerinin 91 mg/L (Madsen et al., 2001); 24-96 saat süreyle maruz bırakılan planarya (*Dugesia japonica*) üzerindeki denemelerde LC₅₀ değerinin 77-97 mg/L (Li, 2012); 15 dakika süreyle maruz bırakılan *Vibrio fischeri*

üzerinde EC₅₀ değerinin 5.9–9.6 mg/L (Velegraki *et al.*, 2015) olarak saptandığı belirtilmiştir.

Molins-Delgado ve ekibinin (2016), parabenlerin akut ve kronik toksisitelerini belirleme amacıyla yaptığı çalışmada, *Daphnia magna*, *Pimephales promelas*, *Tetrahymena thermophila*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leognathi* ve *Oryzias latipes* türleri test organizması olarak kullanılmış ve çalışma sonucunda, metilparabenin orta derece riskli bir kimyasal olduğu sonucuna varılmıştır. Metilparabenin akut toksisitesinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda *D. magna* türü için EC₅₀ değeri 24.6 mg/l, *T. thermophila* türü için 58 mg/l, *V. fischeri* türü için 10 mg/l, *P. leognathi* türü için 35 ve *O. latipes* türü için 63 mg/l olarak bulunmuştur.

Barse ve ekibinin (2010) test organizması olarak sazan (*Cyprinus carpio*) kullandığı çalışmalarda, metilparabene maruz bırakılan bireylerin kas ve karaciğer dokularında metilparaben biyoakümüülasyonu gözlemlendiği; parabene maruz bırakılan juvenil sazanların karaciğer ağırlığında ilk haftadan itibaren artış meydana geldiği; uygulanan en düşük paraben konsantrasyonunda (0,84 mg/L) dahi hepatosomatik indekslerde 1,5 kata kadar artış gözlemlendiği ve bu artışın, paraben konsantrasyonundan bağımsız olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, doza bağlı olarak, testiküler dokularda büyüme meydana geldiği, testislerde de paraben birikimi gözlemlendiği not edilmiştir. Vitellogenin üretiminde ise, doza bağlı olmadan 7-8 kat artış olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda metilparabenin solungaç, kas dokusu, testis, beyin ve karaciğerde birikim gösterdiği not edilmiş, 96 saatlik akut toksisite çalışması sonucunda EC₅₀ değeri 120 mg/l olarak bulunmuştur. Tüm bunların yanı sıra, endokrin bozucu kimyasallar olan parabenlerin, doza bağlı olarak, alkalik fosfataz ve alanin aminotransferaz enzimlerinin aktivitelerinde artışa, asit fosfataz ve aspartat aminotransferaz aktivitelerinde düşüşe yol açtığı belirtilmiştir.

Oncorhynchus mykiss'in test organizması olarak kullanıldığı bir başka çalışmada, 10 gün süreyle propilparabene maruz bırakılan bireylerin kas dokusu ve karaciğerlerinde, paraben birikimi olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, vitellogenin sentezinde artış olduğuna dikkat çekilmiş; propilparabenin gökkuşuğu alabalığı karaciğerindeki yarılanma süresinin 8,6, kas dokusundaki yarılanma süresinin ise 1,5 saat olduğu belirtilmiştir (Bjerregaard ve diğ., 2003).

Terasaki ve ekibinin (2009) yüttüğü bir çalışmada, parabenlerin klorlu bileşiklerinin çok daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır. *Daphnia magna*'nın test organizması olarak kullanıldığı çalışmada metilparabenin EC₅₀ değeri 62 mg/L olarak bulunurken, mono-klorlu metilparabenin EC₅₀ değeri 34 mg/L ve di-klorlu bileşiğinin EC₅₀ değeri 16 mg/L olarak bulunmuştur. *V. Fischeri*'nin test organizması olarak kullanıldığı çalışmada ise, metilparabenin EC₅₀ değeri 5.9 mg/L, mono-klorlu bileşiğinin EC₅₀ değeri 2.3 mg/L ve di-klorlu bileşiğinin EC₅₀ değeri 3 mg/L olarak bulunmuştur.

Arıtma tesislerindeki arıtma işlemlerine rağmen sucul ekosistemlerde her zaman bulunan parabenlerin endokrin bozucu kimyasallar olarak anılması ve doğa için tehdit unsuru oluşturmaya başlaması nedeniyle, yasal düzenlemeler yoluyla parabenlerin üretim ve kullanımına kısıtlama ve yasaklar getirilmiştir. Örneğin, Danimarka'da parabenin kozmetik ürünler de dahil olmak üzere tüm kişisel bakım ürünlerinde kullanımı, kanunlarla şartları belirlenen mevzuatlar ve yönetmeliklerce takip altına alınmıştır. Gıdalarda kullanımına ise, ülke genelinde uygulanan "gıda maddelerinde kullanımına izin verilen katkı maddeleri" listesinde belirtilen açıklamalar çerçevesinde izin verilmiştir. Kişisel bakım ürünlerinde, ürün ağırlığının maksimum %0,8'i kadar benzoik asit esterlerinden oluşan bileşiklerin koruyucu madde olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Formülasyonda kullanılan benzoik asitlerdeki ester sayısının artması durumunda, ürün ağırlığının maksimum %0,4'ü kadar kullanımına izin verilmiştir (Howlett, 1992; Rastogi et al., 1995; Soni et al., 2001; Soni et al., 2002; Eriksson et al., 2008). Farmasötiklerde kullanımı için ise; tatlandırıcı, koruyucu, renklendirici gibi yardımcı maddeler, ilgili yasalarca kontrol altında tutulmaktadır ve ürünlerde para-hidroksibenzoat ya da esterlerinin kullanılması durumunda, ürün ambalajında uyarı metni bulundurma zorunluluğu getirilmiştir (Eriksson et al., 2008). Bunların yanı sıra, Danimarka'ya ithal edilen gıda maddelerinin tamamı, sıkı denetim altında tutulmaktadır. Benzer yasal düzenlemeler İngiltere'de uygulanmaktadır.

Yüzlerce yıldır, kimyasalların çevresel risk analizleri ve toksisitelerinin belirlenmesi gibi çalışmaların da aralarında bulunduğu, gelişimsel biyoloji ile ilişkili pek çok çalışmada, deniz kestanesi gametleri kullanılmaktadır (Hagström and Lönning, 1973). Deniz kestanesinin fertilizasyonu ve gametlerini, gelişimsel biyoloji temelli çalışmalarda ilk kullanan Selenka (1878) ve Fol (1879) olmuştur (Hagström and Lönning, 1973).

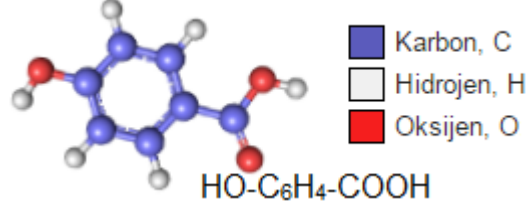
Deniz kestanelerinin denemelerde kullanılmaya başlanmasıyla, başka test organizmalarına kıyasla, deniz kestanelerinin avantajları ön plana çıkmaya başlamıştır. Her bir dişi deniz kestanesi, görünüş olarak birbirinin aynısı olan, yüksek ışık geçirgenliğine sahip ve %100 oranla döllenebilen, sonrasında yalnızca birkaç günde gelişerek larvaya dönüşen, milyonlarca yumurta vermektedir. Ayrıca, denemenin yapılacağı laboratuvar koşullarının kolaylıkla sağlanması, sağlanan şartların korunarak sürdürülmesi oldukça kolaydır. Test ortamında, sıcaklıkta ya da kimyasal kompozisyonda gerçekleşebilecek olası değişiklikler, larva üzerinde kolaylıkla farkedilebilir farklılaşmalara neden olduğundan, çalışma boyunca karşılaşılabilecek muhtemel soru işaretleri ortadan kalkmaktadır (Hagström and Lönning, 1973).

Çeşitli kimyasalların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla deniz kestanelerinin test organizması olarak kullanıldığı standardize edilmiş test metotları, günümüzde gelişimlerini halen sürdürmektedir ve bu test metodlarının kirleticilere karşı daha hassas sonuçlar verdiği bilinmektedir (Manzo, 2004; Kobayashi, 1984; Pagano et al., 1986; Clark et al., 2009).

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak, tez çalışmasında, yaygın kullanımı nedeniyle sucul ekosistemde sorun olduğu çeşitli sucul canlıları üzerinde yapılan araştırmalar ile gösterilmiş metilparabenin deniz kestanesi (*Arbacia lixula*) üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deniz canlıları üzerine metilparabenin toksik etkileri hakkında az bilgi olması ve erken yaşam evrelerindeki etkinin ekolojik önemi nedeniyle bu çalışmada *A. lixula* embriyolarının gelişimi üzerine toksik etkiler fertilizasyon başarısı, larval ve mitotik bozukluklar saptanarak ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Parabenlerin Genel Özellikleri



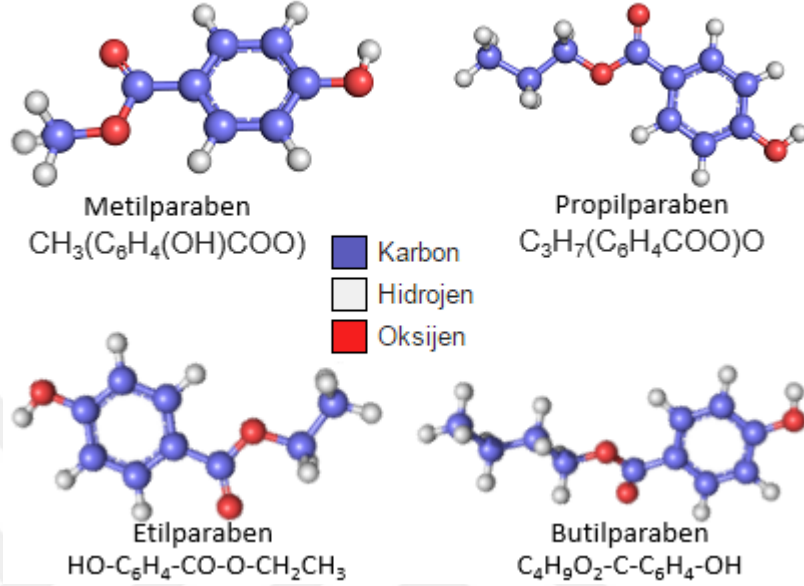
Şekil 2.1. p-hidroksibenzoik asit (http://edcs.unicartagena.edu.co/img/3d_img/CID_135.png Mayıs 2016).

Parabenler, diğer adıyla hidroksibenzoatlar; metil, bütül ve benzil gruplarıyla birleşen para-hidroksibenzoik asitin alkil ve aril esterlerinden oluşan kimyasallar grubudur (Canosa et al., 2006a; 2006b; Jonkers et al., 2010; Liao et al., 2013). Parabenleri oluşturan bileşiklerin, membran transport ve mitokondriyal fonksiyonlar gibi prosesleri inhibe eden, antifungal ve antibakteriyel özellikte olmaları nedeniyle ilaç, kişisel bakım ürünleri, temizlik ürünleri ve gıda başta olmak üzere birçok endüstri dalında, oldukça yaygın bir şekilde bakterisit ve koruyucu olarak kullanılmaktadır (Routledge et al., 1998; Canosa ve et al., 2006a; 2006b; Jonkers et al., 2010). Kokusuz ve renksiz olmaları, geniş pH aralığında stabil olmaları, antimikrobiyal özellikte olmaları ve suda yüksek çözünürlüğe sahip olmaları gibi, koruyucu bir kimyasalda olması gereken tüm kriterlere sahip olmaları nedeniyle parabenler, ideal birer koruyucu olarak nitelendirilirler (Soni et al., 2001). Saf formda parabenler kokusuz, tatsız, küçük, renksiz kristal ya da beyaz toz yapıda; higroskopik özelliktedir ve yüksek lipid/su katsayısına sahiptir. Havada stabil olan parabenler, suda ve asitli çözeltilerde hidrolize karşı dayanıklıdır. Alkil zincir uzunluğu arttıkça, hidrolize karşı dirençleri de artış gösterir (Soni et al., 2005).

