

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAFEİN VE PARAKSANTİNİN BAZI FİTOPLANKTON KÜLTÜRLERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

MERVE İPŞİROĞLU

KOCAELİ 2016

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

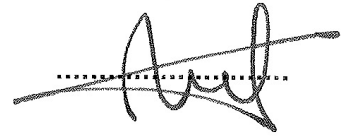
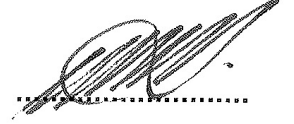
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAFEİN VE PARAKSANTİNİN BAZI FİTOPLANKTON
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

MERVE İPŞİROĞLU

Doç.Dr. Halim Aytekin ERGÜL
Danışman, Kocaeli Üniversitesi
Doç.Dr. Özlem AKSOY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi
Doç.Dr. Tuğba ONGUN SEVİNDİK
Jüri Üyesi, Sakarya Üniversitesi



Tezin Savunulduğu Tarih: 15.06.2016

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki en önemli metabolit olan paraksantin, çevremizdeki deniz ekosistemlerinde de bulunan, deniz ürünleri yetiştiriciliğinde balık, kabuklu ve yumuşakçaların beslenmesinde de kullanılan, *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmayı sonuçlanmasına kadar yardımcı olan, yüksek lisans dönemimde bilimsel açıdan her anlamda beni destekleyip cesaretlendiren Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Halim Aytekin ERGÜL'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bilgi paylaşımında bulunarak bana yol gösteren Arş. Gör. Serdar AKSAN'a ve laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Biyoloji Bölümü yüksek lisans öğrencilerine teşekkür ederim. Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü değerli hocalarıma ve her zaman samimiyet ve desteklerini hissettiğim arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışması boyunca laboratuvar imkanlarından faydalandığım Genel Biyoloji Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda bulunan ve aldığım tüm kararlarda beni destekleyen canım aileme ve tüm fedakarlıkları için Fatih KORAL'a minnettarlıkla teşekkürlerimi sunarım.

Haziran – 2016

Merve İPŞİROĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	4
1.1. Ekotoksikoloji.....	4
1.1.1. Toksikite testleri.....	4
1.1.2. Toksikite testlerinde alglerin kullanımı ve önemi.....	5
1.2. Fitoplankton Kültürü.....	6
1.2.1. Fitoplankton kültür ortamı.....	6
1.2.2. Fitoplankton kültüründe büyüme.....	8
1.3. Kafein.....	8
1.3.1. Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
1.3.2. Kafein tüketimi.....	9
1.3.3. Kafein metabolizması.....	10
1.3.4. Paraksantin.....	10
1.3.5. Su ortamlarına kafein girdisi.....	11
1.3.6. Kafein toksisitesi ve canlılar üzerine etkisi.....	12
1.4. İzmit Körfezi.....	13
1.4.1. İzmit körfezi deşarjları ile ilgili bilgiler.....	14
2. MATERYAL VE METOT.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. <i>Isochrysis galbana</i>	15
2.1.2. <i>Thalassiosira pseudonana</i>	16
2.2. Metot.....	16
2.2.1. Materyallerin toplanması ve muhafaza koşulları.....	16
2.2.2. Çalışmada kullanılan malzemelerin hazırlanması.....	17
2.2.3. Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması.....	17
2.2.4. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler.....	18
2.2.5. Kafein ve paraksantin fitoplankton kültürlerine aktarılması.....	19
2.2.6. Hücrelerin sayımı.....	20
2.3. Verilerin İstatiksel Analizi.....	21
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	22
3.1. <i>Isochrysis galbana</i> Türüne Kafeinin Etkisi.....	22
3.1.1. <i>Isochrysis galbana</i> türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon.....	23
3.2. <i>Thalassiosira pseudonana</i> Türüne Kafeinin Etkisi.....	24
3.2.1. <i>Thalassiosira pseudonana</i> türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon.....	26
3.3. <i>Isochrysis galbana</i> Türüne Paraksantin Etkisi.....	27

3.3.1. <i>Isochrysis galbana</i> türüne paraksantinin neden olduğu inhibisyon.....	29
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR.....	36
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	42
ÖZGEÇMİŞ	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Fitoplankton kültürünün büyüme evreleri.....	8
Şekil 1.2.	Kafeinin moleküler yapısı	9
Şekil 1.3.	Kafein bileşenleri	11
Şekil 2.1.	<i>Isochrysis galbana</i>	15
Şekil 2.2.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	16
Şekil 2.3.	Thoma lamı	21
Şekil 3.1.	Farklı kafein konsantrasyonlarının <i>I. galbana</i> türünün birey sayısına etkisi.....	22
Şekil 3.2.	<i>I. galbana</i> 'da kafeinin neden olduğu inhibisyon (%)	24
Şekil 3.3.	Farklı kafein konsantrasyonlarının <i>T. pseudonana</i> türünün birey sayısına etkisi	25
Şekil 3.4.	<i>T. pseudonana</i> 'da kafeinin neden olduğu inhibisyon (%)	26
Şekil 3.5.	Farklı paraksantin konsantrasyonlarının <i>I. galbana</i> türünün birey sayısına etkisi	27
Şekil 3.6.	<i>I. galbana</i> 'da paraksantin neden olduğu inhibisyon (%)	29

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	9
Tablo 1.2.	Deniz suyunda bulunan kafein konsantrasyonları	12
Tablo 2.1.	Çalışmada kullanılan ve ticari olarak satın alınan fitoplankton türü ve CCAP kültür numaraları	17
Tablo 2.2.	F/2 besin ortamının içeriği	18
Tablo 2.3.	Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler	18



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrad
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
ATP	: Adenozintrifosfat
B12	: B12 Vitamini
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
g	: Gram
H ₂ O	: Su
HCl	: Hidroklorür
HCO ₃	: Bikarbonat
K	: Potasyum
km	: Kilometre
L	: Litre
Lux	: Işık şiddeti
M	: Metre
mg	: Miligram
mg/L	: Milyonda kısım
mm	: Milimetre
mol	: Molarite
Na	: Sodyum
ng	: Nanogram
ppt	: Binde kısım
rpm	: Dakikada devir sayısı

Kısaltmalar

ÇDR	: Çevre Durum Raporu
EC50	: Etkili Konsantrasyon 50
EPN	: Etil 4-Nitrofenol Fenil Fosforotioat
HDPE	: Yüksek Yoğunluklu Polietilen Malzeme
IC50	: İnhibisyon Konsantrasyonu 50
ISO	: International Organization for Standardization (Uluslararası Standartlar Teşkilatı)
LC50	: Letal Konsantrasyon 50
LD50	: Letal Doz 50
LT50	: Letal Zaman 50
NCMA	: National Center for Marine Algae (Denizel Alg Ulusal Merkez)
NOEC	: No Observed Effect Concentration (Gözlemlenemeyen Etki Konsantrasyonu)
OECD	: The Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)
OSB	: Organize Sanayi Bölgesi

SCADA : Supervisory Control and Data Acquisition (Merkezi Denetim ve
Veri Depolama
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu



KAFEİN VE PARAKSANTİNİN BAZI FİTOPLANKTON KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

ÖZET

Kafein dünyada ilaç ve gıda sanayisinde en çok tüketilen kimyasallar arasındadır. Şehir merkezlerinde ve yerleşimin yoğun olduğu yerlerde, kanalizasyon, atık su, göl, akarsu, yeraltı suyu ve deniz suyunda bulunan kafein antropojenik indikatör olarak kullanılır. Bu çalışmada farklı kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki en önemli metabolit olan paraksantin konsantrasyonlarının fitoplankton çoğalması üzerine etkileri ile ilgili verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada kafeinin etkileri *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana*, paraksantin etkileri *Isochrysis galbana* türünde gözlemlendi. Fitoplankton kültürü steril kabinde aşılandı, etiketlendi ve 15°C sıcaklıkta 14/10 gündüz gece periyodunda iklimlendirme dolabında inkübasyona bırakıldı. Deney grupları farklı konsantrasyonlarda kafein, paraksantin ve kontrol ortamlarında 96 saat boyunca izlendi. Deney gruplarından 24 saat ara ile örnek alınarak hücre (birey) sayısı belirlendi.

Örnekler 96. saat sonunda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, *I. galbana* türünün üremesi 500 mg/L kafein ve 150 mg/L paraksantin konsantrasyonlarında en düşük düzeyde oldu. *T. pseudonana* türünde ise 550 mg/L kafein konsantrasyonunun üremenin en düşük düzeyde olduğu görüldü.

Bu çalışma antropojenik indikatör olarak kullanılan kafeinin ve en etkili metaboliti olan paraksantin *I. galbana* ve *T. pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. Çalışma sonuçlarının, gerek çalışmada kullanılan fitoplankton türlerinin ve gerekse kentsel deşarjların canlı sistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Isochrysis galbana*, Kafein, Paraksantin, *Thalassiosira pseudonana*, Üreme Engellenmesi.

CAFFEINE AND PARAXANTHINE EFFECTS ON THE SOME PHYTOPLANKTON CULTURE

ABSTRACT

Caffeine is one of the most consumed chemical in food and pharmaceutical industry in the world. It is used as anthropogenic indicator in city centers, densely populated areas, sewage, wastewater, lakes, rivers, groundwater and seawater. The aim of this work is obtain and evaluate caffeine and caffeine's most effective metabolite paraxanthine concentration on phytoplankton growth.

The effects of caffeine on *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira pseudonana* and the effects of paraxanthine on *Isochrysis galbana* was observed. Phytoplankton culture was inoculated in steril cabinet and was exposed to 15°C temperate and 14/10 day and night period. The groups was monitored for 96 hours with given different concentration of caffeine, paraxanthine and control. The samples were taken every 24 hours and cell numbers were determined.

When the samples were compared with control groups at the end of 96 hour, the growth of *I. galbana* was at the lowest on 500 mg/L caffeine and 150 mg/L paraxanthine concentration. In the growth of *T. pseudonana* was at the lowest on 550 mg/L caffeine concentration.

Anthropogenic indicator caffeine and the most effective metabolite paraxanthine effects on the growth of *I. galbana* and *T. pseudonana* was first studied subject of its field. The result of this work will contribute to both phytoplankton species used in this work and municipal discharge's effects on live systems.

Keywords: *Isochrysis galbana*, Caffeine, Paraxanthine, *Thalassiosira pseudonana*, Growth Inhibition.

GİRİŞ

Birincil üreticiler olan planktonik algler, su ortamında önemli bir role sahiptirler. Sucul besin zincirinin temel bileşeni olmaları ve anahtar öneme sahip fonksiyonel bir organizma grubunu oluşturmaları nedeniyle, tüm ekosistemin doğru yapılanması ve çalışmasında büyük önem taşımaktadırlar. Dahası, planktonik algler su ortamına bırakılan kimyasalların farklı etkilerinin test edilmesinde kullanılan oldukça hassas indikatörlerdir (Burkiewicz ve diğ., 2005).

Sucul kıyı ekosistemler kirlenmeye yatkındır. Su sistemlerinin insan kaynaklı kirliliği büyük ölçüde kentleşme, evsel atık imhası, yanlış septik sistemleri ve tarımsal akıntıdan meydana gelmektedir (Ferreira, 2005). Su kirliliği aynı zamanda balıkçılığın çöküşü ve biyoçeşitliliğin azalması gibi çevre sorunlarına yol açabilir. Sucul ekosistemlerin korunması insanlığın en önemli önceliklerinden biridir (Kurissery ve diğ., 2012).

Açık bir sistem olan ekosistemlerde yaşam, enerji akışı ve besin döngüsüyle sürer. Ekosistemi oluşturan canlı grupları birbirine besin zinciri ile bağlıdırlar. Canlılardan herhangi birinin kirleticilerden zarar görmesi sonucunda, madde ve enerji döngüsü veya besin zinciri gibi ekolojik döngü elemanları etkilenmekte ve canlılar arasında var olan karşılıklı etkileşim bozulmaktadır.