Çizelge 2.1. Kullanımı en yaygın paraben tiplerinin genel kimyasal özellikleri (Elder, 1984)

	MeP	PrP	EtP	BuP
Kimyasal Formül	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
Moleküler Ağırlık	152,16	166,18	180,21	194,23
Erime noktası (°C)	131	116-118	96-98	68-69
Kaynama nok. (°C)	270-280	297-298	-	-
Kırılma indisi	1,525	1,505	1,505	-

Benzoik asitler, diğer adıyla parabenler, bağlı oldukları etil, metil, propil, benzil ve butil gibi ester gruplarına göre sınıflandırılırlar. Etilparaben, metilparaben, benzilparaben, propilparaben, iso-propilparaben, butilparaben ve iso-butilparaben olmak üzere 7 paraben türü bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Kullanımı en yaygın paraben tiplerinin moleküler şemaları(http://edcs.unicartagena.edu.co/img/3d_img/CID_7456,http://edcs.unicartagena.edu.co/img/3d_img/CID_7175.png, http://edcs.unicartagena.edu.co/img/3d_img/CID_8434.png, http://edcs.unicartagena.edu.co/img/3d_img/CID_7184.png, 29 Mayıs 2016).

Parabenler, gram pozitif bakteriler, küf ve mayalar üzerinde etki göstermekle birlikte, bakteriyel spor ve virüsler üzerinde düşük etkiye sahiptir (Haman et al., 2015). Parabenlerin antimikrobiyal aktivitesi, ester zincir sayıları ile artış göstermektedir ancak zincir sayısının artması, çözünürlüğü azalttığından; daha düşük ester zincir sayısına sahip paraben tipleri olan etil ve propilparaben, daha kullanışlı olmaları nedeniyle, özellikle gıda sektöründe daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Elder, 1984; Soni et al., 2001).

Parabenler, başta ilaç, kozmetik ve yiyecek/içecek endüstrileri olmak üzere çok sayıda endüstri dalında kullanılmaktadır (Soni et al., 2005; Mahuzier et al., 2001). İlaçlarda koruyucu olarak ilk kez 1920'li yıllarda kullanımına başlanan parabenler, antimikrobiyal özellikleri nedeniyle zamanla kişisel bakım ürünlerinin bozulmasını engelleme ve ürünlerin raf ömrünü uzatma amacıyla oldukça fazla miktarlarda kullanılmaya başlanmıştır; pekçok ürünün formülasyonunda en fazla bulunan organik madde haline gelmiştir (Velegriki et al., 2015).

Kozmetik endüstrisinde en yaygın kullanılan paraben türleri metilparaben ve propilparabendir (Soni et al., 2001; Berke et al., 1982). Nötr ve hareketsiz özellikte olan parabenler, üretimi hedeflenen son ürünün kokusu, rengi, akışkanlığı ve sertliği üzerinde hiçbir etkilerinin bulunmaması nedeniyle, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Soni et al., 2001; Neidig and Burrell, 1944). Bunların yanı sıra, düşük maliyetli ve sektör için yapılan düzenlemelerce kabul görmüş olmaları, koruyucu kimyasal olarak kullanımlarını yaygınlaştırmaktadır. Geniş pH ve sıcaklık aralığında kararlılıklarını korumaları nedeniyle, üretilen kozmetik ürünlerinin otoklavlanması sırasında, hidroliz sonucu antimikrobiyal aktivitelerinde kayda değer değişimler olmamaktadır. Tüm bu özellikleriyle parabenler, kozmetik sektörü için kusursuz koruyucu kimyasallar olarak nitelenmektedir (Soni et al., 2001; Maddox, 1982). Sektörde en sık kullanılan koruyucu sistem, propil ve metilparabenin kombinasyonundan oluşmaktadır (Soni et al., 2001; Jackson, 1992). Kozmetik ürünlerinin tamamında kullanılan bu iki paraben türünü içeren kozmetik formülasyon sayısı 13200'ün üzerindedir (Elder, 1984). 1995 yılında, sayıları 215'i bulan kozmetik ürünlerinde yapılan bir incelemede, ürünlerin %99'unda parabene rastlanmıştır (Prichodko ve diğ., 2009). Son yıllarda ise, koruyucu olarak %0.8'i bulan konsantrasyonlarda çeşitli paraben türlerini ve bu türlerin birleşimlerini bulunduran kozmetik ürünü sayısının 22000'i bulduğu tahmin edilmektedir (Andersen et al., 2007).

Benzoik asitler, 60 yılı aşkın süredir gıda sektöründe koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan paraben türü olan propilparaben, FDA tarafından güvenli olarak sınıflandırılmıştır ancak, ürünlerdeki kullanımına %0,1'lik kısıtlama getirilmiştir (Soni et al., 2001). Kahve özütü, alkollü içkiler, meyve suyu, sos, meşrubat, işlenmiş meyve/sebze, pişirilerek satılan ürünler, katı ve sıvı yağlar, baharatlar, tatlandırıcılar, turşular, konserveler, dondurulmuş süt ürünleri ve hazır gıdalarda, 450-2000 ppm aralığında paraben kullanılmaktadır (Daniel, 1986; Smolinske, 1992; Soni et al., 2002).

Parabenler ilaç endüstrisinde ilk olarak 1920'li yılların ortasında kullanılmaya başlanmıştır (Soni et al., 2005; Sabalitschka, 1930). Antibakteriyel ve antifungal özellikte olan parabenler, farmasötik preparatlarda koruyucu olarak genellikle %0.25'i bulan konsantrasyonlarda kullanılmaktadırlar (Sweetman, 2002; Carlsson et al., 2006). Fital, anestetik ilaçlar, göz banyosu ilaçları, hap, şurup, kilo artıran içecekler, enjekte-edilebilir solüsyonlar ve kontraseptiflerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde ürünlerdeki paraben konsantrasyonları, üründen ürüne değışiklik göstermekle birlikte, nadiren %1'i

aşmaktadır (Soni et al., 2005; Neidig and Burrell, 1944; Hassler, 1954; Boehm and Maddox, 1972; Orth, 1980). Reçeteye tabi olmayan pekçok üründe koruyucu olarak paraben tipleri bulunmaktadır. FDA (Food and Drug Administration)'ya bağlı Oftalmik İlaç Panel'i, oftalmik ilaçlarda metil ve propilparabenin mikroorganizmalara karşı etkili olacak konsantrasyonlarda kullanılması durumunda göze zarar verecek yapıda olacağından dolayı, söz konusu kimyasalların oftalmik ilaçlarda birbirlerinden ayrı olarak kullanılmasının uygun olmadığını rapor etmiştir. Propil ve metilparaben dış macunları, kontraseptifler, topikal analjezikler, derialtı, kas içi, damar içi, intra-artiküler, intrabursal, intralezyoner ve intrasinovyal enjeksiyonlarda, inhalasyon ve intranasal solüsyonlarda; oftalmik, oral ve topikal ilaçlarda, inaktif bileşenler olarak sınıflandırılmıştır (Soni et al., 2002; FDA, 1996).

2.2. Kimyasallar

Toksisitesin belirlenmesi için bu tez çalışmasında kullanılan metilparaben (CAS No. 99-76-3), Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır. 10 mg metilparaben 1 ml DMSO (CAS No. 67-68-5) içinde çözülmüş, 9 ml saf su ilave edilerek 1000 ppm'lik stok metilparaben solüsyonu hazırlanmıştır. Pozitif kontrol gruplarının her birinde, 300 µl 10⁻⁴ M CdCl₂ kullanılmıştır. DMSO kontrol gruplarında ise, en yüksek metilparaben konsantrasyonu uygulanan grupların bulunduğu polistiren kaplara eklenen metilparaben solüsyonunun 1/10'u kadar hacimde DMSO kullanılmıştır. Örnekleme yapıldığı bölgeden getirilen deniz suyu, çalışmalara başlamadan önce filtre kağıdı ile süzümüştür (FDS).

2.3. Deniz Kestanesinin (*Arbacia lixula*) Genel Biyolojik Özellikleri

Yüzey sularında, sediment örneklerinde, içme sularında, hayvan dokularında ve soluduğumuz havada en fazla miktarda bulunan paraben türü olan metilparabenin denizel canlılar üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, test canlısı olarak bir ekinoderm türü olan deniz kestanesi *Arbacia lixula* kullanılmıştır.

Ekinoderm, echinodermata filumuna dahil olan canlılara verilen genel isimdir ve Yunanca'da "dikenli" ve "deri/cilt" anlamlarına gelen "echinos" ve "derma" kelimelerinden türemiştir. Deniz kestaneleri de, echinodermata filumu üyesi olan canlılardır ve yeryüzünde yüzlerce tür ile temsil edilmektedir. Deniz kestaneleri, otlayarak gerçekleştirdikleri beslenme aktiviteleri nedeniyle buldukları ortamda

dominant durumdadır ve bu nedenle büyüme ve yaşamlarında oluşabilecek aksaklıklar, ekosistemin temelini sarsabileceğinden kilit öneme sahip canlılar arasındadır (Clark et al., 2009; Lawrence, 2007).



Şekil 2.3. Habitatında gece görüntülenen deniz kestaneleri (*A. lixula*)

Deniz kestanelerinin embryonik gelişimlerinden faydalanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan türler, çalışmanın yapıldığı coğrafyaya göre değişiklik göstermektedir. Çalışmanın yapıldığı coğrafyada hakim olan çevresel şartlara uyum sağlayan ve yayılım gösteren türler kullanıma alınmaktadır. Giudice (1973)'ye göre, çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan türler, Arbaciidae familyası üyesi olan *Arbacia lixula* ve *Arbacia punctulata*'dır. Bu tez çalışmasında da *Arbacia lixula* türü, test organizması olarak kullanılmıştır. *A. lixula* türünün sınıflandırılması aşağıdaki gibidir;

- Alem: Animalia
- Filum: Echinodermata
- Klasis: Echinoidea
- Ordo: Arbacioida
- Familya: Arbaciidae
- Genus: Arbacia
- Tür: *Arbacia lixula*

A. lixula türü Ege ve Akdeniz kıyılarında yaygın olarak dağılım göstermekle birlikte, Kuzey Afrika'nın Atlantik kıyılarında, bazı Atlantik adalarda ve Brezilya kıyılarında bulunmaktadır. Sığ sularda bulunan kayalık bölgeler, bu türün habitatını oluşturmaktadır (Gianguzza et al., 2014).



Şekil 2.4. *Arbacia lixula* türü deniz kestanesinin dağılım gösterdiği bölgeler
(<http://www.sealifebase.org/summary/Arbacia-lixula.html> 29 Mayıs 2016)

Beslenmeleri *Posidonia oceanica* başta olmak üzere makroalgler üzerinden gerçekleşmektedir (Privitera et al., 2011). Normalde siyah renkte olan *A. lixula* bireyleri, bulunduğu ortamdaki ışık şiddetine göre fizyolojik değişiklikler göstermekte ve rengi karanlıkta kahverengine dönmektedir (Binyon, 1972; Thomas and Thomas, 1965). Yetişkin bireylerin boyları 10-12 cm'yi bulabilmektedir. Boy frekans dağılımları incelendiğinde, stoğa yeni katılımın her yıl gerçekleşmediği farkedilmiştir (Privitera et al., 2011; Sala et al., 1998). Üreme dönemleri yılın tamamında görülüyorsa da, Güney Akdeniz'de yaz döneminde üremenin durduğu gözlemlenmiştir (Giudice, 1973). Güney Akdeniz dışındaki bölgelerde ise, özellikle Ağustos aylarında, *A. lixula* orijinli ekinopluteus larvalarında müthiş bir artış görüldüğü belirtilmiştir (Privitera et al., 2011). Türün termofili özelliği, özellikle sıcak yaz mevsimlerinden sonra *Arbacia* popülasyonunda aşırı bir artış görülmesi ile doğrulanmıştır (Privitera et al., 2011; Francour et al., 1994; Sala et al., 1998). Türün artan sıcaklığa karşı dayanıklılığı bir çalışmayla gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada denekler 35 °C'de birkaç saat boyunca yaşamlarını sürdürürken, 42 °C'ye alındıktan sonra 9 dakika için ölmüştür (Binyon 1972; Orr, 1955). Yine de artan sıcaklığa karşı dayanıklılık gösteren özelliği ile *Arbacia lixula*, yıllardır gündemdeki yerini koruyan ve dünyayı tehdit eden en büyük sorunların başında gelen küresel ısınma karşısında avantajlı konumdadır.

2.3.1. Üreme ve embryonik gelişim

A. lixula türünde üreme ve embryonik gelişme prosesleri, *A. punctulata* ve *P. lividus* türlerindeki gibi bir yol izlemektedir. *A. lixula* türünde yumurta çapı 79

µm'dir (Giudice, 1973). Yumurtalıkların olgunlaşması ile başlayan süreci, olgun, haploid ve döllenmemiş yumurtaların oluşumu takip eder. Yumurta ve spermlerin dış ortama bırakılmasıyla döllenme işlemi başlar.