Sucul ortamlarda meydana gelen kirlilik, bazı yerlerde tehlikeli boyutlara ulaşarak sucul ekosistemlerin kendi kendini temizleme kapasitesini bozmuştur. Bu yüzden su ortamlarında meydana gelen tehlikenin belirlenmesi açısından sucul organizmalardan yararlanılmaktadır. Fotosentetik algler, sucul ortamların birincil üreticileri ve birçok sucul canlının besin kaynağı olduklarından ekosistemin önemli bir bileşenidirler. Algler, sucul ortamlarda her zaman bulunabilen, ekolojik olarak önemli ve stresörlere karşı çok hassas olan canlılardır. Alglerin yoğunluğunun ve bileşiminin değişmesi, habitatın kimyasal ve biyolojik özelliğini etkiler (Oberholster ve diğ., 2005).

Toksisite testlerinde alglerin kullanımı, organik maddenin birincil üreticileri ve besin zincirinin bir parçası oldukları için önemlidir (Manahan, 2000). Yeşil algler toksisite testlerinde en sık kullanılan mikroalg türleridir (Moreno Garrido ve diğ., 2000).

Sanayi ve endüstri kuruluşları, kanalizasyon sistemleri, enerji santralleri, tarım ve hayvancılık gibi faaliyetler sonucu açığa çıkan ve içerisinde sağlığa zararlı maddeleri içeren sular, atıksu olarak tanımlanmaktadır. Atıksular yer altı sularındaki, akarsulardaki, göllerdeki ve denizlerdeki kirlenmenin en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Atıksularda kirlenmeyi oluşturan etmenler genel olarak; organik maddeler, ağır metal bileşikleri, siyanür, aromatik ve alifatik hidrokarbonlar, deterjanlar, azot, fosfor, renk ve inorganik maddeler olarak sıralanabilmektedir (Doğan ve Saylak, 2000). Birçok organik ve inorganik maddede bulunan bu kirleticilerin giderimi için fiziksel, biyolojik ve kimyasal arıtma yöntemleri kullanılmaktadır (URL-1).

Atıksularda fiziksel, biyolojik ve kimyasal içerikli kirlilikler görülmektedir. Fiziksel kirliliğe renk, koku, toplam katı madde ve bulanıklık neden olmaktadır. Biyolojik kirliliği organik atıkların etkisiyle su kaynaklarında üreyen algler, funguslar ve bakteriler oluşturmaktadır. Bu canlılar zamanla ortamdaki oksijen, karbon, azot gibi maddeleri tüketmektedirler. Kimyasal kirlilik ise zamanla suda biriken ağır metallere, biyolojik olarak parçalanmayan veya parçalanamayan organik madde kalıntılarından ve inorganik atıklardan oluşmaktadır. Bu kirlenme sadece sularla sınırlı kalmayıp besin zinciri yoluyla gıdalara kadar ulaşmaktadır. Ayrıca alıcı ortamda biriken kirleticiler canlılar üzerinde toksik etkiye neden olabilmektedir (Metcalf ve diğ., 2003).

Arıtma tesislerine ve alıcı ortama, kanalizasyon sistemleri, endüstriyel faaliyetler, hayvan yetiştiriciliği ve tarımsal faaliyetler sonucu ulaşan ilaçlar ve hammaddeleri özelliklerini koruyarak ya da atıksudaki diğer kimyasal maddelerle reaksiyona girerek arıtılması daha zor olan ve biyolojik olarak parçalanabilirliği düşük olan maddeler meydana getirebilmektedir (Delepee ve diğ., 2004). Bu mikro kirleticiler içerisinde bulunan ilaçların, ilaç türevlerinin ve kişisel bakım ürünlerinin kullanımının artmasıyla yeni çevresel problemler ortaya çıkmaktadır. Bunların arasında ilaç endüstrisi ülkemizde ve dünyada sağlık ve çevre açısından önemli bir yer teşkil etmektedir. Son yıllarda, doğrudan ve sürekli olarak kentsel atık ile çevreye salınan bu kimyasallar ve metabolitleri ciddi yeni çevresel kaygılara neden olmuştur (Brain ve diğ., 2004; Halling Sorensen ve diğ., 1998; Nakada ve diğ., 2008). Bir çok ilaç ng/L-µg/L arasında değişen nispeten düşük konsantrasyonlarda olsa da denizel çevrede tespit edilmiştir (Daneshvar ve diğ., 2010; Fent ve diğ., 2006; Gagne ve diğ., 2006; Gomez ve diğ., 2012; Halling Sorensen ve diğ., 1998; Yoon ve diğ., 2010). Denizel çevrede bu ilaçlar biyolojik olarak birikir ve hedef olmayan organizmalarda toksik etkilere neden olabilir (Grung ve diğ., 2008; Halling Sorensen ve diğ., 1998).

Alıcı ortamda sıklıkla bulunan bileşiklerden birini de kafein oluşturmaktadır. Kafeinin yapısında dört adet azot atomu bulunmaktadır. İnsanlar tarafından günlük yiyecek ve içecekler ile tüketilebildiği gibi çeşitli ilaçların hammaddesi olarak da kullanılabilir. İdrarla atılan kafein kanalizasyon sistemlerine ve oradan evsel atıksu arıtma tesislerine kadar gidebilmektedir. Kafein aynı zamanda yiyecek, içecek kalıntıları ve bulaşıklarıyla da arıtma tesislerine ulaşabilmektedir. Ayrıca evsel biyolojik arıtma tesislerinde de tamamı giderilemeyen kafein, atıksuyun deşarjı ile alıcı ortama iletilebilmektedir (Metcalf ve diğ., 2003).

Kişisel bakım ürünlerinde ilaç ve kimyasal olarak bulunan kafein, son zamanlarda yeraltı suyu, tatlı su ve deniz sistemlerinde atıksu muhtemel kirlilik izleyici olarak dikkat çekmiştir (Knee ve Paytan, 2011). Sucul ortamda kafein yaygınlığı ve suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerinin belirsizliği hakkında giderek artan endişeler, sucul organizmalar üzerinde kafein etkilerini araştıran az sayıda çalışmaya yol açmıştır (Roudriguez del Rey ve diğ., 2011).

Yukarıdaki bilgilerin ışığında bu çalışmanın amacı kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki en önemli metabolit olan paraksantin, çevremizdeki deniz ekosistemlerinde de bulunan, deniz ürünleri yetiştiriciliğinde balık, kabuklu ve yumuşakçaların beslenmesinde de kullanılan, *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu araştırmadan elde edilecek sonuçların kafeinin deniz canlılarına olan etkileri ile ilgili veri sağlayacağı düşünülmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Ekotoksikoloji

Ekotoksikoloji, toksikolojinin bir dalı olarak tanımlanmıştır. Ekotoksikoloji, doğal veya insan kaynaklı toksik maddelerin karasal veya sucul ortamlarda yaşayan organizmalar (balık, kuş, bitki vb.) üzerinde meydana getirdiği toksik etkileri ve toksik maddeler ile organizmaların yaşadığı fiziksel çevrenin etkileşimini araştırır (Rand ve diğ., 1995). Kimyasalların ekosistemler üzerindeki zararlı etkilerini belirleyen ekotoksikoloji, çevre, kimya, biyokimya, toksikoloji, fizyoloji, popülasyon ekolojisi ve popülasyon genetiği disiplinlerinin bir sentezini oluşturan disiplinlerarası bir konudur (Walker ve diğ., 2012).

1.1.1. Toksikite testleri

Toksikite testlerinin yapılmasının başlıca amacı canlılar üzerinde zararlı etki yapan ve görünür hiçbir etkisi olmayan (zararsız) konsantrasyonları saptamak, yüzey sularının kalitesini ve deşarjların toksisitesini tayin etmektir (Parlak ve diğ., 2011).

Doğal ortama verilen herhangi bir kirletici maddenin o ortamda yaşayan canlılar üzerindeki etkileri toksisite testleri ile belirlenebilir. Bu testler kısa süreli (akut) etkileri ya da uzun süreli (kronik) etkileri ortaya çıkarmak amacıyla uygulanır.

Akut etkiler, bir kimyasala kısa süreli maruz kalma sonunda hızlı bir şekilde meydana gelen, genellikle diğer etkilere göre daha şiddetli ve büyük olan etkilerdir. Sucul organizmalarda akut etkileri belirlemek için yapılan ölçümler, birkaç saatte, günde, haftada öldürücülük veya ölüm oranı olarak yapılır (Rand ve Petrocelli, 1985).

Genellikle tekrarlanma sonucunda veya kimyasalın devamlı düşük konsantrasyonlarına uzun süreli maruz kalma sonunda oluşan toksik etkiler, kronik etkilerdir. Özellikle de maruz kalma konsantrasyonu çok düşük ise, akut etkilerle karşılaştırıldığında etkilerin belirlenmesi için daha uzun bir süre geçmesi gerekebilir (Rand ve diğ., 1995). Kronik etkiler, ölümcül veya subletal olabilir. Ölümcül etkilere örnek, kronik bir şekilde maruz kalmış organizmaların yaşayabilir nitelikteki yeni organizmayı üretmedeki başarısızlığı olarak verilebilir (Rand ve Petrocelli, 1985).

Akut veya kronik subletal etkiler, çoğunlukla laboratuvar çalışmalarında tek türün maruz kalmasına dayanılarak yapılır. Ekosistem yapısındaki ve fonksiyonundaki değişiklikler ise, alan çalışmalarında çok fazla sayıda tür veya topluluk üzerinde deneysel modellerde veya doğal ekosistemlerde değerlendirilir (Rand ve diğ., 1995).

Ekotoksikolojide, organizmanın maruz kaldığı kimyasalın miktarı ile ortaya koyacağı toksik etkinin derecesi ve doğası arasında ilişki en önemli konudur. Doz ve cevap ilişkisi çevresel kimyasalların sebep olduğu risk ve zararın değerlendirilmesi için bir temel oluşturur. Çünkü her şeyden önce doz veya etkileyen kirlenici miktarına bağlı olarak değişmektedir (Parlak ve diğ., 2011).

Doz-tepki arasında tanımlanan ilişki, hedef dokuya ulaşan madde miktarıyla çevresel konsantrasyon arasındaki farkı ayırt etmek için gereklidir. Çevresel konsantrasyon, bir organizmaya giren kimyasalın bilinen miktarının veya dozunun çevresel toksikolojide temsili olarak kullanıldığı terimdir. Çevresel konsantrasyon veya kimyasalın miktarı, doz gibi kullanılarak tanımlanır. Belirli bir dozla meydana gelen reaksiyon veya ortaya çıkan tepki, tepkinin büyüklüğü veya gözlemlenebilen özel bir tepki şeklinde kantitatif olarak tanımlanır (Yu, 2005).

Toksik maddelerin konsantrasyon miktarlarına karşı, bir organizma, popülasyon veya topluluğun tepkisi grafik olarak gösterilir. Kullanılan bu ilişki, DNA hasarının büyüklüğü, davranışsal değişimler, ölüm, enzim inhibisyonu gibi kriterlerle tanımlanabilir. Doz-tepki ilişkisinde elde edilen veriler sigmoid eğri olarak çizilir. Çizilen eğrinin orta noktası LD₅₀ (bir grup organizmanın %50'sinin ölümüne neden olan doz), LC₅₀ (bir grup organizmanın %50'sinin ölümüne neden olan konsantrasyon), EC₅₀ (bir grup organizmanın %50'sine etki eden konsantrasyon, ölümden başka etkileri anlatmak için kullanılır), IC₅₀ (bir grup organizmanın normal tepkisinin %50 azalması, bitki fidesi, alg ve diğer organizmaların büyüme oranının etkilenmesini tanımlamak için kullanılır), LT₅₀ (bir grup organizmanın %50'sinin ölmesi için gereken süre) gibi değerlerle ifade edilir (Newman ve Unger, 2002; Yu, 2005).

1.1.2. Toksikite testlerinde alglerin kullanımı ve önemi

Algler, inorganik maddeleri kullanan ve fotosentez ile karbondioksitten organik madde üreten, tek tek, iplikli, tabaka veya koloni olarak var olan, tek hücreli mikroskobik organizmalardır. Algler, tek hücreli mikroskobik organizmalar olmalarına rağmen bazı deniz algleri büyük, oldukça karmaşık yapıya sahip çok hücreli organizmalardır. Mikroalgler olarak isimlendirilen mikrofitler, mikroskobik alglerdir ve tatlısu, deniz sistemlerinde

bulunurlar. Birkaç μm 'den birkaç yüz μm 'ye kadar değişen boyutlardadırlar (URL-2).

Fotosentetik algler, sucul ortamların birinci derecedeki üreticileri ve birçok sucul canlının besin kaynağı olduklarından ekosistemin önemli bir bileşenidirler. Algler, çevrede her zaman her yerde bulunabilen, ekolojik olarak önemli ve stresörlere karşı çok hassas olan canlılardır. Alglerin yoğunluğunun ve bileşiminin değişmesi, habitatın kimyasal ve biyolojik özelliğini etkiler (Oberholster ve diğ., 2005). Alglerin ekosistemdeki en önemli fonksiyonları, zooplanktonun besin kaynağı, sediman mikrobiyal besin zinciri için başlıca karbon kaynağı, toksik maddelerin besin zincirinde çevrimini sağlamak için aracı olmaları, çift kabuklu hayvanların büyümesi için gerekli olan vitaminleri ve doymamış yağ asitlerini temin etmeleridir. Yaşamı sona eren alglerin dış iskeletleri, dibe çökerek deniz yüzey sedimentlerinin yapısına katılırlar (Burton ve diğ., 1991).

Toksisite testlerinde alglerin kullanımı, organik maddenin birincil üreticileri ve besin zincirinin bir parçası olduklarında önemlidir. Alglerin bazıları kirliliğe karşı fazla duyarlı, bazıları dirençli, bazıları da orta seviyede toleranslıdır. Çoęu ağır metaller, endüstriyel atıklar, pestisitler, katyonik yüzey aktif maddeler, toprak elütrasyonları ve tehlikeli atık maddelerine karşı algler, makro canlılardan daha duyarlıdırlar (Manahan, 2000).

Toksisite testlerinde en sık kullanılan alg türleri, Chlorophyta (yeşil algler), Chrysophyta (altın rengi algler), Rhodophyta (kırmızı algler) türleridir. Çeşitli toksisite çalışmalarında en sık kullanılan alg türleri; *Selenastrum capricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia closterium*, *Champia parvula*, ve makroalg *Hormosira banksii* (Atay, 2009).

1.2. Fitoplankton Kültürü

Fitoplanktonik canlılar son derece zengin, karbonhidrat ve özellikle yağ asidi içeriğine sahiptir. Besin değeri yüksek olan bu canlılar su ortamında yaşayan diğer canlılar için en önemli besin kaynaklarıdır. Aynı zamanda balık ve omurgasız canlıların renklenmelerinde önemli rol oynar. Bu özelliklerinden dolayı 100 yılı aşkın zamandan bu yana fitoplankton üretilmesi ve su canlılarının yetiştiriciliğinde kullanılması için çalışmalar yoğun bir biçimde sürdürülmektedir (URL-3).

1.2.1 Fitoplankton kültür ortamı

Fitoplankton kültürlerinde ışık şiddeti, ışığın kalitesi ve süresi önemlidir. Fitoplankton

içerdiği pigmentlerin özelliklerine bağlı olarak ışığın farklı ışınlarını absorbe ederler. Kültür sistemlerinde kullanılan floresan lambalar genellikle alglerin bu ihtiyaçlarını karşılayacak nitelikte ışınları içerir. Kültürlerde hızlı bir büyüme elde etmek için genellikle sürekli aydınlatma yapılır. Ancak kültürleri sürekli aydınlatma her tür için uygun olmayabilir. Bu durumda aydınlatmada fotoperiyod uygulanır. İçerideki mikroalg sistemlerinde genellikle floresan lambalar kullanılır ve kültür kaplarının maksimum aydınlatılmasını sağlayacak şekilde düzenlenirler.

pH değerinin hem çok yüksek hem de çok düşük olması hücresel işlemin bozulmasına neden olduğundan fitoplankton gelişmesi yavaş olacaktır. Yaygın olarak kültürü yapılan alg türleri için pH aralığı 7 ile 9 arasındadır, optimum pH aralığı ise 8,2-8,7 dir. Türler için optimum pH aralığı sağlanmadığı takdirde kültürün çökmesine neden olur. (Lavens ve Sorgeloos, 1996).

Havalandırma, fotosentez için gerekli olan inorganik karbonun kültüre sağlanmasından dolayı da önemlidir. CO₂'in ilavesi pH'nın stabil kalmasını sağlar. CO₂ yeterli miktarda bulunmazsa ortamın pH'sı yükselecektir. Bunun sebebi pH değişimlerine karşı suyun tamponlanmasını sağlayan HCO₃, CO₂ ve hidroksil iyonları arasındaki dengenin bozulmasıdır. Kültürlerin zaman zaman el ile çalkalanması havalandırma için yeterlidir (Cirik ve Gökpınar, 2009).

Sıcaklık toleransı kültürü yapılan türlerin kültür ortamlarındaki nutrient içeriğine bağlı olarak değişebilir. Her türün büyümesi için minimum, maksimum ve optimum sıcaklık aralığı vardır. Kültür ortamının kompozisyonuna bağlı olarak değişmesine rağmen mikroalg kültürleri için optimum sıcaklık genellikle 20 ve 24°C arasındadır. Sıcaklığın uygun duruma getirilmesi alg kültürlerinin korunmasında önemlidir (Lavens ve Sorgeloos, 1996).

Fitoplanktonun büyük bir bölümü hücre çeperlerinin seçici geçirgenliği sayesinde besleyici materyali doğrudan doğruya hücre yüzeylerinden aldıkları için, kültür ortamlarında azot, fosfor, vitaminler ve oligoelementler gibi maddelerin yeterince bulanması gereklidir.

Fitoplankton kültür kapları piramidik, silindirik, küresel, prizmatik şekillerde olabilir. Ancak daima ışık geçirmesi gereklidir. Kültür kabı mutlaka cam tercih edilmelidir. Kültür kaplarının seçimini etkileyen faktörlerden biri de kültürün hangi amaçla yapıldığıdır (Koray, 2011).

1.1.2. Fitoplankton kültüründe büyüme

Fitoplanktonun karakteristik gelişme safhaları beş ayrı aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar aşağıda belirtilmiştir;

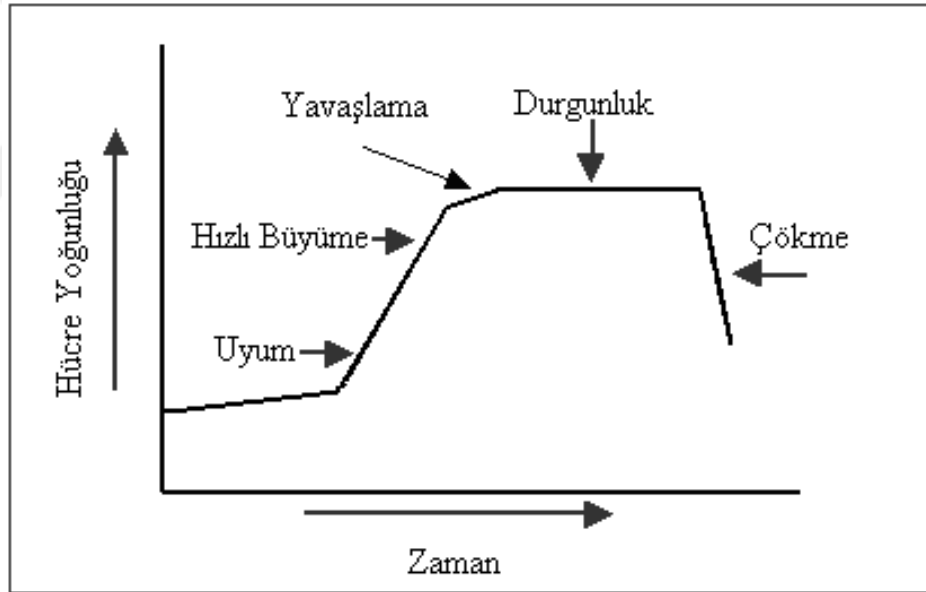
Uyum safhası: Ekimi yapılan fitoplankton hücreleri ortama uyum aşamasında olduğundan gelişmenin nispeten yavaş olduğu safhadır.

Hızlı gelişme safhası: Hücreler düzenli ve sürekli olarak sabit bir oranda bölünmeye başlamaktadır. Bu aşamada gelişme oranı maksimum seviyededir.

Yavaş gelişme safhası: Bu aşama hızlı çoğalma ve durgunluk safhaları arasındaki gelişmenin yavaşladığı safhadır. Bu safha diğer kültür tankına ekim yapılma zamanı olarak tavsiye edilmektedir.

Duraklama safhası: Hücrelerin çoğalma ve yok olma oranlarının eşit olduğu bu evrede, hücre sayılarında herhangi bir değişim olmamaktadır.

Çökme safhası: Bu safhada hücre sayısı ani olarak azalmaya başlar (URL-3).

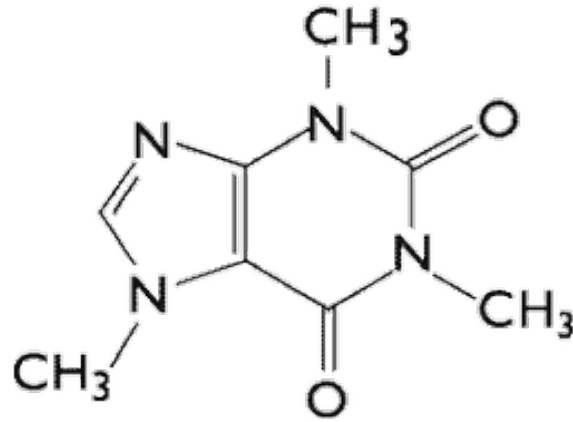


Şekil 1.1. Fitoplankton kültürünün büyüme evreleri

1.3. Kafein

Kafein beyaz kristalize toz şeklinde bulunan, hafif acı ve kokusuz bir maddedir. Kahve (*Coffea arabica*) bitkisinin tohumlarında, çay (*Tea sinensis*) yapraklarında ve kakao (*Theobroma cacao*) ağacının tohumlarında bulunmaktadır. Kafein dört tane azot atomu içeren iki halkalı pürin alkaloid yapısında bir bileşiktir. Alkaloidler ikincil bitki metabolitleri sınıfındadır ve bitki metabolizmasında aminoasitlerden türeyen bazik doğal organik ürünler olarak bilinmektedirler (Duman, 2006). Şekil 1.2.'de kafeinin

moleküler yapısı görülmektedir (URL- 4).



Şekil 1.2. Kafeinin moleküler yapısı

1.3.1. Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Tablo 1.1.'de kafeinin detaylı bir şekilde fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir. Tabloya göre, kafeinin diğer birçok kimyasala göre suda çözünürlüğünün yüksek olduğu görülmektedir (Duman, 2006).

Tablo 1.1. Kafeinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Diğer adı	1,3,7-trimetil-1H-pürin-2,6
Moleküler formülü	$C_8H_{10}N_4O_2$
Moleküler ağırlığı	194,19 g/mol
Yoğunluk	1,23 g/cm ³
Kaynama noktası	178 °C
Çözünürlük	2,17 g/100 mL (25°C)

1.3.2. Kafein tüketimi

Kafein, 60'tan fazla bitki türünde bulunan bir alkoiddir (örneğin; kahve, kakao tohumlarında, çay yapraklarında). Kahve, çay, kakao ve kolanın porsiyon başına düşen kafein miktarları sırasıyla 100 mg, 50 mg, 10 mg ve 40 mg'dır. Küresel olarak, kişi başına ortalama tüketim miktarı günde 70 mg'dır. Fakat bu miktar İngiltere'de 440 mg (çoğunlukla çay), Amerika Birleşik Devletleri'nde 210 mg, İsviçre'de 300 mg'dır (Buerge ve diğ., 2003; Siegener ve Chen, 2002).