Şekil 2.5. Dişi (soldaki) ve erkek (sağdaki) *A. lixula*

Döllenme sonrasında, döllenmiş yumurtanın etrafında fertilizasyon membranı, döllenme zarı ya da daha genel ismiyle perivitellin boşluk adı verilen hiyalin membran oluşur. İki pronükleinin birbirine yaklaşması ve sentrozomların eğimli bir çizgi oluşturmasının ardından ilk bölünme gerçekleşir ve sonucunda iki ayrı hücre meydana gelir.

İlk bölünmeyi takip eden bölünmeler ile 4, 8, 16 ve 32 hücreli safhanın ardından, altıncı bölünme sonrası, morula safhası başlamış olur. İnseminasyonun üzerinden 8-9 saat geçtikten sonra, yedi ve sekizinci bölünmelerin gerçekleştiği erken blastula safhası başlar ve onu yaklaşık 500 hücrenin bulunduğu mid-blastula safhası takip eder. Mid-blastula sonrasında blastula safhası başlar ve bölünmeler durur. Blastula safhasında enzimlerin devreye girmesiyle blastula, fertilizasyon membranını eriterek parçalar. Blastulanın döllenme zarı içerisinden çıkmasıyla yüzen blastula safhası başlamış olur.

Yüzen blastula safhası sonrasında erken gastrula safhası başlar. Erken gastrula safhası, vajetal kutuptaki hücrelerin, blastula içine doğru hareket etmesiyle başlamış olur. Vajetal hücrelerin blastula içine doğru yönelmesi, invajinasyon olarak adlandırılır. Gastrula safhasında iskelet oluşumu başlar. Gastrula safhasının sonunda larval eksen değişir, embryonun ovoid yapısı kaybolur ve embryo

poligonal bir görünüm kazanır. Bu noktada embryo, prizmayı andıran bir görüntüye sahiptir.

Prizma sonrasında embryo beşgen bir görünüm kazanır. Kolların çıkıntıları belirginleşmeye başlar ve sonrasında tamamen pluteus görünümü oluşur. Döllenmenin ardından ikinci günün sonunda daha uzun kollu bir yapıya bürünür. Döllenme sonrası 72. saat itibarıyla embryonal gelişim maksimum noktaya ulaşmıştır ve pluteus, beslenmeye başlamak üzeredir.

Döllenmenin gerçekleşmesinden sonra 11. günde metamorfoze olmaya devam eden larvada yeni bir çift kol oluşur. 21. Günde ise başkalaşım sürmeye devam etmektedir ve yeni bir çift kol daha gelişmiş olur (Mateyko, 1967).

2.4. Arazi Örneklemeleri

Evsel ve endüstriyel atıkların etkisi altında olmaması ve çevresel şartları bozan/kısıtlayan etmenlerin bulunmaması nedeniyle Seferihisar/Akarca bölgesi, biyodenemelerde kullanılacak canlıların toplanacağı bölge olarak tercih edilmiştir. Kaya ağırlıklı kıyısız yapısı ve iri taşlı substrata sahip olması nedeniyle Seferihisar, biyodenemelerde kullanılan tür için ideal bir yaşam alanıdır.

Arazi örneklemeleri, kasık çizmesi giyilerek gidilebilecek maksimum derinlikteki bireylerin toplanmasıyla gerçekleşmiş, laboratuvar ortamına mümkün olan en kısa sürede, buz kasetleri ile desteklenen soğutucu kutular içinde getirilmiştir. *Arbacia lixula*'nın tutunduğu kayadan sökülebilmesi için 4,5 kg gibi bir kuvvet uygulanmasının yeterli olduğu belirtilmiştir (Binyon, 1972; Märkel and Titschack, 1965). Örneklerin toplanması sırasında, bireylerin hasar görmemesi için hiçbir alet, araç ve gereç kullanılmamış, örnekleme işlemi el ile yapılmıştır. Deneme sırasında kullanılmak üzere, canlıların bulunduğu habitatından yaklaşık 20 litre kadar deniz suyu alınmıştır. Laboratuvar ortamına getirilen örnekler bekletilmeden denemeye alınmıştır.

3. BİYODENEMELER

Yapılan denemelerde Pagano (1986)'nın belirttiği metot esas alınmıştır. Laboratuvara getirilen canlılardan her biyodenemede kullanılacak tekrar sayısına göre erkek ve dişi bireyler ayrılmıştır. Erkek ve dişi bireylerden sperm ve yumurta elde etmek için, sivri uçlu makas ile aristo fenerinin etrafında dönülerek dış iskelet daire şeklinde kesilmiştir. İskeleti kesilen bireyler, kesik kısımları üste gelecek şekilde 50 ml'lik beherlerin üzerine konmuş ve dişi olanların üzerine filtre edilmiş deniz suyu (FDS) dökülerek, yumurtaları salması sağlanmıştır. Kesik kısımları üstte kalacak şekilde 50 ml'lik beherlerin üzerine bırakılan erkek bireylerin spermlerinin deniz suyu ile temas etmesi durumunda aktive olacağından, deniz suyu ile temas etmemesine özen gösterilmiş ve kuru bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Denemelerde yumurta ve sperm elde edilen dişi (soldaki) ve erkek *A. lixula*.



Şekil 3.2. *A. lixula* yumurta (soldaki) ve spermlerinin filtre edilme işlemi.

Spermilerin bulunduğu beherler buz kasetlerinin üzerinde bekletilmiş, o sırada yumurta eldesi sağlanan dişilerin yumurtaları, mikroskop altında incelenmiş ve sağlıklı yumurtalara sahip dişiler denemelere dahil edilmiştir. Bu işlemlerden sonra, her dişiden alınan yumurtalar 100 µm göz açıklığına sahip naylon filtreden; her erkekten alınan sperm örnekleri ise 30 µm göz açıklığına sahip filtreden ayrı ayrı süzülmüştür (Bkz. Şekil 3.2) (Oral, 1997). Her süzme işleminden sonra, yenisine başlamadan önce, naylon filtre FDS ile yıkanmıştır. Sperm örneklerinin süzüldüğü 30 µm'lik filtre ise, çeşme suyu ile yıkanmıştır (Oral, 1997).

Uygulanan biyodenemeler genotoksisite, embriyotoksisite ve spermiyotoksisiteyi oluşturan fertilizasyon başarısı ile döl kalitesi çalışmalarından oluşmaktadır.

3.1. Spermiyotoksisite

Spermiyotoksisite denemelerinde, toksisitesi üzerinde çalışılan kimyasalın artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan spermilerin, dişilerden alınan yumurtaları dölleyebilme başarısı gözlemlenmektedir. Çalışma, fertilizasyon başarısı ve döl kalitesi olmak üzere 2 ayrı procesten oluşmaktadır.

Her biri 6 tekrarlı olarak uygulanan spermiyotoksisite denemeleri için 6 erkek ve 6 diş birey kullanılmıştır. Çalışma başlamadan önce, içinde 30'ar ml FDS olan DMSO kontrol, negatif kontrol, pozitif kontrol ve spermeleri maruz bırakmak için 1, 2, 4, 8, 16 mg/l metilparaben bulunan test kapları hazırlanmıştır.

Denemenin başlangıcında konsantre kuru sperm örneklerinin her birinden 50 µl alınmış ve artan konsantrasyonlarda metilparaben içeren 50 ml FDS içine eklenmiştir. Bu şekilde spermier çeşitli konsantrasyonda metilparabene maruz bırakılarak 30 dakika süreyle aktive edilmişlerdir. 30 dakikalık sürenin ardından, aktive edilmiş olan sperm solüsyonlarından 100 µl alınarak, yukarıda sözü edilen önceden hazırlanmış 30 ml FDS içinde bulunan, mililitrede yaklaşık 50 yumurta olacak yoğunluktaki temiz, kimyasala maruz kalmamış yumurta içine bırakılmıştır.

3.1.1. Fertilizasyon başarısı

Spermin fertilizasyon başarısını belirleyen bu çalışmada, test kimyasalına maruz kalan sperm hücrelerinin, hiçbir kimyasala maruz kalmamış yumurtaları fertilize edebilme yüzdesi belirlenmektedir.

İnseminasyonun üzerinden 30 dakika geçtikten sonra zigot süspansiyonu, %10 formol ile fikse edilmiş ve 400x büyütmede ışık mikroskobu altında rastgele 100 yumurta/zigot sayılmış ve döllenmiş-döllenmemiş yumurta sayıları not edilmiştir. Sayımlarda, fertilize olan yumurtanın etrafında oluşan perivitellin boşluk ölçüt alınmıştır (şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Döllenmiş (alttaki) ve döllenmemiş *A. lixula* yumurtaları.

Fertilizasyon başarısının belirlenmesi fertilizasyon oranı (FO = % fertilize olan yumurta) belirleyici olmaktadır. Kimyasala maruz kalan gruplardaki fertilizasyon oranı (FO_{gözl}) ile, kimyasala maruz kalmayan negatif kontrol grubunun fertilizasyon oranları (FO_{kont}) karşılaştırılarak düzeltilmiş endeks (DE) hesaplanmıştır (Pagano et al., 1986).

$$DE = \frac{FO_{gözl} - FO_{kont}}{FO_{kont}} \times 100$$

3.1.2. Döl kalitesi

30 dakika süreyle toksikanta maruz kalan spermilerin, embryo oluşumunda yaratabileceği olası etkileri gözlemlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, döllenmeden 72 saat sonra embryoların bulunduğu deneme kaplarına K₂CrO₄ eklenerek embryoların hareket etmesi engellenmiş ve sonrasında ışık mikroskobu altında 400x büyütmede incelenmiştir. Işık mikroskobunda rastgele seçilen 100 adet embryo (zigot – larva da olabilir) sayılmış, embroyonik gelişim bozuklukları frekansı bulunarak, spermiyotoksik etki belirlenmiştir.

3.2. Embryotoksisite

Embryotoksisite denemeleri, fertilizasyondan 15 dakika sonra başlayan, embryogenesis boyunca süren ve fertilizasyondan 72 saat sonra başlayan pluteus larval safhasına kadar devam etmektedir. Embryotoksisite çalışmalarında,

embryolar, test kimyasalının artan konsantrasyonlarının bulunduğu kaplar içerisinde 72 saat süreyle maruz bırakılmaktadır ve bu sürenin sonunda, mikroskop altında rastgele 100 embryo sayılarak, embryonik gelişim bozuklukları frekansı bulunarak, test kimyasalının embryotoksik etki ya da etkileri belirlenir.

Embryotoksisite denemeleri, spermiyotoksisite denemelerinde olduğu gibi, 50 ml hacimli polistiren kaplarda gerçekleştirilmiştir. Her biri 6 tekrarlı olarak uygulanan embryotoksisite denemeleri için 6 erkek ve 6 dişi birey kullanılmıştır. Çalışma başlamadan önce, herbirinde 27 ml FDS olan;

- DMSO kontrol
- Negatif kontrol
- Pozitif kontrol

kapları ve 1, 2, 4, 8 ve 16 ppm metilparaben içeren test kapları hazırlanmıştır.

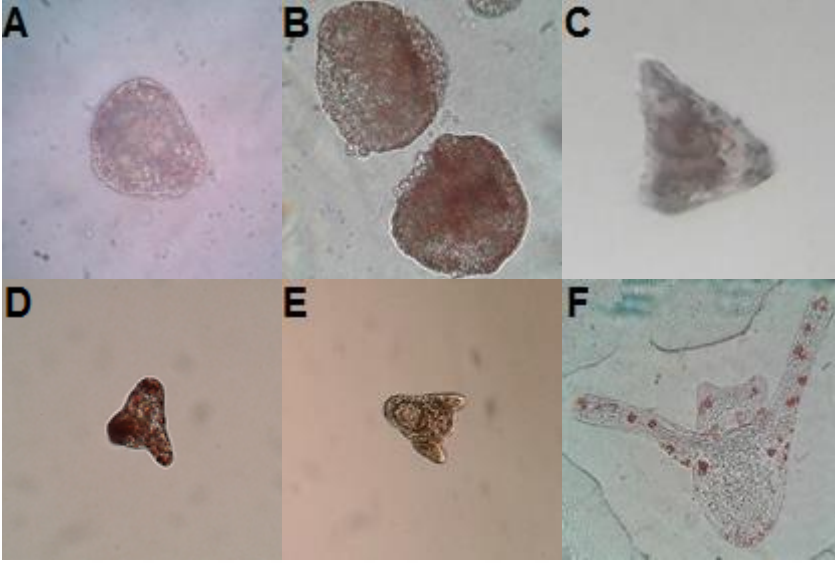
Fertilizasyon işlemi için, 20 µl sperm örneği alınarak 50 ml FDS içinde seyreltilmiş, bu solüsyondan 1 ml alınarak 250-300 ml FDS içindeki yumurtaların bulunduğu kaplara eklenmiş ve kaplar hafifçe karıştırılmış bu şekilde döllenmiş yumurtalar elde edilmiştir. Elde edilen zigot süspansiyonlarının her birinden 3 ml alınmış, önceden hazırlanan yukarıda içerikleri belirtilen polistiren kaplara eklenmiş ve her kaptaki embryo yoğunluğunun 30 embryo/ml olması sağlanmıştır. Sonrasında, 72 saat süreyle, $\pm 19^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. 72. saatin sonunda, inkübatörden çıkarılan deneme kaplarına K_2CrO_4 eklenerek, embryoların hareket etmeleri engellenmiştir. 400x büyütmede ışık mikroskopunda rastgele 100 embryodaki embryonik gelişim bozuklukları sayılmış ve test kimyasalının embryotoksik etkisi belirlenmiştir.