Kafein, günlük hayatta hemen her gün tüketilen kahve, çay, kola, enerji içecekleri, çikolata gibi yiyecek ve içeceklerle, reçetesiz satılan ağrı kesiciler, diyet hapları ve antihistaminik ilaçlarla vücuda alınmaktadır. Yapılan araştırmalara göre, insanların günde ortalama 300 miligramdan fazla kafein tükettiği belirtilmiştir (Borone ve

Roberts, 1996). Hatta gün içerisinde, kişiden kişiye değişmekle birlikte alınan kafein miktarı hesaplanırsa, hiç farkında olmadan günde 1 gramdan fazla kafein tüketildiği görülmektedir. Oysa ki pek çok çalışmada, yetişkinlerin güvenli olarak tüketebilecekleri kafein miktarı 300 mg (3-4 fincan kahve ya da 5-6 büyük bardak çay) olarak belirlenmiştir. Çocukların tüketeceği kafein miktarının ise, günde 35-40 miligramı geçmemesi gerekmektedir. Yetişkin ya da çocuklarda aşırı miktarda kafein alımı, ciddi zarar ve ölümlere neden olabilmektedir. Yetişkin bir kişinin günde alacağı aşırı doz 5-10 gram olarak belirlenmiştir. Bu miktar 57 fincan hazır kahve, 86 kahve fincanı kahve ya da 161 çay bardağı çaya karşılık gelmektedir. Çocukların günde alacağı aşırı doz ise, 1 gramdan daha az olarak belirlenmiştir. Bu da 22 tane kutu kolaya karşılık gelmektedir (Ofloğlu, 2007).

1.3.3. Kafein metabolizması

Kafein alımından sonra, kafeinin hemen hemen tamamı (%99) hızlı bir şekilde mide bağırsak kanalından (gastrointestinal sistem) emilir ve 30-120 dakika sonra doza bağımlı olarak kan plazmasında en yüksek seviyesine erişir. Hidrofobik özelliğinden dolayı bütün biyolojik zarlardan geçerek hücrelere ulaşır. Kafeinin % 5'inden daha azı ürine çevrilmeden kalır. Çalışmalar kafeinin insan vücudunda değişmeden veya metabolitleri şeklinde kaldığını ve sonuçta üre olarak atıldığını göstermiştir (Boyd ve diğ., 2003).

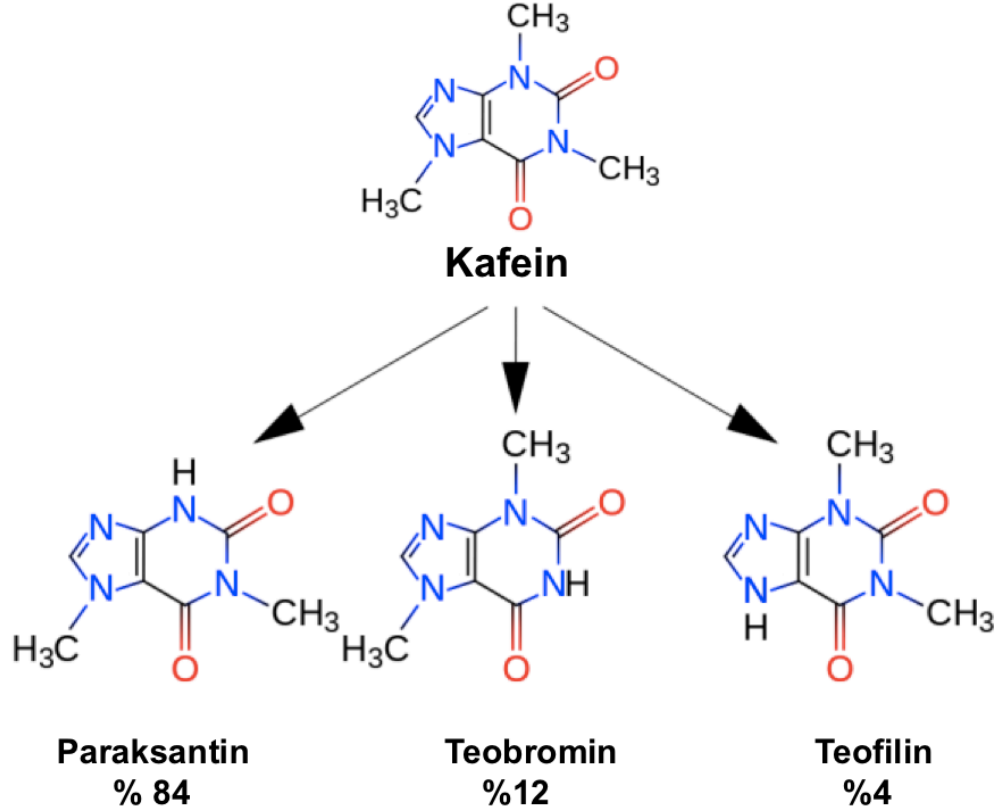
İnsanda kafein için normal plazma seviyesi 5-20 μM olarak belirtilmiştir. 300 mg'lık kafein alımından 1-2 saat sonra plazmadaki kafein seviyesi 39-46 μM 'dır. Yetişkin insanlarda kafein için kan-beyin bariyeri ve plasental bariyer bulunmamaktadır.

Kafeinin insanda metabolizmasına göre; hepatik sitokrom enzimi tarafından demetilasyona uğratarak paraksantine (1,7-dimetilksantin) dönüştürülür. Bu basamak kafein metabolizmasının ilk basamağını oluşturmakla birlikte, metabolizmanın % 72-80'ini kapsar. Kafein daha düşük oranda da teobromin (3,7-dimetilksantin) ve teofilin (1,3-dimetilksantin) dönüşür. Paraksantin, aynı enzim tarafından demetilasyonla 1-metilksantine dönüşür ve sonunda 1-metil ürik asit oluşur (Ofloğlu, 2007).

1.3.4. Paraksantin

Bitkilerde bulunmaz. İnsan ve hayvanlarda kafeinin metabolizması ile oluşur. Farklı fizyolojik etkilere sahiptir. Kafein gibi merkezi uyarıcı etkinliği vardır. Kafeinden farklı

olarak Na^+/K^+ ATPaz'ın enzimatik etkisini artırarak iskelet kas dokusuna potasyum iyonlarının girişine neden olur. Aynı zamanda kas dokusunda kalsiyum miktarını da artırır (URL-5).



Şekil 1.3. Kafein bileşenleri

1.3.5. Su ortamlarına kafein girdisi

Kafeinin atıksu arıtma tesisi çıkışında ve sucul ortamlarda eser miktarlarda dahi tespit edilmesi ve bunların sucul ortamlardaki canlılara olan olumsuz etkilerinin ortaya çıkması, atıksu arıtma tesisi dizaynlarına yeni yaklaşımların getirilmesine neden olmuştur. Geleneksel atıksu arıtma tesisleri büyük hacimlerde ve tesise düzenli gelen organik ve inorganik maddelerin giderimi üzerine projelendirilmiştir. Dolayısıyla kafein gibi maddelerin giderimi yeterli oranda sağlanamamaktadır (Roberts ve Thomas, 2006).

Yapılan birçok çalışmada kafeinin atıksu arıtım tesislerinde tamamıyla giderilmediği ve çıkış sularında yer aldığı bulunmuştur (Gagne ve diğ., 2006; Metcalfe ve diğ., 2003; Roberts ve Thomas, 2006; Ternes, 1998). İsviçre atıksu arıtma tesislerinde girişte ölçülen kafein miktarı 7-73 µg/L iken çıkışta kafein miktarı 0,03-9,5 µg/L olarak tespit edilmiştir (Buerge ve diğ., 2003). Atıksu çıkış sularındaki kafeinin konsantrasyonu,

Amerika'da 100 µg/L, Kanada'da 20-300 µg/L, İsveç'te 34 µg/L olarak ölçülmüştür (Boyd ve diğ., 2003). Almanya'da atıksu arıtma tesisi girişinde kafein konsantrasyonu 76- 147 µg/L, çıkışında ise 0,009-0,19 µg/L ölçülmüştür (Ternes ve diğ., 2001). Atıksu arıtma tesislerinin çıkış sularında yer alan kafeinin alıcı ortama deşarj edilmesi sonucunda kafein yüzey sularına, yeraltı sularına ve içme sularına karışmaktadır (Bendz ve diğ., 2005; Heberer, 2002; Sacher ve diğ., 2001).

Güven ve Çetintürk (2003) tarafından Taş Köprü deresinde (Yalova) ve Marmara Denizi'nde kafein varlığı tespit edilmiştir.

Literatürde deniz suyundaki kafein konsantrasyonları Tablo 1.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 1.2. Deniz suyunda bulunan kafein konsantrasyonları

Denizsuyu	Konsantrasyon (ng/L)	Kaynak
Kuzey Denizi	2-16	Weigel, 2002
Massachusetts Körfezi	5-71	Siegener, 2002
Boston Körfezi	140-1600	Siegener, 2002
Akdeniz	4-5	Buerge ve diğ., 2003

1.3.6. Kafein toksisitesi ve canlılar üzerine etkisi

Fraker ve Smith (2004) tarafından yapılan bir çalışmada kafein içeren bazı organik atıksu kirleticilerinin kuzey leopar kurbağa yavrusunda (*Rana pipiens*) davranışsal ve fizyolojik etkileri olduğu gözlemiştir. Gagne ve diğ. (2006) kafeinin alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) için çok toksik olmamasına rağmen hepatositlerinde, 15°C'de 48 saat maruz kaldıktan sonra 14 µM bir eşik konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu üretildiğini bildirmiştir. Ayrıca, alabalık mikrozoamları kafein ile in vitro inkübasyonu sonucu 30°C'de 60 dakikadan sonra mikrozoamlarda hem lipid peroksidasyonu ve hem de NADPH oksitleme hızı artmıştır. Bu sonuç kafein maruziyetinin litre başına düşük miligramın oksidatif hasara yol açabileceğini düşündürmüştür.

Diğer çalışmalar kafeinin çevredeki konsantrasyonlarının sucul organizmalar için bir tehdit olmadığını düşündürmektedir. Smith ve Burgett (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, kafeinin çevresel konsantrasyonları (0,6-600 µg/L) Amerikan kurbağası yavrularında (*Bufo americanus*) hayatta kalma veya herhangi bir aktiviteyi etkilemediğini bildirmiştir. Kafein maruziyeti su piresi *Ceriodaphnia dubia*'nin (LC₅₀= 44 mg/L) üremesini azaltmış ve yassı kafalı golyan balığı *Pimephelas promelas*'in

(LC₅₀= 71 mg/L) büyümesini inhibe etmiştir (Moore ve diğ., 2008). Yazarlar literatürde yer alan çevresel konsantrasyonları göz önüne alındığında, kafein hem sucul omurgalı hem de omurgasız canlılar için önemsiz risk teşkil gerektiği sonucuna varmış ve kafeinin çevresel düzeylerde uzun süreli maruziyeti sonucunda potansiyel etkiler olabileceğine dikkat çekmiştir.

Az sayıda çalışmada, deniz organizmaları üzerinde kafeinin etkilerini incelenmiştir. Cheney (1945) tarafından yapılan bir çalışmada kafein oksijen tüketimini ve deniz kestanesi *Arbacia punctulata*'nın döllenmiş yumurtalarında bölünmenin normal oranını etkilediği bulunmuştur. Nath ve Rebhun (1976) kafein maruziyetinin deniz kestanesi yumurtalarında mitoz inhibisyonunu rapor etmiştir. Kafeinin hücre içi protein fosforilasyon seviyeleri üzerindeki etkisi nedeniyle, tropikal deniz anemonu *Aiptasia pulchella*'nin görünüşte beyazlaşmasına neden olmuştur (Sawyer ve Muscatine, 2001). Kafeine maruz kalma süresinin uzaması *A. pulchella* türünden salınan simbiyotik yosun oranında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Mercan endosimbiyontu dört türün üzerinde 60 mg/L kafeine maruz bırakılmış alg kültürlerinde fizyolojik stres yanıtı, fotosentez ve glikoliz ile ilişkili proteinlerin aktivasyon veya represyonu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Pollack ve Ogunseitan, 2009). Heatshock proteinleri (HSP) mercan endosimbiyontu olan *Symbiodinium sp.* türünde üç kat aktivasyon, *Symbiodinium goreau* türünde dokuz kat represyon görülmüştür.