Embryotoksisite çalışmalarında, larval aşamalarda gözlemlenen ve embryotoksik etki olarak değerlendirilen ölçütler aşağıdaki gibidir;

- N: Normal pluteus (Şekil 3.4.)
- P1: Patolojik 1 – İskelet-sindirim sistemi bozuklukları görülen embryo
- P2: Patolojik 2 – Pluteus safhasına ulaşmamış embryo
- R: Retardasyon – Normal bir pluteusun yarısı büyüklüğünde embryo
- D: Ölü – Ölü larva/embryo



Şekil 3.4. Normal pluteus.



Şekil 3.5. Embryonik gelişim bozuklukları; A-B: Gastrula safhasında kalan embryo, C: Prizma safhasında kalan embryo, D-E-F: Larval aşamada görülen gelişim bozuklukları.

3.3. Genotoksisite

Giriş kısmında da belirtildiği gibi, deniz kestanelerinin embryonik gelişimini konu alan biyolojik çalışmaların yüzlerce yıl öncesine dayanmasının ve günümüzde halen yaygın bir şekilde kullanılıyor olmasının temel nedenlerinden biri, dişi deniz kestanelerinden yüksek ışık geçirgenliğine sahip milyonlarca sayıda yumurta alınabiliyor olmasıdır. Ancak bu durum *Arbacia lixula* türü için geçerli değildir.

Arbacia yumurtaları ve 6 saatlik embryoları, kırmızının oldukça koyu ve yoğun bir tonuna sahiptir. Bu durum, sitotoksisite çalışmalarında, kromozomların boyanıp mikroskop altında görüntülenmesini engellemekte, hatta imkansız kılmaktadır. Bu çalışmada, literatürde belirtilen (Pagano et al., 1986) fiksasyon metodu modifiye edilerek, 6 saatlik embryonun dekolorizasyonu için fiksatif olarak etanol-asetik asit (1:1 v:v) kullanılmıştır. Böylelikle, hücresel seviyedeki toksikant

kaynaklı değişiklikler, ışık mikroskobu altında görülebilmektedir. Bu şekilde literatürde daha önce hiç yapılmamış olan *A. lixula* türünde genotoksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma başlamadan önce, herbirinde 27 ml FDS olan;

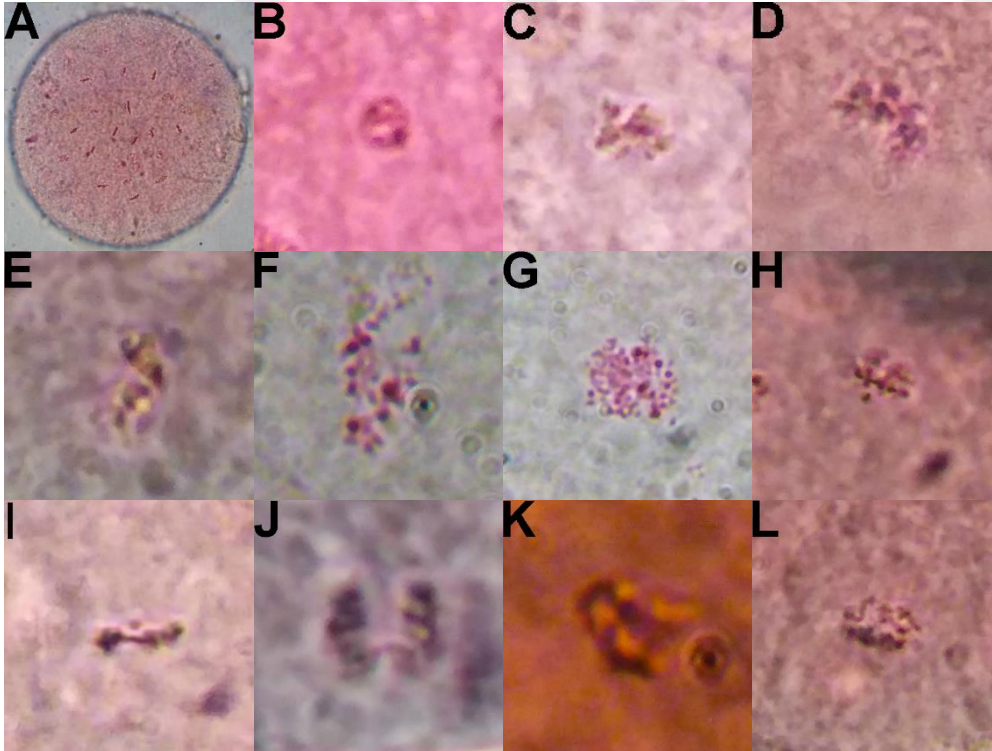
- DMSO kontrol
- Negatif kontrol
- Pozitif kontrol

kapları ve 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ppm metilparaben içeren test kapları hazırlanmıştır.

Genotoksisite çalışmalarında *A. lixula*'nın kültüre alınma prosesi, embryotoksisite başlığı altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir ancak örnekler inkübasyonda 6 saat kadar tutulmuş, sonrasında etanol-asetik asit (1:1 v:v) solüsyonu ile fikse edilmiştir. Fiksasyondan 24 saat sonra fiksatif değiştirilmiş ve mikroskop altında yapılan gözlemlere kadar fiksatif içinde beklemiştir. Embryolar asetokarmin ile boyandıktan sonra, test kimyasalının sitotoksik etkisinin belirlenmesi için, ışık mikroskobu altında, immersiyon yardımı ile, 1500x magnifikasyonda, rastgele 30 embryodaki mitotik aberasyonlar sayılmıştır. Genotoksisite çalışmalarında, fertilizasyon sonrası 6 saatlik periyotta embryolarda gözlemlenen ve sitotoksik etki olarak değerlendirilen ölçütler çizelge 3.1.'de belirtilmiştir. Ölçüt alınan mitotik bozukluklardan düzensiz profazın belirlenmesinde Hidalgo et al., 1975, Tadesco et al., 2012, Kahattb et al., 2015; düzensiz metafazın belirlenmesinde Nordlander and Edwards., 1969; Tadesco et al., 2012; Rocha et al., 2015; diğer mitotik bozuklukların belirlenmesinde ise Pagano 1986, Kalcheva et al., 2009, Renjana et al., 2013 ve Kahattb et al 2015'de belirtilen mitotik bozukluklar baz alınmıştır. Morfolojik bozuklukların frekansı belirlenirken, interfazda kalan embryolar değil, sadece aktif mitoz görülen embryolar dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.1. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesinde kullanılan ölçütler (Nordlander and Edwards., 1969; Hidalgo et al., 1975; Pagano 1986, Kalcheva et al., 2009; Tadesco et al., 2012; Renjana et al., 2013; Kahattb et al 2015; Rocha et al., 2015).

Sayısal Ölçüt	Morfolojik Ölçüt
a) Embryo başına düşen mitoz sayısı = EDM	a-) Embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk = TMB Düzensiz Profaz Düzensiz Metafaz Laggard ve Anafaz Köprüsü
b) İnterfaz Embryo Yüzdesi = %E	Kırık Kromozom (=Fragmentasyon) Vagrant Koromozom (Serbest Kromozom) Multipolar (Çok Kutuplu Mekik)
c) Metafaz/Anafaz Oranı = M/A	b) >1 mitotik bozukluğa sahip embryo yüzdesi = %E (+mb)



Şekil 3.6. Dekolorizasyon ve asetokarmin boyama sonrası bir embryo (A) ve mitotik aberasyonlar (A-L); B-C Düzensiz profaz, D-E Düzensiz metafaz, F-G Fragmentasyonlu kromozom, H-I Vagrant kromozom, J-K Anafazda köprü ve laggard, L Multipolar kromozom.

3.4. İstatistik

Biyodenemelerin tamamlanması ile elde edilen veriler istatistiksel olarak incelenmiştir.

Fertilizasyon başarısı çalışmasında kontrol grubu ile diğer gruplar arasında gözlenen farklılıklar One-Way ANOVA varyans analizi ile test edilmiştir. Embryonik bozukluklar üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen verilere student's t test uygulanmıştır. İstatistik çalışmalarında Statgraphics Centurion XVI kullanılmış ve tüm istatistiksel çalışmalarda $\alpha = 0.05$ olarak alınmıştır. EC₅₀ hesaplamalarında, EPA'nın Benchmark Dose Software programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Spermotoksosite Bulguları

Spermotoksosite çalışmalarında, spermelerin maruz bırakılan metilparaben konsantrasyonuna bağlı olarak dölleme başarısında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Fertilizasyondan 72 saat sonra larval aşamalarındaki gelişim bozukluklarında da benzer sonuçlar alınmıştır.

4.1.1. Fertilizasyon başarısı bulguları

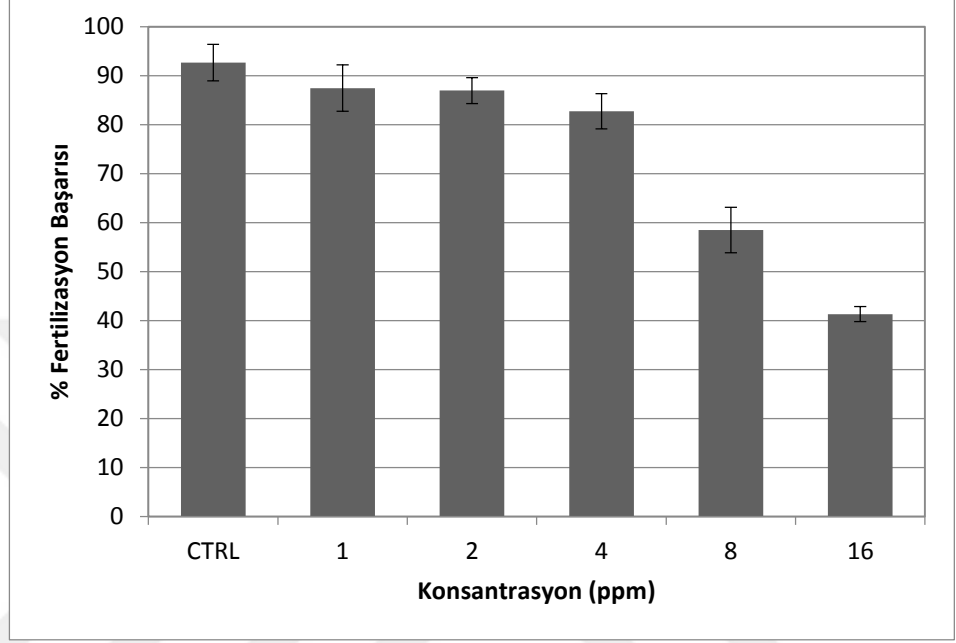
A. lixula yumurtalarının aşırı koyu renkte olması ve fertilizasyondan sonra oluşan perivitellin boşluğunun, *P. lividus* türünün zigotlarında görülen boşluktan çok daha küçük çaplı olması nedeniyle, inseminasyondan sonra bekleme süresi 15 dakika yerine 20 dakika tutulmuştur. Böylelikle, ikili bölünmeye geçen embryolar sayesinde, sayım sırasında zigot-yumurta arasında kalınabilecek ikilemler en aza indirgenmiştir. Fertilizasyon başarısı çalışmasının sonuçları çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Dölleme başarısı çalışmalarında 30 dakika süreyle belirtilen konsantrasyonlarda metilparabene maruz bırakılan spermelerin fertilizasyon oranları (%FO) ve düzeltilmiş endeksleri (DE). p değeri, ANOVA testindeki önemlilik derecesidir.

İşlem	Kons.	%FO	DE	p
Negatif Kontrol		92.71 ± 3.71		
Pozitif Kontrol (CdCl₂)		0	-100	
DMSO Kontrol		88.25 ± 4.99	-2.18	<0.001
Metilparaben	1 ppm	87.5 ± 4.73	-3.01	<0.05
	2 ppm	87 ± 2.65	-6.61	<0.05
	4 ppm	82.75 ± 3.59	-8.28	<0.001
	8 ppm	58.5 ± 4.65	-35.16	<0.001
	16 ppm	41.33 ± 1.53	-59.26	<0.001

Dölleme başarısının metilparaben konsantrasyonu artışı ile doğrusal bir azalma gösterdiği görülmektedir ancak bu artış 8 ppm'lik konsantrasyon ile önem kazanmaktadır. Fertilizasyon başarısı oranlarına bakıldığında, kontrol grubu için bu

oranın $92,71 \pm 3,71$ olduğu görülmektedir. 16 mg/l metilparabene maruz bırakılan spermilerin kullanıldığı grupta bu oranda yarı yarıya bir azalma görülmüş ve ortalama $41,33 \pm 1,53$ olarak bulunmuştur. Yapılan fertilizasyon başarısı çalışması sonucu elde edilen verilere göre, *A. lixula* için EC_{50} değeri 12,89 mg/L olarak hesaplanmıştır.



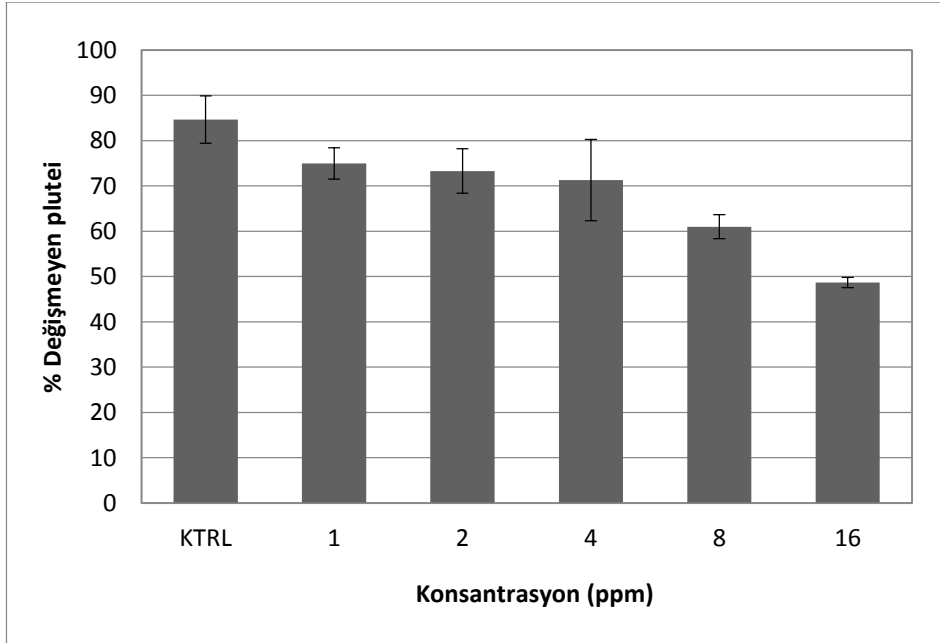
Şekil 4.1. Metilparabenin fertilizasyon başarısı üzerine etkisi.

4.1.2. Döl kalitesi bulguları

Metilparabenin *A. lixula* spermi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, artan metilparaben konsantrasyonu ile gözlenen fertilizasyon başarısındaki düşüşün yanı sıra, fertilize olan yumurtaların embryonik periyotlarında gelişim bozukluklarına rastlanmıştır. Kontrol grubunda gözlenen toplam gelişim bozukluğu sayısı ortalama $15,33 \pm 6,64$ olurken, bu sayı doza bağlı olarak artış göstermiş ve en yüksek toksikant konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta $53,33 \pm 9,63$ 'e ulaşmıştır. Metilparabenin *A. lixula* sperminin kalitesi üzerindeki etkileri, çizelge 4.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. 30 dakika süreyle metilparabene maruz bırakılan *A. lixula* spermi ile elde edilen embriyolarıda, fertilizasyondan 72 saat sonra gözlenen toplam gelişim bozuklukları ortalamaları (\pm standart hata): P1: Sindirim sistemi ve iskelet bozuklukları; P2 larval aşamaya geçemeyen embryo; p, student's t testinin önemlilik derecesi.

Madde	Kons.	P1	P2	P1+P2	p
Negatif Kontrol		10.89 \pm 3.55	4.44 \pm 3.09	15.33 \pm 6.64	<0.005
Pozitif Kontrol (CdCl₂)		49.33 \pm 6.81	8.33 \pm 6.35	56.14 \pm 13.16	<0.005
DMSO Kontrol		21.67 \pm 6.66	1.66 \pm 2.08	23.33 \pm 8.74	<0.005
Metilparaben	1 ppm	17 \pm 2.65	8 \pm 5.57	23 \pm 8.22	<0.005
	2 ppm	22.67 \pm 5.51	4 \pm 3	26.67 \pm 8.51	<0.005
	4 ppm	25.33 \pm 7.77	3.33 \pm 2.08	28.66 \pm 9.85	<0.001
	8 ppm	38 \pm 3.61	1 \pm 1	39 \pm 4.61	<0.001
	16ppm	50 \pm 7.55	3.33 \pm 2.08	53.33 \pm 9.63	<0.001

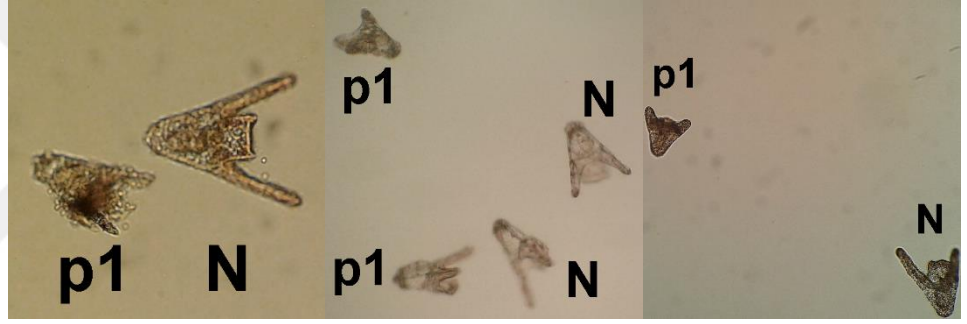


Şekil 4.2. Metilparabene maruz bırakılan spermlerin döl kalitesinde görülen değişmeyen plutei sayısı-metilparaben konsantrasyonu ilişkisi (Aritmetik ortalama \pm standart hata).

Metilparabenin artan konsantrasyonlarına maruz kalan *A. lixula* spermelerinin dölleme başarısı ve döl kalitesinin olumsuz yönde etkilendiği, şekil 4.2.'de görülmektedir. 72 saatlik çalışma sonucunda, 16 ppm'lik konsantrasyonda metilparabene maruz bırakılan spermelerin kullanıldığı grupta, embryonik gelişim bozukluğu görülmeyen, sağlam ekinoplutei sayısı, kontrol grubundaki sayının yarısı kadardır. Yapılan döl kalitesi çalışması sonucu elde edilen verilere göre, *A. lixula* için EC₅₀ değeri 13,55 mg/L olarak hesaplanmıştır.

4.2 Embryotoksisite Bulguları

Embryogenezis boyunca 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda metilparabene maruz bırakılan *A. lixula* embryolarında toksikantın etkilerini belirlemek için iskelet ve sindirim sistemi bozuklukları görülme sıklıkları dikkate alınmış ve embryotoksik etkiler, çizelge 4.3.'de özetlenmiştir.

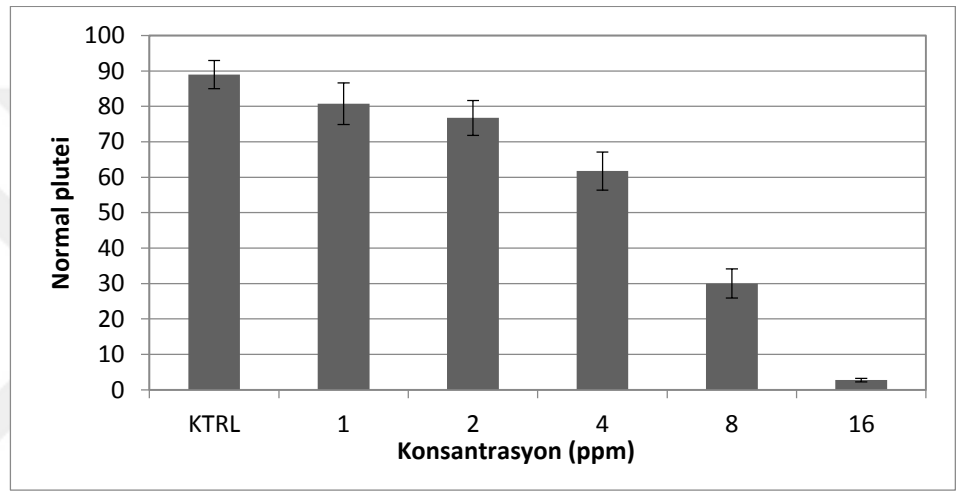


Şekil 4.3. Normal(N) ve patolojik 1(p1) ekinopluteus larvaları.

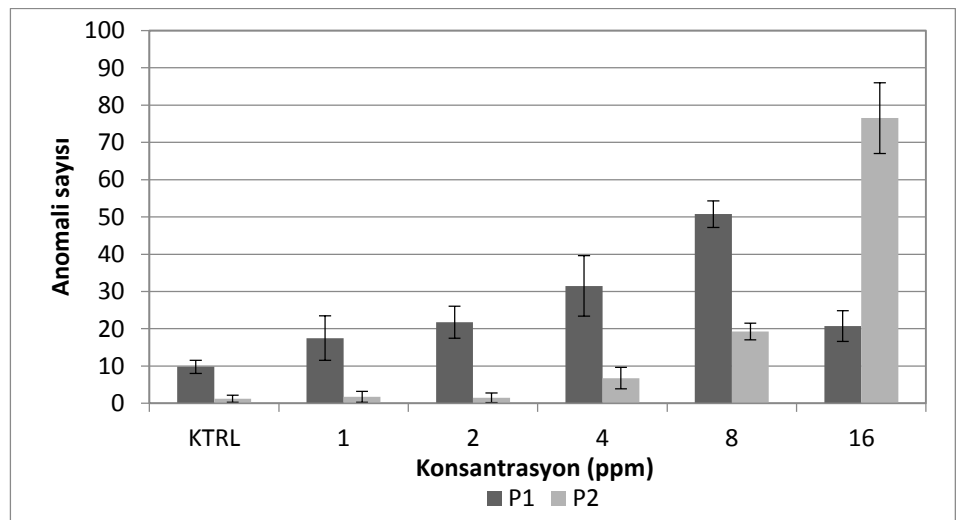
Çizelge 4.3. Embriyogenez süresince metilparabene maruz kalan *A. lixula* embriolarında görülen larval gelişim bozuklukları. N: normal, P1-patolojik 1, P2-patolojik 2, R-cüce, D-ölü ve p student's t testinin önemlilik derecesi.

Madde	Konsantrasyon	N	P1	P2	P1+P2	p
Negatif Kontrol		89±3,97	9,78±1,79	1,22±0,97	11±3,97	<0.005
Pozitif Kontrol (CdCl₂)		0	0	100	100	<0.005
DMSO Kontrol		82±2,94	16±1,83	2±0,81	18±2,94	<0.005
MeP	1 ppm	80,75±5,91	17,5±5,97	1,75±1,5	19,25±5,91	<0.005
	2 ppm	76,75±4,92	21,75±4,27	1,5±1,29	23,25±4,92	<0.001
	4 ppm	61,75±5,38	31,5±8,1	6,75±2,87	38,25±5,38	<0.001
	8 ppm	30±4,08	50,75±3,59	19,25±2,21	70±4,08	<0.001
	16ppm	2,75±0,5	20,75±4,11	76,5±9,47	97,25±0,5	<0.001

72 saat süreyle metilparabene maruz bırakılan embryoların larval aşamadaki gelişimsel bozukluklarının, toksikant konsantrasyonuyla artış gösterdiği görülmektedir. Patolojik 1 olarak sınıflandırılan sindirim ve iskelet sistemi bozuklukları, 8 ppm'lik toksikant konsantrasyonuna kadar artış göstermiş ve bu artış, 16 ppm konsantrasyonda toksikanta maruz bırakılan gruptaki larval safhaya geçebilen embryo sayısındaki keskin düşüş nedeniyle son bulmuştur. Dolayısıyla, en yüksek konsantrasyonun uygulandığı grupta p1 sayısındaki azalmaya karşılık, p2 sayısında artış olmuştur. Gelişimsel retardasyona uğramış (cüce) ve ölü ekinopluteusa rastlanmamıştır. Yapılan embryotoksisite çalışması sonucu elde edilen verilere göre, *A. lixula* için EC₅₀ değeri 8,49 mg/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. 72 saat metilparabene maruz bırakılan *A. lixula* embryolarından sağlıklı olarak larval aşamaya geçebilen birey sayıları ve toksikant konsantrasyonu ilişkisi.