1.4. İzmit Körfezi

İzmit Körfezi Marmara Denizi'nin kuzeydoğu bölümünde 40°41'-40°47' Kuzey, 29°21'-29°57' Doğu koordinatları arasında yer almaktadır. Yaklaşık 49 km uzunluğa, 2-10 km'ler arasında değişen genişliklere ve 310 km²'lik yüzey alanına sahip yarı kapalı bir basendir (Ünlü ve Alpar, 2004). Dar geçitlerle doğu, merkez ve batı bölümlerine ayrılır. Doğu bölümü yaklaşık 15 km uzunlukta ve ortalama 30 m derinliktedir. Körfezin en büyük bölümü olan merkez basenin en derin yeri 208 m'dir (Kuşçu ve diğ., 2002) ve batı baseninden 2,7 km genişlik ve 45 m derinlikte olan bir eşikle ayrılır. Batı baseni batıya doğru 150 m'den 300 m'ye kadar derinleşir ve körfezi Marmara'ya bağlar (Balkis, 2003). Körfez, kuzeyinde 350 m güneyinde 1601 m'ye varan doğu-batı doğrultusunda uzanan yükseltilerle çevrilidir (ÇDR, 2015).

Kocaeli'nin kuzeyinde Karadeniz, doğu ve güneydoğusunda Sakarya, güneyinde Bursa, batısında Yalova ve İstanbul illeri yer almaktadır. Yüzölçümü 3418 km²'dir. TÜİK (2015) raporuna göre 2015 yılında Kocaeli'nin nüfusu 1.780.055'dir (URL-6).

Avrupa'yı Anadolu'ya ve Ortadoğu'ya bağlayan önemli kara, deniz ve demiryolu ulaşım ağlarının merkezinde bulunan Kocaeli'nin büyük metropollere yakınlığı ve Karadeniz ve Marmara ile bağlantısının bulunması sanayi, ticaret, ulaşım ve lojistik merkezi olarak gelişmesine etken olmuştur.

1.4.1. İzmit körfezi deşarjları ile ilgili bilgiler

İSU Genel Müdürlüğü, Atıksu Scada Sistemi ile OSB kuruluşları ve sanayi tesislerinin ana kolektörlere bağlantı noktalarında 10 adet ve kurum tarafından işletilmekte olan atıksu arıtma tesislerinin giriş ve çıkışlarında 12 adet kimyasal parametre değerlerinin izlendiği SCADA merkezi tarafından kayıt altına alınmaktadır.

Bu kapsamda 17 adet sanayi tesisi kolektör hattına deşarj etmekte olup, 5 adet OSB kuruluşlarının alıcı ortama deşarj etmektedir. Alıcı ortama deşarj eden OSB'ler kimyasal parametre olarak sürekli takip edilmektedir.

Kocaeli'de işletilmekte bulunan 4 adeti ileri biyolojik olmak üzere toplam 16 adet atıksu arıtma tesisinden 2014 yılında toplam 121.358.302 m³ atıksu arıtılarak alıcı ortama deşarj edilmiştir (ÇDR, 2015).

Literatürde kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki en önemli metabolit olan paraksantin *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalması üzerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya açık literatürde rastlanmamıştır. Bu araştırmadan elde edilecek sonuçların kafein ve en önemli metaboliti olan parakasinin fitoplankton türleri üzerindeki etkileri ile ilgili veri sağlayacağı düşünülmektedir. Elde edilecek veriler atıksu deşarjlarının yapıldığı kıyı ekosistemlerindeki fitoplankterlerin ve kıyı ekosistemi besin zincirinde yer alan diğer türlerin kafein maruziyeti hakkında fikir verecektir.

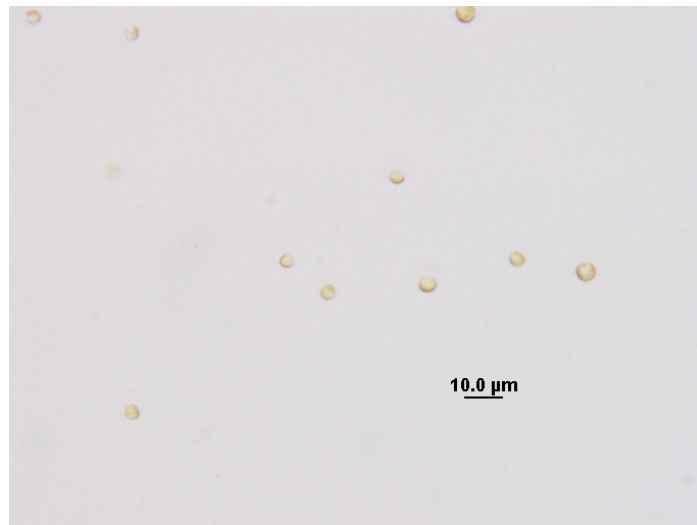
2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. *Isochrysis galbana*

İki düz flagella ve bir körelmiş haptonema içerirler. Bu iki flagella hücrenin uç kısmında bulunur. Hücreler suda hızlı hareket ederken kendi etrafında rotasyon hareketiyle yüzerler. Yuvarlak hücreler 4-8 µm çapındadır. Kloroplast bir fincan şeklindedir ve hücrenin 1/3'ünü kaplar (Güner ve Aysel, 1997; Koray, 2011). *I. galbana* bivalve larvalarının beslenmesinde çok yaygın olarak kullanılır. Besin değerleri oldukça iyidir (Okauchi, 1991). *I. galbana*'nın mikroskopik görüntüsü Şekil 2.1.'de gösterildi. Sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Kingdom	:Chromista
Phylum	:Haptophyta
Class	:Coccolithophyceae
Subclass	:Prymnesiophycidaea
Ordo	:Isochrysidales
Family	:Isochrysidaceae
Genus	:Isochrysis
Species	: <i>Isochrysis galbana</i> Parke 1949 (URL-7)

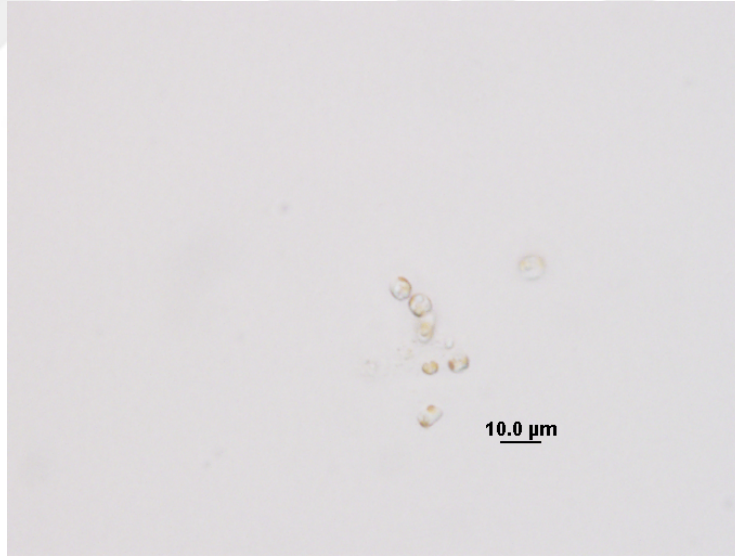


Şekil 2.1. *Isochrysis galbana*

2.1.2. *Thalassiosira pseudonana*

Thalassiosira pseudonana denizel bir diatom türüdür. Çapı 2,5-15 µm çapı aralığında, tek başına ya da 6 uzun zincirli hücreden olabilir. *T. pseudonana* yüksek bir yağlı asit kompozisyonuna sahip olduğundan akuakültür için yararlı bir organizma olduğu bulunmuştur (Volkman ve diğ., 1989). Genom dizileme için ilk ökaryotik denizel fitoplankton olarak seçilmiştir (Armbrust, 2004). *T. pseudonana*'nın mikroskopik görüntüsü Şekil 2.2.'de gösterildi. Sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Kingdom	:Chromista
Phylum	:Bacillariophyta
Class	:Mediophyceae
Subclass	:Thalassiosiraphycidae
Ordo	:Thalassiosirales
Family	:Thalassiosiraceae
Genus	:Thalassiosira
Species	: <i>Thalassiosira pseudonana</i> Hasle & Heimdal 1970 (URL-8)



Şekil 2.2. *Thalassiosira pseudonana*

2.2. Metot

2.2.1. Materyallerin toplanması ve muhafaza koşulları

2.2.2. Fitoplankton kültürlerinin ortam koşulları

I. galbana ve *T. pseudonana* türleri saf kültür olarak National Center for Marine Algae and Microbioata (NCMA) Bigelow Laboratuarlarından 15 mL'lik tüpler halinde satın

alındı. Bu alglerin CCAP kültür numaraları Tablo 2.1’de verildi.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan ve ticari olarak satın alınan fitoplankton türü ve CCAP kültür numaraları (URL-9; URL-10)

Türler	CCAP Kültür Numaraları
<i>Isochrysis galbana</i>	CCAP 1323
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCAP 1335

Saf kültürler halinde ticari olarak alınan fitoplankton türleri Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Araştırma laboratuvarında bulunan iklimlendirme kabininde muhafaza edildi. Kültürlerin çoğaltılması ve deneyler de aynı iklimlendirme kabininde yapıldı. Çalışmada kullanılan fitoplankton kültürünün sıcaklığı 15 ± 2 °C’ta, f/2 besin ortamında, deniz suyu tuzluluğu 32,5, pH 7,8-8,5 aralığında, 8000 lux ve 14/10 gündüz gece ışık periyodunda tutuldu.

2.2.2. Çalışmada kullanılan malzemelerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin tümü bulaşık makinesinde yıkandıktan sonra %10’luk nitrik asit buharında en az 24 saat bekletildi. Asitten çıkarılan cam malzemeler distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Çalışmada kullanılan cam malzemeler, deniz suyu, selüloz tıpa, ependorf tüpleri ve pipet uçları otoklavda 121°C’ta 20 dk süreyle steril edildi.

Deniz suyu hazırlanması için 800 mL’lik beherin içine 500 mL distile su ve 18,4 g deniz tuzu eklendi. Manyetik balık kullanılarak karıştırıcı da yaklaşık 30 dakika karıştırıldı. Vakumlu filtre ile 47 mm, 0,22 µm göz açıklığına sahip membran filtre kağıdından süzüldü. Süzülen deniz suyundan 500 mL balon jöjeye aktardı. Balon jöjenin ağız kısmına pamuk ve üzerine alüminyum folyo kapatılarak 121°C’ta 20 dk süreyle otoklavda steril edildi.

2.2.3. Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması

Fitoplankton kültürü için SIGMA-GUILLARD’S f/2 besin ortamı kullanıldı. Steril kabinde 50 mL’lik santrifüj tüplerine alınan f/2 çözeltileri buzdolabında muhafaza edildi. Fitoplankton kültürlerine aktarılmadan önce buzunun erimesi ve oda sıcaklığına ulaşması beklenildi.

Toz halinde bulunan kafein oda sıcaklığında muhafaza edildi. İstenileb kafein miktarları hassas terazide ölçüldükten sonra, çalışmada kullanmak için steril kabinde

15 dk UV sterilizasyon yapıldı.

Paraksantin için 200 mg/L'lik 500 mL stok çözelti hazırlandı. Temiz 500 mL HDPE şişeye 100 mg paraksantine 500 mL distile su eklendi, 100 rpm 30 dk çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan stok çözelti buzdolabında muhafaza edildi. Fitoplankton kültürlerine aktarılmadan önce buzunun erimesi ve oda sıcaklığına ulaşması beklenildi.