Şekil 4.5. 72 saat süreyle metilparabene maruz bırakılan *A. lixula* embryolarında görülen embryonik bozukluklar ile toksikant konsantrasyonu ilişkisi.

4.3 Genotoksisite Bulguları

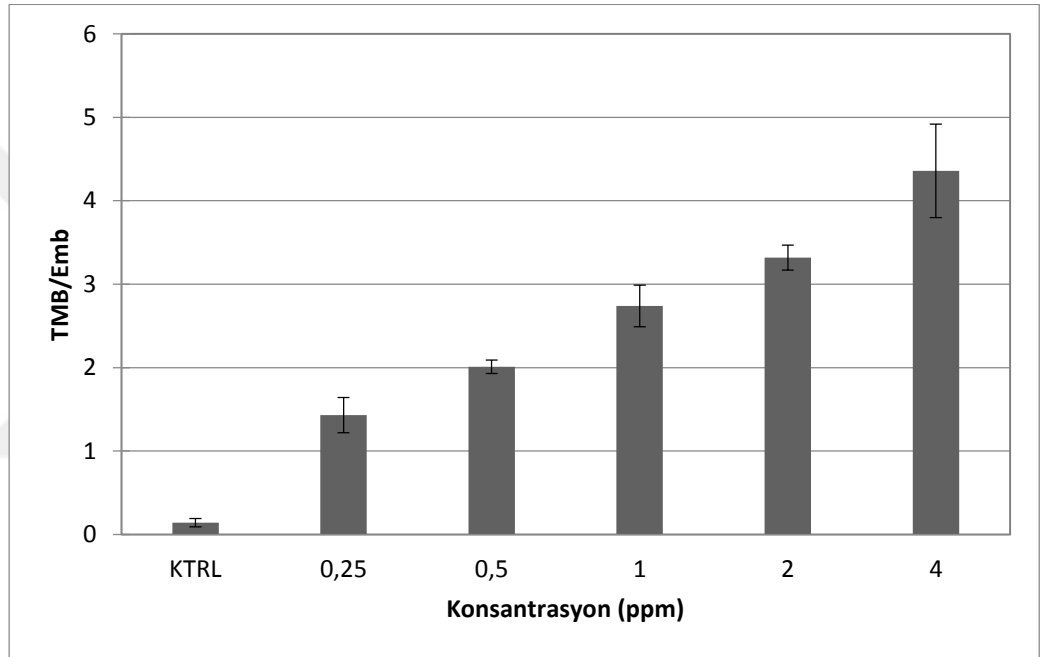
Fertilizasyondan sonra 6 saat süreyle metilparabene maruz bırakılan ve sonrasında etanol-asetik asit karışımı ile fikse edilen embryolardaki mitotik aberasyonlar, 1500x magnifikasyonda, immersiyon yardımı ile, ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler çizelge 4.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Sitotoksisite çalışmalarını sonucu elde edilen sayısal veriler. TMB/Emb: embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk; %IE: interfaz embryo yüzdesi; M/A metafaz/anafaz oranı; M/Emb: embryo başına düşen mitoz sayısı; ■ = p<0,05; ▼ = p<0,005; □ = p<0,001

İşlem	Kons.	TMB/Emb	%IE	M/A	M/Emb
Neg. Ktrl.		0,14±0,05■	10,56±7,88	3,88±0,61▼	13,43±0,17□
Pozitif Kontrol (CdCl₂)		0	100	-	7,77±0,63▼
DMSO Ktrl.		0,24±0,05	13,33±8,81	5,41±1,57■	14,08±0,56□
MeP	0,25 ppm	1,43±0,21▼	20±11,47	3,53±0,46■	14,99±0,37□
	0,5 ppm	2,01±0,08□	26,67±3,33▼	6,48±1,76■	14,4±0,82▼
	1 ppm	2,74±0,25▼	28,89±3,85▼	5,93±3,23	14,69±0,74□
	2 ppm	3,32±0,15□	25,56±1,92▼	6,1±4,67	14,94±0,95▼
	4 ppm	4,36±0,56▼	34,44±1,92▼	1,22±0,69	14,46±2,38▼

Yapılan çalışmalar sonucunda, hücreleri interfaz aşamasından öteye gidemeyen embryo yüzdelerinde, kontrol grubuna göre metilparaben konsantrasyonuna bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. Embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk kontrol grubunda 0,14±0,05 seviyelerindeyken, bu sayı, 0,25 mg/l konsantrasyonla metilparabene maruz bırakılan embryolarıda 1,43±0,21 olarak bulunmuştur. 4 ppm konsantrasyonda ise, embryo başına düşen mitotik bozukluk ortalaması 4,36±0,56 seviyelerine kadar yükseldiği görülmüştür. İnterfazda kalan ve mitozun ileri safhalarına geçemeyen embryo yüzdeleri incelendiğinde, negatif kontrol grubunda %10,56±7,88 kadar interfazda kalan embryo bulunmuş, bu oran

konsantrasyonla doğru orantılı olarak değişim göstermiş ve yaklaşık 3,5 kat artarak $34,44 \pm 1,92$ seviyelerine gelmiştir. Bunun yanı sıra, embryo başına düşen total mitotik bozukluk sayısı da, doza bağlı olarak artış göstermektedir ($p < 0,005$). Metafaz/anafaz oranları negatif kontrol grubunda $3,88 \pm 0,61$ olarak bulunurken, bu değer 4 ppm'lik metilparaben konsantrasyonuna maruz kalan embryolarda $1,22 \pm 0,69$ 'a kadar düşmüştür. 6 saatlik embryoların, larvalardan daha hassas olması ve embryotoksisite denemelerinde 8-16 mg/l konsantrasyonlarda metilparabene maruz bırakılan embryolardaki gelişim bozukluklarının yüksek seviyelerde olması nedeniyle, sitotoksisite çalışmalarında 0,25-0,5-1-2 ve 4 ppm'lik konsantrasyonlar denenmiştir.



Şekil 4.6. Embryo başına düşen toplam mitotik bozukluk-metilparaben konsantrasyon ilişkisi.

Sitotoksisite çalışmaları sonucunda gözlenen ve sitotoksik etkinin belirlenmesinde ölçüt alınan mitotik aberasyonların değerleri, çizelge 4.5.'teki gibidir.

Çizelge 4.5. Genotoksisite çalışmaları sonucu mikroskop altında gözlenen mitotik bozukluklar. IP: düzensiz profaz, IM: düzensiz metafaz, L-B: laggard kromozom-kromozom köprüsü, FR: fragmentasyonlu kromozom, VC: vagrant kromozom, MP multipolar kromozom. ■ = p<0,05; ▼ = p<0,005; □ = p<0,001.

İşlem	Kons.	IP	IM	L-B	FR	VC	MP
Ktrl		1,7±0,7■	0	±	3,2±1,3▼	0	0
+Ktrl (CdCl₂)		-	-	-	-	-	-
DMSO		1,3±0,6	0	±	6±1▼	0	0
MeP	0,25 ppm	23,3±3,5■	1,7±0,6■	0	18±5,1■	0	0
	0,5 ppm	35,3±4,7■	4±1■	0	20±3,6■	0	1±1,7
	1 ppm	48±9,6■	6±1▼	1±1	27±9,8■	0	0,3±0,5
	2 ppm	56,3±8,5■	6,7±0,8▼	0,3±0,5	33,7±7,6■	0	2,7±1,2
	4 ppm	71,3±9,9■	12±2■	1,3±0,3■	43,3±3,8▼	2±1,7	0,6±1,15

Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre kontrol grubu ile kıyaslandığında metilparaben konsantrasyonundaki artış ile fragmentasyonlu kromozom sayısında artış görülmüştür (p<0,05). Düzensiz profaz ve düzensiz metafaz sayılarında da toksikant konsantrasyonu ile doğru orantılı artış meydana geldiği görülmektedir. Düzensiz metafaza kontrol gruplarındaki embryolarda hiç rastlanmazken, en yüksek konsantrasyonda metilparabene maruz kalan embryolarda ortalama 12±2 kadar rastlanmıştır.

Genotoksisite çalışmaları sonucunda, embryotoksisite ve spermiyotoksisite çalışmalarında olduğu gibi, konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerde artış olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Sucul ekosistemlerde yapılan araştırmalarda, sucul memeli canlıların çeşitli dokularında birikim gösteren metilparabenin, doğal yaşam için bir risk oluşturduğuna değinilmiştir. Suda çok iyi çözünebilen bir kimyasal olmasına rağmen, hemen her atık su arıtma tesisinin giriş sularında bulunuyor olması, metilparabenin yoğun, kesintisiz ve aralıksız kullanımın göstergesidir. 9-10 saat kadar olan yarılanma ömrü, uçucu bir kimyasal olamayacak kadar yüksek buhar basıncına karşı direnci ile metilparaben, sucul ekosistemlerin istenmeyen parçalarından biri olmaya uzun süredir devam etmektedir ve devam edecek gibi görünmektedir. 7 milyardan fazla insana ev sahipliği yapan yer kürenin dörtte üçü kadarını kaplayan su ile metilparabenin ilişkisi, yalnızca 1996 yılından bu yana bilinmektedir (Haman et al., 2015).

Dünya genelinde üretim ve kullanım miktarları binlerce tonu bulan metilparaben, tüm diğer kimyasallar gibi, kullanımları sonrası sucul ekosistemlere ulaşmaktadır. Metilparabenin sucul canlılar üzerindeki toksik etkilerini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır, ancak deniz ortamını temsil eden canlılar ile yapılan çalışmalar daha az olup genellikle tatlı su canlıları ile testler yapılmıştır. Yapılan bilimsel literatür taramalarında test organizması olarak deniz kestanenin kullanıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, ekinoidlerin embriyolojik avantajlarından yararlanılarak, metilparabenin sucul ekosistemlerde oluşturduğu/oluşturabileceği riskler incelenmeye çalışılmıştır.

Denizel ekosistemlerde bulunan lüminesan bir bakteri türü olan *Photobacterium leiognathi* suşunun test organizması olarak kullanıldığı bir çalışmada, paraben etkisiyle luminesens azalımı incelenmiştir (Bazin et al., 2010). Yapılan çalışmada, metilparabenin 15 dakika süreyle maruz bırakılan *P. leiognathi* için EC_{50} değeri 31 ± 22 mg/l olarak bulunurken, 30 dakika süre için bu değer 35 ± 18 olarak açıklanmıştır. Yine aynı çalışmada gözlenen LOEC 8,5 mg/l olarak bulunmuştur. Denizel planktonik bakteri *V. fishceri* üzerinde yapılan bir çalışmada, metilparabenin bu tür için EC_{50} değeri 5,9 mg/l olarak bulunurken, metilparabenin klorlu bileşiklerinin daha toksik olduğunun altı çizilmiştir. Bu tez çalışmasındaki, fertilizasyon başarısı çalışmaları sonucunda, metilparabenin *A. lixula* türünün döllenme başarısı üzerinde EC_{50} değeri 12,89 mg/l olarak bulunmuştur. Döl kalitesi çalışmaları ise EC_{50} değeri 13,55 mg/l olarak hesaplanmıştır. Embryotoksisite çalışmaları sonucu bulunan EC_{50} değeri ise 8,49 mg/l olarak bulunmuştur. Metilparabenin toksisitesinin belirlenmesi konusunda, denizel türlerle yapılmış

çalışma sayısı bunlarla kısıtlıdır. Bakteri türleri üzerinde metilparabenin çeşitli sürelerde EC₅₀ değerleri farklı olup çalışmamız ile de farklılık göstermektedir. Canlıların toksik maddeye hassasiyetinin farklı olduğu dikkate alındığında türlerin aynı toksik maddeye karşı farklı EC₅₀ değerine sahip olması doğaldır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, denizel bir tür olan *Arbacia lixula* türü deniz kestanesi, test organizması olarak seçilmiştir.