Tablo 2.2. F/2 besin ortamının içeriği

İçindekiler	mg/L
Biyotin	0,005
Kobalt klorür 6H ₂ O	0,01
Küprük sülfat 5H ₂ O	0,01
EDTA disodyum 2H ₂ O	4,36
Ferrik klorür 6H ₂ O	3,15
Manganaz klorür 4H ₂ O	0,18
Sodyum molibdat 2H ₂ O	0,006
Sodyum nitrat	75,0
Sodyum fosfat monobazik	4,411
Tiamin HCl	0,1
Vitamin B12	0,005
Çinko sülfat	0,022

2.2.4. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler

Çalışma boyunca kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler Tablo 2.3.'de belirtildi.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler

Cihaz, malzeme ve kimyasal adı	Özellikleri
Etil alkol	Merck
Bulaşık makinesi	Arçelik, 6230
Buzdolabı	Arçelik
Cam mezür 100 mL- 500 mL	Isolab
Cam pipet 5 mL, 10 mL	Isolab
Deniz tuzu	Red Sea
Ependorf tüpü 1,5 mL	Isolab
Ependorf tüpü stantı	Isolab
Erlenmayer 250 mL	Isolab
F/2 çözeltisi	SIGMA GUILLARD'S (f/2)
Filtre kağıdı 0,22 µm	Whatman

Tablo 2.3.(Devam) Çalışmada kullanılan cihaz, malzeme ve kimyasal maddeler

Formaldehit	Merck
Hassas terazi	AND GR-200
Kafein	Sigma-Aldrich
Karıştırıcı	Heidolph MR-Hei Standart
Kültür ortamı iklimlendirme kabin	SANYO, MIR-153
Nitrit asit	Merck
Otoklav	HICLAVE HG-20
Otomatik mikropipet 10-1000 µL	Nichipet EX
Otomatik pipet ucu (1 mL)	AXYGEN
Paraksantin	Sigma- Aldrich
pH metre	WTW Ph 315i/SET
Pipet pompası	Isolab
Selüloz tıpa	Isolab
Steril kabil	ESCO, PCR Cabinet
Thoma lamı	ISOLAB
Tuzluluk ölçer	Multi 3410 SET 7
Uzun boyunlu balon joje 500 mL	Isolab
Vakumlu filtre sistemi	Sartorius

2.2.5. Kafein ve paraksantin fitoplankton kültürlerine aktarılması

Kafein ve paraksantin fitoplankton kültürlerine aktarılması, kültürlerin ekim işlemleri steril kabinde yapıldı. *I. galbana* ve *T. pseudonana* kültürleri için 250 mL erlenmayer içine 100 mL deniz suyu, 2 mL f/2 çözeltisi ve 10 mL bir önceki kültürden örnek alınarak ekim işlemi yapıldı, selüloz tıpa ile erlenmayerin ağzı kapatılarak inkübasyona bırakıldı.

Çalışmada 0. saat, 12. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat ve 96. saat olmak üzere farklı kafein ve paraksantin konsantrasyonun fitoplankter türlerine uygulanması OECD 201 standardı temel alınarak tamamlandı (OECD, 2011).

Kafein konsantrasyonu için gerekli olan miktarlar hassas terazide alüminyum folyo üzerinde tartıldı. Steril kabinde 15 dk UV sterilizasyon yapıldı. İki gün öncesinde ekimi yapılan kültürler etiketlendi. *I. galbana* kültürüne 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 450 mg/L, 500 mg/L ve *T. pseudonana* kültürüne 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 450 mg/L, 500 mg/L ve 550 mg/L konsantrasyona sahip olacak şekilde ölçülen kafein toz halinde kültürlerin için döküldü, hafifçe çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Kontrol kültürlerine kafein uygulanmadı.

Paraksantin stok çözeltisi sadece *I. galbana* türüne uygulandı. 10 mg/L, 100 mg/L ve 150 mg/L paraksantin konsantrasyonlarının her biri için birer kontrol grubu oluşturuldu. Her bir kültür kabına 100 mL deniz suyu, 2 mL f/2 ve 10 mL önceki kültürden aşılandı ve paraksantin uygulaması için iki gün inkübasyona bırakıldı. Kültür kapları etiketlendi. 10 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L etiketli kültürlerden sırasıyla 5,7 mL, 57 mL, 85,5 mL örnek alındı. Yerine paraksantin stok çözeltisinden 5,6 mL, 56 mL ve 84 mL, f/2 çözeltisinden 100 µL, 1 mL, 1,5 mL eklendi. Kontrol grubuna paraksantin stok çözeltisi yerine aynı oranda deniz suyu ve f/2 çözeltisi eklendi.

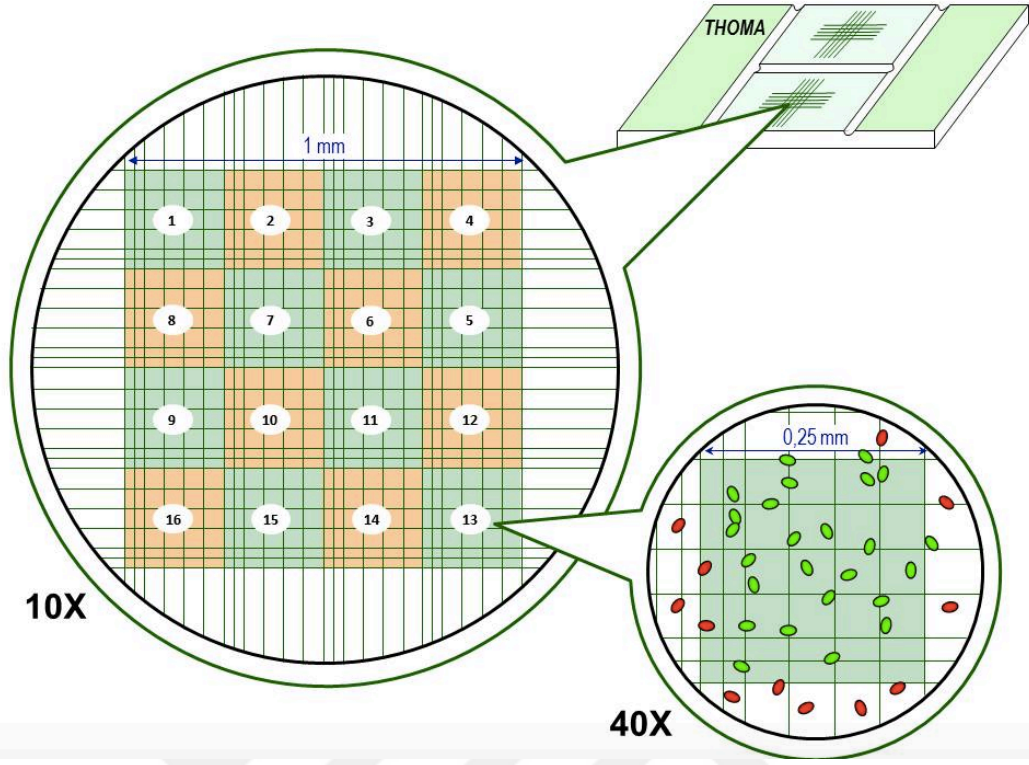
Çalışmada kafein ve paraksantin uygulanan kültürler 96 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte steril kabin içinde 1 mL örnek alındı. Ependorf tüpüne alınan örneklerle 100 µL %37'lik formaldehit ile fikse edildi.

Fitoplankter türlerine uygulanan konsantrasyon aralığı, birey sayısı ve büyüme parametreleri için doz-cevap ilişkisine bağlı olarak IC₅₀ değerinin belirlenmesi amacıyla seçildi. *I. galbana* türü için inhibisyon konsantrasyonu belirlenirken 8 farklı kafein konsantrasyonu (1, 100, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500 mg/L) kullanıldı. *T. pseudonana* türü için inhibisyon konsantrasyonu belirlenirken 6 farklı kafein konsantrasyonu (1, 100, 250, 450, 500 ve 550 mg/L) kullanıldı. *I. galbana* türü için inhibisyon konsantrasyonu belirlenirken 3 farklı paraksantin konsantrasyonu (10, 100 ve 150 mg/L) kullanıldı.

2.2.6. Hücrelerin sayımı

Kültürlerden 0., 24., 48., 72., ve 96. saatlerde alınan, fikse edilmiş örnekler Thoma lamında inverted mikroskop kullanılarak hücre sayımları yapıldı. Her bir sayım örneğinden 100 µL alınarak sayım kamarasına yerleştirildi, örnek üç kez sayıldı ve aritmetik ortalaması alındı.

Fitoplankton hücre sayımında yaygın olarak kullanılan Thoma tipi sayım kamarasında en büyük karenin ebatları 1 mm x 1mm'dir. Sayım odacığında büyük, orta ve küçük kareler bulunur. Büyük bir karede genellikle 16 adet kare bulunurken, 25 adet orta büyüklükte kareye, orta büyüklükte bir karede 25 adet küçük kareye sahiptir. Rastgele 5 tane orta büyüklükte kare seçilerek, bu karelerde kalın çizgilerle çevrelenmiş olan alan içerisinde kalan tüm hücreler mikroskop altında sayılır. Sayımı yapılan kareyi çevreleyen üst ve sol kenar çizgisine dokunan hücreler sayılırken, alt ve sağ kenar çizgisine dokunanlar sayılmaz (URL-3).



Şekil 2.3. Thoma lamı (URL-11)

Fitoplankton birey (hücre) sayısı (adet/mL) aşağıdaki Denklem 2.1.'e göre hesaplanabilir;

$$(N_1 + \dots + N_5) / 5 \times 16 \times (1000 / 0,1) = (N_1 + \dots + N_5) / 5 \times 16 \times 10000 \quad (2.1)$$

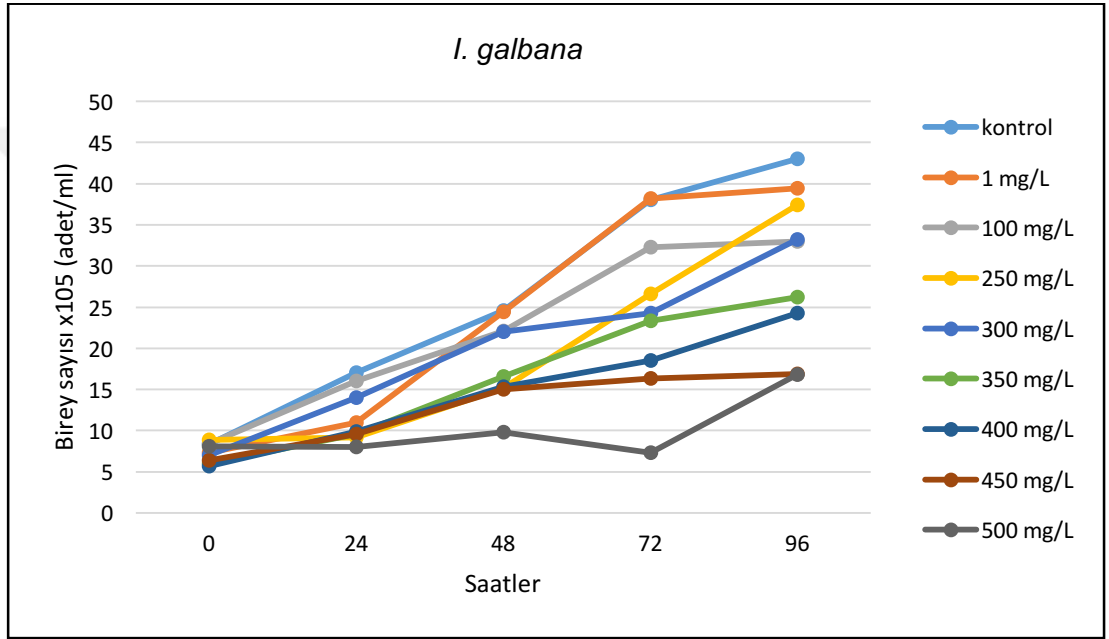
2.3. Verilerin İstatiksel Analizi

Sayımlar en az 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. Tekrarların aritmetik ortalaması alındı ve standart sapmaları hesaplandı. Sayım işlemlerinin hassasiyeti ONE WAY ANOVA ile istatistiksel olarak test edildi. Test uygulamalarında Microsoft Excel ve SPSS programlarından yararlanıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *Isochrysis galbana* Türüne Kafeinin Etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı kafein konsantrasyonu uygulanan *I. galbana* türünün birey sayısındaki değişiklikler Şekil 3.1.' de gösterildi.



Şekil 3.1. Farklı kafein konsantrasyonlarının *I. galbana* türünün birey sayısına etkisi

I. galbana türünün başlangıç (0. saat) birey sayıları $5,7 \times 10^5$ – $8,9 \times 10^5$ adet/mL arasında değişiklik gösterirken, 96 saatin sonunda birey sayıları 16×10^5 – 43×10^5 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 1.781.333 adet/mL iken, kafein uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Kafein konsantrasyonları uygulanan gruplarda birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 100 mg/L, 300 mg/L, 1 mg/L, 400 mg/L, 350 mg/L ve 450 mg/L, 250 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonda olduğu görüldü.

Kırk sekiz saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 2.464.000 adet/mL iken, kafein uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu olduğu görüldü. Kafein

konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L, 350 mg/L, 400 mg/L ve 250 mg/L, 450 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

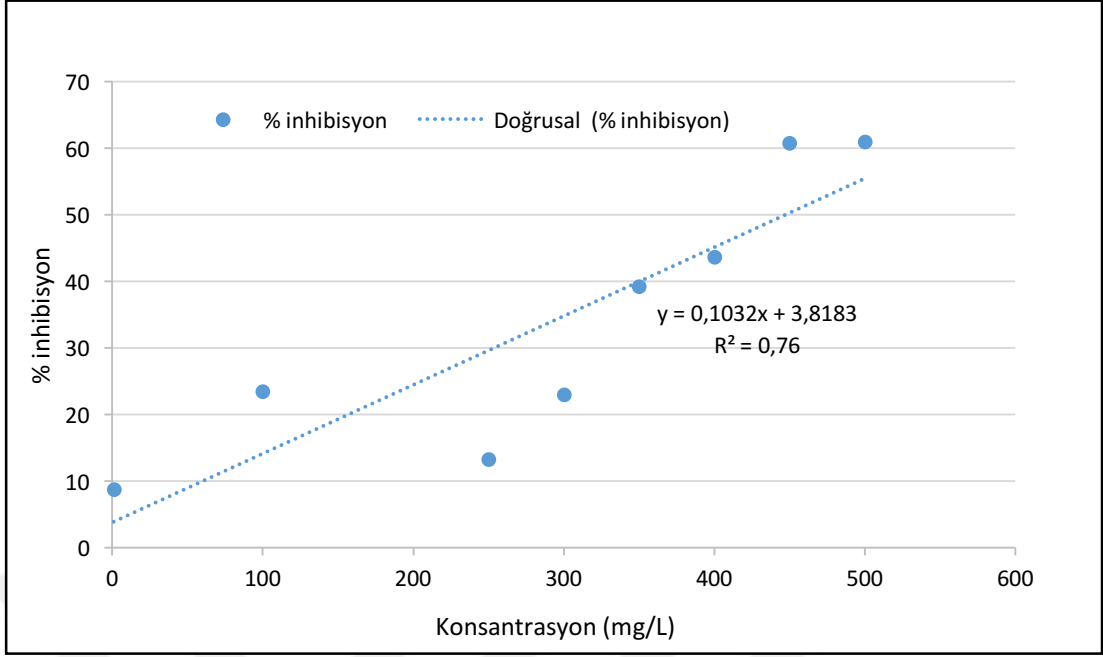
Yetmiş iki saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 3.808.000 adet/mL iken, kafein uygulanan grupların birey sayıları 1 mg/L grubu haricinde daha düşük olduğu görüldü. 1 mg/L kafein uygulanan grubun birey sayısı 3.822.666 adet/mL olup kontrol grubundan daha yüksek birey sayısına sahip olduğu görüldü. Kafein uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 450 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda kontrol grubu 4.320.000 adet/mL birey sayısına ulaştı. Kafein konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 250 mg/L, 300 mg/L, 100 mg/L, 350 mg/L, 400 mg/L, 450 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü. Kafein en çok 500 mg/L konsantrasyon uygulanan grubunda birey sayısını etkilediği görüldü.

SPSS programında yapılan ANOVA, Tukey HSD, LSD ve Tamhane testi ile istatistik analizleri sonuçları değerlendirildi. Önemlilik değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirildi. 96 saat sonunda %95 güvenle, tüm kafein konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F = 21.469$; $df = 23$; $P < 0,00$).

3.1.1. *Isochrysis galbana* türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon

Çalışmada 96 saat sonunda *I. galbana* türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon (%) değerleri Şekil 3.2'de belirtildi.

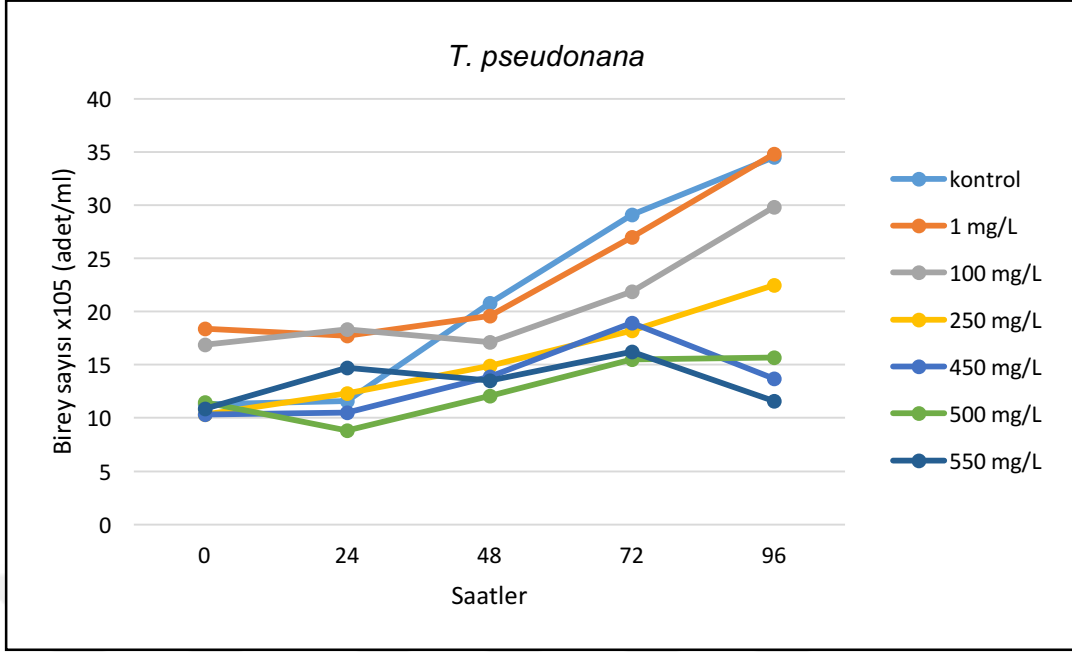


Şekil 3.2. *I. galbana* 'da kafeinin neden olduğu inhibisyon (%)

İnhibisyon değeri (%), 96 saat sonunda farklı kafein konsantrasyonuna maruz kalan *I. galbana*'nın birey sayısı kontrole göre kıyaslanarak belirlendi. Doksan altı saat sonunda *I. galbana* türüne uygulanan 1, 100, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500 mg/L kafein konsantrasyonu sırasıyla %8, %23, %13, %22, %39, %43, %60 ve %60 oranında inhibe ettiği görüldü. İnhibisyon konsantrasyon (IC_{50}) değeri 447 mg/L olarak belirlendi.

3.2. *Thalassiosira pseudonana* Türüne Kafeinin Etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı kafein konsantrasyonu uygulanan *T. pseudonana* türünün birey sayısındaki değişiklikler Şekil 3.3.' de gösterildi.



Şekil 3.3. Farklı kafein konsantrasyonlarının *T. pseudonana* türünün birey sayısına etkisi

T. pseudonana türünün başlangıç (0. saat) birey sayıları 10×10^5 – 18×10^5 adet/mL arasında değişiklik gösterirken, 96 saatin sonunda hücre sayıları 11×10^5 – 34×10^5 adet/mL ulaştı.

Yirmi dört saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 1.162.667 adet/mL iken, kafein uygulanan gruplardan 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L ve 550 mg/L konsantrasyonlarındaki birey sayılarının daha yüksek olduğu görüldü. Kafein konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 100 mg/L, 1 mg/L, 550 mg/L, 250 mg/L, 450 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Kırk sekiz saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 2.080.000 adet/mL iken, kafein konsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Kafein konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 450 mg/L, 550 mg/L ve en düşük 500 mg/L konsantrasyonlarında olduğu görüldü.

Yetmiş iki saat sonunda kontrol grubunun birey sayısı 2.912.000 adet/mL iken, kafein konsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü. Kafein konsantrasyonları uygulanan gruplardaki birey sayısı, kontrol grubu ile

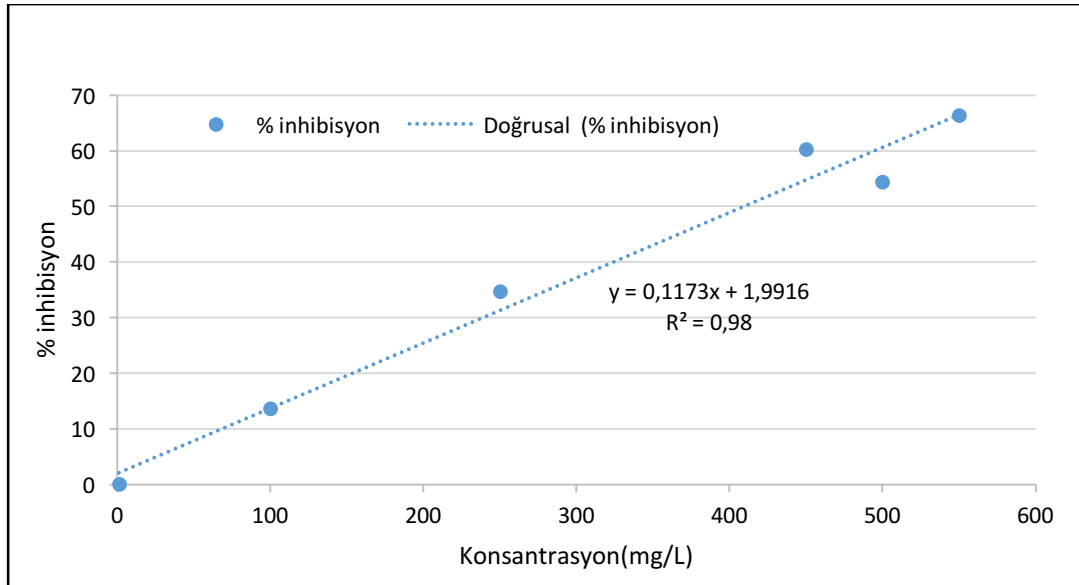
karşılaştırıldığında en yüksek birey sayısından en düşük birey sayısına sahip olan kültürlerin sırasıyla 1 mg/L, 100 mg/L, 450 mg/L, 250 mg/L, 550 mg/L ve en düşük 500 mg/L olduğu görüldü.

Doksan altı saat sonunda kontrol grubu 3.456.000 adet/mL birey sayısına ulaştı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 96 saat sonunda en yüksek birey sayısı 3.488.000 adet/mL ile 1 mg/L kafein uygulanan grupta, en düşük birey sayısı 1.162.667 adet/mL ile 550 mg/L kafein uygulanan grupta olduğu görüldü. 96 saat sonunda 1 mg/L kafein konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının, kontrol grubundan yüksek olduğu görüldü. Kafein en çok 550 mg/L konsantrasyon uygulanan grubun birey sayısını etkilediği görüldü.

SPSS programında yapılan ANOVA, Tukey HSD, LSD ve Tamhane testi ile istatistik analizleri sonuçları değerlendirildi. Önemlilik değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirildi. 96 saat sonunda %95 güvenle, tüm kafein konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($F = 11.239$; $df = 17$; $P < 0,00$).

3.2.1. *Thalassiosira pseudonana* türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon

Çalışmada 96 saat sonunda *T. pseudonana* türüne kafeinin neden olduğu inhibisyon (%) değerleri Şekil 3.4'de belirtildi.