Arbacia lixula'nın test organizması olarak kullanıldığı çalışmalarda, bisphenol-a'nın embriyotoksik etkileri üzerine yapılan incelemelerde, 72 saatlik EC₅₀ değeri 1,396 mg/l olarak bulunmuştur (Arslan and Parlak, 2008). *A. lixula* türü deniz kestanesi kullanılarak gadolinyumun embriyonel safhadaki iskelet gelişimleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada ise, EC₅₀ değeri 2,1 µM (0,7 mg/l) olarak bulunduğu belirtilmiştir (Martino et al., 2016). Atenololün embriyotoksik etkilerinin belirlenmesiyle yapılan bir çalışmada, *A. lixula* türü için EC₅₀ değerinin 66,46 mg/l olduğu ileri sürülmüştür (Karaaslan et al., 2012). β-adrenolitik bir ilaç olan dichloroisoproterenolün toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada Buznikov (1970), fertilizasyon başarısı ve hücre bölünmesinin çok düşük konsantrasyonlarda etkilendiğini, *A. lixula* türü için EC₅₀ değerinin 2 µg/l olduğunu belirtmiştir.

Toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanan kimyasalların *A. lixula* türü için bulunan EC₅₀ değerleri arasında, en yüksek toksik etkiye sahip olan dichloroisoproterenol, metilparabenden birkaç bin kat daha fazla toksik olmasıyla dikkat çekmektedir. Bu veriler ışığında, metilparabenin gadolinyum ve bisphenol-a'dan daha az toksik olduğu, ancak, atenololden daha toksik olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Albero, B., Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., and Tadeo, J. L.** 2012, Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). *Journal of hazardous materials*, 239, 48-55.
- Albero, B., Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., and Tadeo, J. L.,** 2012, Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). *Journal of hazardous materials*, 239, 48-55.
- Ambrose, S. H.,**2001, Paleolithic technology and human evolution. *Science*, 291(5509), 1748-1753.
- Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., and Bansal, A. K.,** 2010, Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 206-212.
- Andersen, H. R., Lundsbye, M., Wedel, H. V., Eriksson, E., and Ledin, A.,**2007, Estrogenic personal care products in a greywater reuse system. *Water Science and Technology*, 56(12), 45-50.
- Arslan, O. C., and Parlak, H.** 2008. Effects of bisphenol-a on the embryological development of the sea urchin *Arbacia Lixula* (Linnaeus, 1758). *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(2), 127.
- Asimakopoulos, A. G., Thomaidis, N. S., and Kannan, K.,** 2014, Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece. *Science of the Total Environment*, 470, 1243-1249.
- Asimakopoulos, A. G., Xue, J., De Carvalho, B. P., Iyer, A., Abualnaja, K. O., Yaghmoor, S. S., ... and Kannan, K.,** 2015, Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environmental research*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bazin, I., Gadal, A., Touraud, E., and Roig, B.,** 2010, Hydroxy benzoate preservatives (parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessment. In *Xenobiotics in the urban water cycle* (pp. 245-257). Springer Netherlands.
- Berke, P. A., Steinberg, D. C., and Rosen, W. E.** 1982, Germaben II: a complete preservative system in clear liquid form. *Cosmetics and Toiletries*, 97, 89-93.
- Bertolini, F.,**1934, Nuove ricerche sulla funzione respiratoria dei polmoni acquatici delle oloturie. Rosenberg and Sellier.
- Biesterbos, J. W., Dudzina, T., Delmaar, C. J., Bakker, M. I., Russel, F. G., von Goetz, N., ... and Roeleveld, N.,** 2013, Usage patterns of personal care products: important factors for exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 55, 8-17.
- Binyon, J.,** 1972, *Physiology of Echinoderms: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology Zoology* (Vol. 49). Elsevier.
- Bjerregaard, P., Andersen, D. N., Pedersen, K. L., Pedersen, S. N., and Korsgaard, B.,**2003, Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 136(4), 309-317.
- Blanco, E., del Carmen Casais, M., del Carmen Mejuto, M., and Cela, R.,** 2009, Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica chimica acta*, 647(1), 104-111.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., and Wąsowicz, W.**2014, Parabens. From environmental studies to human health. *Environment international*, 67, 27-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., and Hass, U.,**2010, Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology*, 30(2), 301-312.
- Boehm, E. E., and Maddox, D. N.,** 1972, Recent applications of preservatives for pharmaceuticals. *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, 43(8), 21.
- Bound, J. P., and Voulvoulis, N.,** 2005, Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental health perspectives*, 1705-1711.
- Brausch, J. M., and Rand, G. M.,** 2011, A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532.
- Buznikov, G., Kost, A. N., Kucherova, N. F., Mndzhoyan, A. L., Suvorov, N. N., and Berdysheva, L. V.,** 1970., The role of neurohumours in early embryogenesis. *Development*, 23(3), 549-569.
- Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Bollain, M. H., and Cela, R.,** 2006a, Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. *Journal of Chromatography A*, 1124(1), 3-10.
- Canosa, P., Rodríguez, I., Rubi, E., Negreira, N., and Cela, R.,** 2006b, Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water. *Analytica chimica acta*, 575(1), 106-113.
- Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K., and Kühler, T.** 2006, Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the total environment*, 364(1), 67-87.
- Carmona, E., Andreu, V., and Picó, Y.,** 2014, Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: from waste to drinking water. *Science of the total environment*, 484, 53-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clark, D., Lamare, M., and Barker, M.,** 2009, Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Marine biology*, 156(6), 1125-1137.
- Close, J. A., and Neilsen, P. A.,** 1976, Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p-hydroxybenzoic acid. *Applied and environmental microbiology*, 31(5), 718-722.
- Corcoran, J., Winter, M. J., and Tyler, C. R.,** 2010, Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 287-304.
- Daniel, J. W.** 1986, Metabolic aspects of antioxidants and preservatives. *Xenobiotica*, 16(10-11), 1073-1078.
- Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J., and Pope, G. S.,** 2004, Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of applied toxicology*, 24(1), 5-13.
- DEPA,** 2013, Survey of Parabens e Part of the LOUS-review. Danish Environmental Protection Agency, p. 56.
- Dewalque, L., Pirard, C., and Charlier, C.,**2014, Measurement of urinary biomarkers of parabens, benzophenone-3, and phthalates in a Belgian population. *BioMed research international*, 2014.
- Dobbins, L. L., Usenko, S., Brain, R. A., and Brooks, B. W.,**2009, Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2744-2753.
- Domagalski, J., Belitz, K., and Furlong, E. T.,**2007, May, Occurrence of pharmaceutical and other organic compounds in ground water in ten regions of California, USA. In *AGU Spring Meeting Abstracts (Vol. 1, p. 03)*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Elder, R.L.**, 1984, Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *Journal of the American College of Toxicology* 3, 147–209.
- EPA/Office of Pollution Prevention and Toxics**, 2007; High Production Volume (HPV) Challenge Program. Available from, as of March 14, 2007: <http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/opptsrch.htm>
- Eriksson, E., Andersen, H. R., and Ledin, A.**,2008, Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1), 240-259.
- Fan, X., Kubwabo, C., Rasmussen, P., and Jones-Otazo, H.**,2010, Simultaneous quantitation of parabens, triclosan, and methyl triclosan in indoor house dust using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(10), 1891-1897.
- FDA**, 1996. Inactive Ingredient Guide. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Office of Management, Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- Ferreira, A. M. C., Möder, M., and Laespada, M. E. F.**,2011, GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(2), 945-953.
- Fol, H.**, 1879, *Mkin SOC. Phys. Hist. nut. Geizdve*, 26, 89.
- Francour, P., Boudouresque, C. F., Harmelin, J. G., Harmelin-Vivien, M. L., and Quignard, J. P.**,1994, Are the Mediterranean waters becoming warmer? Information from biological indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 28(9), 523-526.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Frederiksen, H., Jørgensen, N., and Andersson, A. M.,**2011, Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 21(3), 262-271.
- Genuis, S. J., Birkholz, D., and Curtis, L.,**2013, Paraben levels in an urban community of Western Canada. *ISRN toxicology*, 2013.
- Gianguzza, P., Visconti, G., Gianguzza, F., Vizzini, S., Sarà, G., and Dupont, S.,**2014, Temperature modulates the response of the thermophilous sea urchin *Arbacia lixula* early life stages to CO₂-driven acidification. *Marine environmental research*, 93, 70-77.
- Giudice, G.,**1973, *Developmental biology of the sea urchin embryo*. Elsevier.
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., and Cela, R.,**2011, Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate-mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Water research*, 45(20), 6770-6780.
- Gorga, M., Insa, S., Petrovic, M., and Barceló, D.,**2014, Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1352, 29-37.
- Guadarrama, P., Fomine, S., Salcedo, R., and Martínez, A.,**2008, Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxy benzoic acid (parabens). *Biophysical chemistry*, 137(1), 1-6.
- Guo, Y., Wang, L., and Kannan, K,** 2014, Phthalates and parabens in personal care products from China: concentrations and human exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 66(1), 113-119.
- Hagström, B. E., and Lønning, S,**1973, The sea urchin egg as a testing object in toxicology. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 32(s1), 1-49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. H., and Jørgensen, S. E.**,1998, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.
- Haman, C., Dauchy, X., Rosin, C., and Munoz, J. F.**,2015, Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. *Water research*, 68, 1-11.
- Harrison, T.** 1989, A new species of *Micropithecus* from the middle Miocene of Kenya. *Journal of Human Evolution*, 18(6), 537-557.
- Hassler, W.H., 1954.**, Oral fat emulsions. *American Profession Pharmacist* 20, 427-467
- Head, M. J., and Gibbard, P. L.**2005, Early-Middle Pleistocene transitions: an overview and recommendation for the defining boundary. *Geological Society, London, Special Publications*, 247(1), 1-18.
- Heberer, T.**2002, Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131(1), 5-17.
- Heffernan, A. L., Baduel, C., Toms, L. M. L., Calafat, A. M., Ye, X., Hobson, P., ... and Mueller, J. F.**2015, Use of pooled samples to assess human exposure to parabens, benzophenone-3 and triclosan in Queensland, Australia. *Environment International*, 85, 77-83.
- Hernández Leal, L., Vieno, N., Temmink, H., Zeeman, G., and Buisman, C. J.**2010, Occurrence of xenobiotics in gray water and removal in three biological treatment systems. *Environmental science and technology*, 44(17), 6835-6842.
- Hidalgo, J., Guerola, N., Garcia-Herdugo, G., and Lopez-Saez, J. F. 1975.**, Effect of RNA Inhibitors on Mitosis in *Pleurodeles* Lung Cells. *Caryologia*, 28(3), 301-312.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hinkle, S. R., Weick, R. J., Johnson, J. M., Cahill, J. D., Smith, S. G., and Rich, B. J. 2005, Organic wastewater compounds, pharmaceuticals, and coliphage in ground water receiving discharge from onsite wastewater treatment systems near La Pine, Oregon: Occurrence and implications for transport. U. S. Geological Survey.

Howlett, J. F. 1992, The regulation of preservatives in the European Community. Food Additives and Contaminants, 9(5), 607-614.

Ishiwata, H., Sugita, T., Kawasaki, Y., Takeda, Y., Yamada, T., Nishijima, M., Fukusawa, Y., 1999. Evaluation of preservatives concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1996. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 40, 246–258.

Jackson, E. M., 1992, Moisturizers of today. Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology, 11(3), 173-184.

Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., and Barceló, D. 2013, Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. Journal of Chromatography A, 1306, 44-58.

Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., and Barceló, D., 2013, Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. Journal of Chromatography A, 1306, 44-58.

JECFA, 1974. 17th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report Series 539. World Health Organization, Geneva.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiménez-Díaz, I., Artacho-Cordón, F., Vela-Soria, F., Belhassen, H., Arrebola, J. P., Fernández, M. F., ... and Olea, N.**2016, Urinary levels of bisphenol A, benzophenones and parabens in Tunisian women: A pilot study. *Science of The Total Environment*, 562, 81-88.
- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C. M., Kohler, H. P. E., and Giger, W.**2010, Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 834-843.
- Kahattb E., Maissa Morsy and Ibtesam M. Al-shamran,** 2015, Observation of Mitotic and Cytological Effects Induced by Bean Yellow Mosaic Virus in Affecting Leguminous Plants. *International Journal of Virology*, 11: 123-132.
- Kalcheva, V. P., Dragoeva, A. P., Kalchev, K. N., and Enchev, D. D.**2009, Cytotoxic and genotoxic effects of Br-containing oxaphosphole on *Allium cepa* L. root tip cells and mouse bone marrow cells. *Genetics and molecular biology*, 32(2), 389-393.
- Kamaya, Y., Fukaya, Y., and Suzuki, K.,**2005, Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 59(2), 255-261.
- Karaaslan, M. A., Parlak, H., Arslan, O. C., and Boyacıoğlu, M.** 2012., The embryotoxic effects of beta blocker atenolol on sea urchin *Arbacia lixula* embryos. *Fresen. Environ. Bull*, 21, 3362-3364.
- Kim, J. W., Ramaswamy, B. R., Chang, K. H., Isobe, T., and Tanabe, S.**2011, Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(22), 3511-3520.
- Kleinholz, L. H.**1938, Color changes in echinoderms. *Pubbl. Staz. zool. Napoli*, 17, 53-57.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kobayashi, N.**1984, Marine ecotoxicological testing with echinoderms. *MAR. TOX.*, 341-406.
- Lawrence, J.** 2007, Edible sea urchins: use and life-history strategies. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, 1-9.
- Li, M. H.**, 2012, Acute toxicity of benzophenone-type UV filters and paraben preservatives to freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(3), 566-573.
- Liao, C., and Kannan, K.**2014, Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Science of The Total Environment*, 475, 8-15.
- Liao, C., Lee, S., Moon, H. B., Yamashita, N., and Kannan, K.**2013, Parabens in sediment and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends. *Environmental science and technology*,47(19), 10895-10902.
- Londoño, Y. A., and Peñuela, G. A.**2015, Anaerobic biological treatment of methylparaben in an expanded granular sludge bed (EGSB). *Water Science and Technology*, 71(11), 1604-1610.
- Loraine, G. A., and Pettigrove, M. E.**2006, Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environmental Science and Technology*, 40(3), 687-695.
- LSRO/FASEB**, 1972. Evaluation of the Health Aspects of Methyl Paraben and Propyl Paraben as Food Ingredients. US NTIS Report (PB-221950)
- Ma, W. L., Wang, L., Guo, Y., Liu, L. Y., Qi, H., Zhu, N. Z., ... and Kannan, K.**2013, Urinary concentrations of parabens in Chinese young adults: implications for human exposure. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 65(3), 611-618.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maddox, D. N.** 1982, The role of p-hydroxybenzoates in modern cosmetics. *Cosmetics and Toiletries*, 97, 85-88.
- Madsen, T., Buchardt, H., Nylén, D., Rathmann, A., Petersen, G., and Simonsen, F.**2001, Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products CETOX Environmental Project No. 615 Miljøprojekt.
- Mahuzier, P. E., Altria, K. D., and Clark, B. J.** 2001, Selective and quantitative analysis of 4-hydroxybenzoate preservatives by microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 924(1), 465-470.
- Manzo, S.**2004, Sea urchin embryotoxicity test: proposal for a simplified bioassay. *Ecotoxicology and environmental safety*, 57(2), 123-128.
- Märkel, K., and Titschack, H.**1965, Das Festhaltevermögen von Seeigeln und die Reißfestigkeit ihrer Ambulacralfüßchen. *Naturwissenschaften*, 52(10), 268-268.,
- Martino, C., Bonaventura, R., Byrne, M., Roccheri, M., and Matranga, V.**2016., Effects of exposure to gadolinium on the development of geographically and phylogenetically distant sea urchins species. *Marine Environmental Research*.
- Mateyko, G. M.**1967, Developmental modifications in *Arbacia punctulata* by various metabolic substances. *The Biological Bulletin*, 133(1), 184-228.
- Molins-Delgado, D., Díaz-Cruz, M. S., and Barceló, D.** 2016, Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment. *Journal of hazardous materials*, 310, 143-151.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moos, R. K., Koch, H. M., Angerer, J., Apel, P., Schröter-Kermani, C., Brüning, T., and Kolossa-Gehring, M.**2015, Parabens in 24h urine samples of the German Environmental Specimen Bank from 1995 to 2012. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(7), 666-674.
- Neidig, C. P., and Burrell, H.** 1944. The esters of p-hydroxybenzoic acids as preservatives. *Drug Cosmetic Indust*, 54, 408-10.
- Nordlander, R. H., and Edwards, J. S. 1969.,** Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus*, L. Wilhelm Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, 162(3), 197-217.
- Oishi, S.** 2002, Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1807-1813.
- Oral, R.** 1997. Selenat, Selenit ve Seleno-DL-Metionin'in *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) Üzerine Embryotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması (Doktora Tezi) <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/>
- Orr, P. R.**1955, Heat death. I. Time-temperature relationships in marine animals. *Physiological Zoology*, 28(4), 290-294.
- Orth, D. S. 1980.,** Use of parabens as cosmetic preservatives. *International journal of dermatology*, 19(9), 504-505.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordano, G.G., Trief, N.M.,** 1986. The sea urchin: bioassay for the assessment damage from environmental contaminants. In: Cairns Jr., J. (Ed.), *Community Toxicity Testing*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 67–92

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordano, G. G., and Trieff, N. M.**1986, The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In Community Toxicity Testing. ASTM International.
- Paxéus, N.**1996, Organic pollutants in the effluents of large wastewater treatment plants in Sweden. *Water Research*, 30(5), 1115-1122.
- Prichodko, A., Jonusaite, K., and Vickackaite, V.**2009, Hollow fibre liquid phase microextraction of parabens. *Central European Journal of Chemistry*, 7(3), 285-290.
- Privitera, D., Noli, M., Falugi, C., and Chiantore, M.**2011, Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 6-11.
- Ramaswamy, B. R., Kim, J. W., Isobe, T., Chang, K. H., Amano, A., Miller, T. W., ... and Tanabe, S.**2011, Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. *Journal of hazardous materials*, 192(3), 1739-1745.
- Ramírez, N., Marcé, R. M., and Borrull, F.**2011, Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6226-6231.
- Rastogi, S. C., Schouten, A., Kruijf, N. D., and Weijland, J. W.**,1995, Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-and benzylparaben in cosmetic products. *Contact dermatitis*, 32(1), 28-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Renjana, P. K., Anjana, S., and Thoppil, J. E.** 2013, Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(2), 311-315.
- Richardson, M. L., and Bowron, J. M.** 1985, The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37(1), 1-12.
- Rocha, C., Cardoso, P., Cunha, L., Gomes, C., JÚNIOR, R. R., Pinheiro, R. H., ... and Burbano, R.** 2015., Mutagenic Effects of Potassium Dichromate as Evaluated by Means of Animal and Plant Bioindicators. *In Vivo*, 29(6), 729-735.
- Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., and Sumpter, J. P.** 1998, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 153(1), 12-19.
- Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., and Brody, J. G.** 2003, Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science and technology*, 37(20), 4543-4553.
- Sabalitschka, T.** 1930, Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection. *Archives of Pharmacy*, 268, 653-673.
- Sala, E., Ribes, M., Hereu, B., Zabala, M., Alvà, V., Coma, R., and Garrabou, J.** 1998, Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area. *Mar Ecol Prog Ser*, 168, 135-145.
- SCF**, 1996. Report of the Scientific Committee for Food, 35th series. Food Science and Techniques. Scientific Committee for Food. European Commission, Directorate-General Industry, Brussels.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Selenka, E.**, 1878, Zoologische Studien. I. Befruchtung des Eies von Toxopneustes variegatus, Leipzig.
- Smith, K. W., Braun, J. M., Williams, P. L., Ehrlich, S., Correl, K. F., Calafat, A. M., ... and Hauser, R.** 2012, Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. Environmental health perspectives, 120(11), 1538.
- Smolinske, S. C.** 1992, CRC Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients. CRC press.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., and Greenberg, N. A.** 2001, Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology, 39(6), 513-532.
- Soni, M. G., Carabin, I. G., and Burdock, G. A.** 2005, Safety assessment of esters of p- hydroxybenzoic acid (parabens). Food and Chemical Toxicology, 43(7), 985-1015.
- Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., and Burdock, G. A.** 2002, Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food and Chemical Toxicology, 40(10), 1335-1373.
- Suzuki, I., Nojima, S., Tanimura, A. (Eds.)**, 1999. Commentary on Official Compendium of Food Additives of Japan, seventh ed., D-1063. Hirokawa Shoten Inc, Tokyo. (in Japanese).
- Sweetman SC, 2002.**, Martindale: the complete drug reference, 33 edition. London: Pharmaceutical Press.
- Szreter, S., and Mooney, G.** 1998, Urbanization, mortality, and the standard of living debate: new estimates of the expectation of life at birth in nineteenth-century British cities. The Economic History Review, 51(1), 84-112.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tedesco, S. B., and Laughinghouse IV, H. D. 2012.**, Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. INTECH Open Access Publisher.
- Terasaki, M., Makino, M., and Tatarazako, N.**2009, Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Journal of Applied Toxicology*, 29(3), 242-247.
- Thomas, L. P., and Thomas, S. B.**1965, Herring gulls diving for starfish. *Quart. Jour. Florida Acad. Sci.*, 28(2), 195-196.
- Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Drewes, J. E., and Snyder, S. A.**2008, Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190(1), 253-262.
- Trudeau, V. L., Metcalfe, C. D., Mimeault, C., and Moon, T. W.**2005, Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6, 475-493.
- Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J. G., ... and Villemur, R.**2001, Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2404-2409.
- Van der Heyde, H. C.**1922, On the Physiology of Digestion, Respiration and Excretion in Echinoderms... Gedrukt bij C. de Boer, jr..
- Velegraki, T., Hapeshi, E., Fatta-Kassinos, D., and Poullos, I.** 2015. Solar-induced heterogeneous photocatalytic degradation of methyl-paraben. *Applied Catalysis B: Environmental*, 178, 2-11.
- Viglino, L., Prévost, M., and Sauvé, S.**2011, High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-APCI-MS/MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(3), 583-590.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vo, T. T., Yoo, Y. M., Choi, K. C., and Jeung, E. B.**2010, Potential estrogenic effect (s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive toxicology*, 29(3), 306-316.
- Wang, L., Liao, C., Liu, F., Wu, Q., Guo, Y., Moon, H. B., ... and Kannan, K.**2012, Occurrence and human exposure of p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), and their hydrolysis products in indoor dust from the United States and three East Asian countries. *Environmental science and technology*, 46(21), 11584-11593.
- Wang, L., Wu, Y., Zhang, W., and Kannan, K.**2013, Characteristic profiles of urinary p-hydroxybenzoic acid and its esters (parabens) in children and adults from the United States and China. *Environmental science and technology*, 47(4), 2069-2076.
- Wang, W., and Kannan, K.**2016, Fate of Parabens and their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. *Environmental science and technology*.
- Watkins, D. J., Ferguson, K. K., Del Toro, L. V. A., Alshawabkeh, A. N., Cordero, J. F., and Meeker, J. D.**2015, Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(2), 212-219.
- Watts, C., Mayo, D., Crane, M., Fawell, J., and Goslan, E.** 2007, Desk based review of current knowledge on pharmaceuticals in drinking water and estimation of potential levels. Final Report to Defra Project Code: CSA 7184. WT02046/DWI70/2/213.
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., and Hühnerfuss, H.**2004, Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583-592.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Williams, R. T., and Cook, J. C.**2007, Exposure to pharmaceuticals present in the environment. *Drug Information Journal*, 41(2), 133-141.
- Xue, J., Sasaki, N., Elangovan, M., Diamond, G., and Kannan, K.**2015, Elevated Accumulation of Parabens and their Metabolites in Marine Mammals from the United States Coastal Waters. *Environmental science and technology*, 49(20), 12071-12079.
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., ... and Tatarazako, N.**2011, Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Science of the Total Environment*, 410, 102-111.
- Ye, X., Bishop, A. M., Reidy, J. A., Needham, L. L., and Calafat, A. M.**2006, Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environmental Health Perspectives*, 114(12), 1843.
- Yu, Y., Huang, Q., Wang, Z., Zhang, K., Tang, C., Cui, J., ... and Peng, X.**2011, Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(4), 871-878.
- Zhang, N. S., Liu, Y. S., Van den Brink, P. J., Price, O. R., and Ying, G. G.**2015, Ecological risks of home and personal care products in the riverine environment of a rural region in South China without domestic wastewater treatment facilities. *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 417-425.

ÖZGEÇMİŞ

Serkan Tez, 1988 yılında İzmir’de doğmuştur. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği bölümünden 2014 yılında mezun olarak lisans eğitimini tamamlamış ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Temel Bilimler programında deniz biyolojisi üzerine yüksek lisans eğitimine başlamıştır.