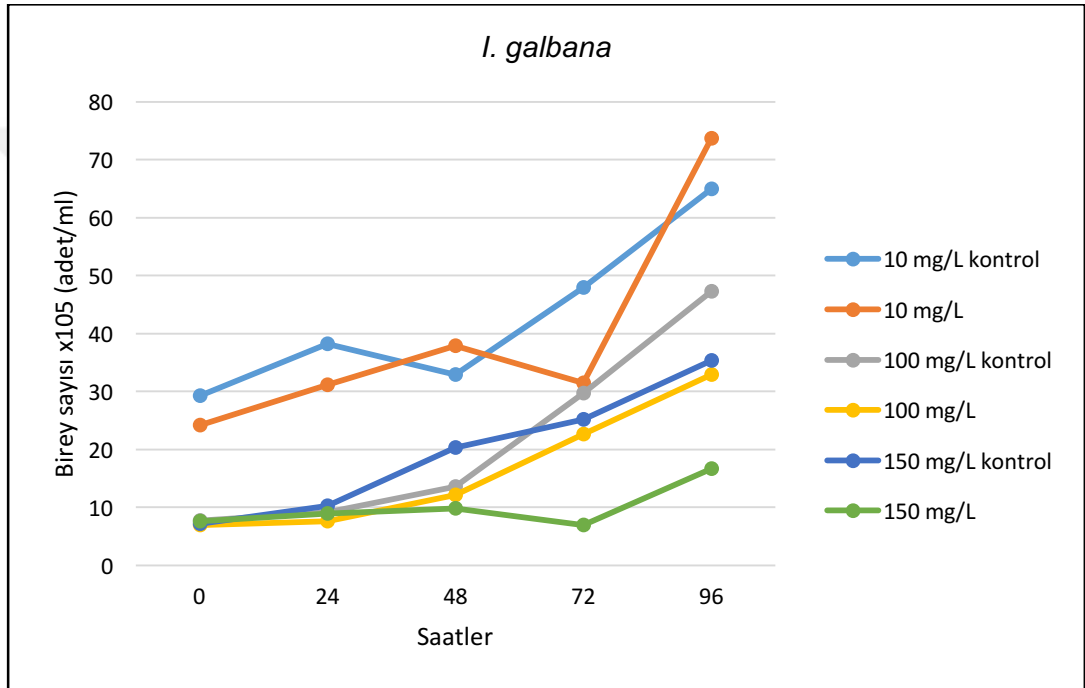
Şekil 3.4. *T. pseudonana*'da kafeinin neden olduğu inhibisyon (%)

Inhibisyon değeri (%), 96 saat sonunda farklı kafein konsantrasyonuna maruz kalan *T. pseudonana*'nın birey sayısı kontrole göre kıyaslanarak belirlendi. Doksan altı saat

sonunda 1 mg/L kafeinin konsantrasyonu *T. pseudonana*'nın büyümesini inhibe etmediği (%0) görüldü. 100, 250, 450, 500 ve 550 mg/L kafein konsantrasyonu sırasıyla %13, %34, %60, %54 ve %66 oranında inhibe ettiği görüldü. İnhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değeri 409 mg/L olarak belirlendi.

3.3. *Isochrysis galbana* Türüne Paraksantin Etkisi

Çalışmada 96 saat boyunca farklı paraksantin konsantrasyonu uygulanan *I. galbana* türünün birey sayısındaki değişiklikler Şekil 3.5.' de gösterildi.



Şekil 3.5. Farklı paraksantin konsantrasyonlarının *I. galbana* türünün birey sayısına etkisi

I. galbana türünün başlangıç (0. saat) birey sayıları 6×10^5 – 29×10^5 adet/mL arasında değişiklik gösterdi.

Yirmi dört saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 3.829.333 adet/mL iken, 10 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 3.125.333 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 922.667 adet/mL iken, 100 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 768.000 adet/ml olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.034.667 adet/mL iken, 150 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 896.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol grupları ile

karşılaştırıldığında, farklı paraksantin konsantrasyonu uygulanan grupların birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Kırk sekiz saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 3.296.000 adet/mL iken, 10 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 3.797.333 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 1.360.000 adet/mL iken, 100 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 1.221.333 adet/mL olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 2.037.333 adet/mL iken, 150 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 981.333 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, paraksantin konsantrasyonu uygulanan 10 mg/L grubunun birey sayısının daha yüksek, 100 mg/L ve 150 mg/L grubunun birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

Yetmiş iki saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 4.800.000 adet/mL iken, 10 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 3.159.333 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 2.976.000 adet/mL iken, 100 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 2.266.667 adet/mL olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 2.528.000 adet/mL iken, 150 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 704.000 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, paraksantin uygulanan 10 mg/L grubunun birey sayısının daha yüksek, 100 mg/L ve 150 mg/L birey sayılarının daha düşük olduğu görüldü.

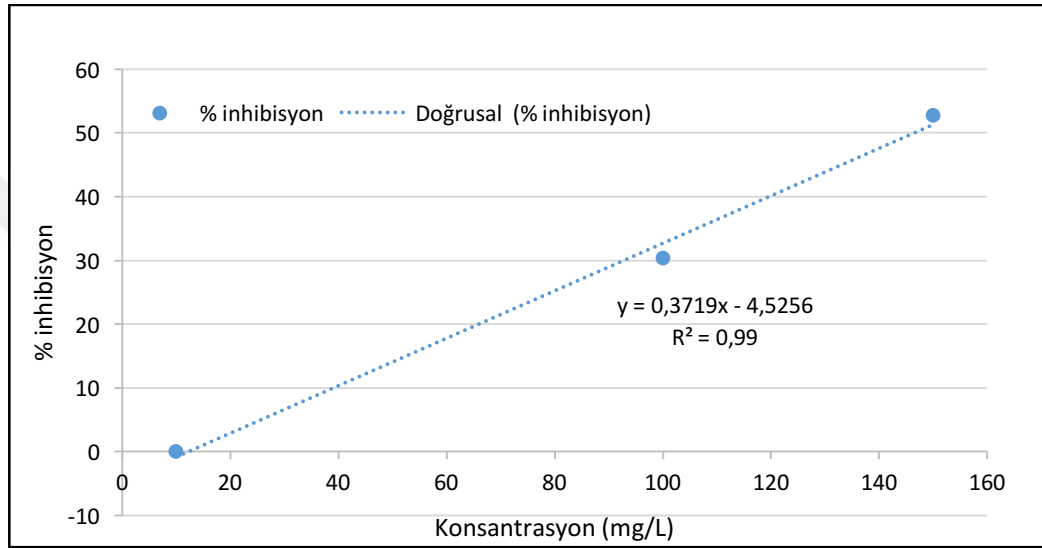
Doksan altı saat sonunda 10 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 6.506.667 adet/mL iken, 10 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 7.370.667 adet/mL olduğu görüldü. 100 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 4.736.000 adet/mL iken, 100 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 3.296.000 adet/mL olduğu görüldü. 150 mg/L kontrol grubunun birey sayısı 3.541.333 adet/mL iken, 150 mg/L paraksantin konsantrasyonu uygulanan grubun birey sayısının 1.674.667 adet/mL olduğu görüldü. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, paraksantin uygulanan 10 mg/L grubunun birey sayılarının daha yüksek, 100 mg/L ve 150 mg/L grubunun birey sayısının daha düşük olduğu görüldü. Paraksantin en çok 150 mg/L konsantrasyona sahip grubun birey sayısını etkilediği belirlendi.

SPSS programında yapılan ANOVA, Tukey HSD, LSD ve Tamhane testi ile istatistik

analizleri sonuçları değerlendirildi. Önemlilik değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirildi. 96 saat sonunda %95 güvenle, tüm kafein konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

3.3.1. *Isochrysis galbana* türüne paraksantin neden olduğu inhibisyon

Çalışmada 96 saat sonunda *I. galbana* türüne paraksantin neden olduğu inhibisyon (%) değerleri Şekil 3.6'de belirtildi.



Şekil 3.6. *I. galbana*'da paraksantin neden olduğu inhibisyon (%)

İnhibisyon değeri (%), 96 saat sonunda farklı paraksantin konsantrasyonuna maruz kalan *I. galbana*'nın birey sayısı kontrole göre kıyaslanarak belirlendi. 96 saat sonunda 10 mg/L paraksantin konsantrasyonu *I. galbana*'nın büyümesinin inhibe etmediği görüldü. 100 ve 150 mg/L paraksantin konsantrasyonu sırasıyla %30 ve %52 oranında inhibe ettiği görüldü. İnhibisyon konsantrasyon değeri (IC_{50}) 146 mg/L olarak belirlendi.

Yeung (2006) tarafından yapılan çalışmada bir dinoflagellat olan *Crypthecodinium cohnii* türünde mekanik olarak hücre döngüsünü önlenmesine neden olan kafeine hassas depolardan kalsiyum mobilizasyonun ilişkisi çalışılmıştır. Kafeinin hücre döngüsü sürecini inhibe edici olduğu belirtilmiştir.

Kumar (1964) tarafından yapılan bir çalışmada streptomisin nispeten düşük konsantrasyonları *Anacystis nidulans* ve *Anabaena variabilis* büyümesini önlemiştir. Bu türlerin klorofil, karotenoid ve fikosiyenin pigmentlerin üretimi önemli ölçüde streptomisin tarafından ile inhibe edildiği belirlenmiştir.

Cleuver (2004) tarafından yapılan bir çalışmada diklofenak, ibuprofen, naproksen ve asetilsalisilik asitin ekotoksitesitesi *Daphnia sp.* ve yeşil alg *Scenedesmus subspicatus* türünde akut toksisite testi kullanılarak değerlendirilmiştir. EC₅₀ toksisite değerleri *Daphnia sp.* türünde 68 - 166 mg/L arasında ve *S. subspicatus* türünde 72 - 626 mg/L arasında tespit edilmiştir.

Çevreye giren ilaç ve kişisel bakım ürünleri Delorenzo (2008) tarafından suda yaşayan organizmalar üzerinde zararlı etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir. Bu sebeple yaptığı çalışmada ilaç ve kişisel bakım ürünlerinin çoğunda yaygın olarak kullanılan simvastatin, klofibrinik asit, diklofenak, karbamazepin, fluoksetin ve triklosan su ortamlarında varlığını tespit etmiştir. Standart 96 saatlik statik akut biyolojik test protokolünü kullanarak altı adet ilaç ve kişisel bakım ürünleri denizel fitoplankton türlerinden biri olan *Dunaliella tertiolecta* üzerine hem bireysel ve hemde karışım toksisite analizi uygulanmıştır. Test edilen tüm ilaç ve kişisel bakım ürünleri *D.tertiolecta* popülasyonunun hücre yoğunluğu üzerinde kayda değer bir etkisi olmamıştır. Ancak test edilen ilaç ve kişisel bakım ürünlerinden, sadece triklosan çevresel konsantrasyonlarda toksisite göstermiştir.

Balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaçların (insan ve veteriner amaçlı kullanılan) alg toksitesitesi Holten ve diğ., (1998) tarafından yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Amoksisilin, flumetrim, oksolinik asit, oksitetrasiklin hidroklorür, sarafloksasin hidroklorür, sülfadiazin ve trimetoprimin büyüme inhibisyon etkileri *Microcystis aeruginosa*, *Selenastrum capricornutum* ve *Rhodomonas salina* türleri üzerinde ISO 8692 (1989) protokol açıklanan prosedüre uygun olarak değiştirilmiş test prosedürü uygulanarak gözlemlenmiştir. *M. aeruginosa*, hem *R. salina* ve hemde *S. capricornutum* kıyasla daha yüksek hassasiyet göstermiştir. *M. aeruginosa* türünün EC₅₀ toksisite değeri amoksisilin için 0,0037 mg/L, sarafloksasin hidroklorür 0,015 mg/L, sülfadiazin 0,135 mg/L, flumetrim için 0,159 mg/L, oksolinik asit için 0,180 mg/L, oksitetrasiklin hidroklorür için 0,207 mg/L, *R. salina* türünde trimetoprim için 112 mg/L, oksitetrasiklin hidroklorür için 1,6 mg/L, oksolinik asit için 10 mg/L, trimetoprim için 16 mg/L, flumetrim için 18 mg/L, sarafloksasin hidroklorür için 24 mg/L, sülfadiazin için 403 mg/L, amoksisilin için 3108 mg/L ve *S. capricornutum* türü için oksitetrasiklin hidroklorür için 4,5 mg/L, flumetrim için 5,0 mg/L, sülfadiazin için 7,8 mg/L, oksolinik asit için 16 mg/L, sarafloksasin hidroklorür 16 mg/L, trimetoprim için 130 mg/L, amoksisilin için NOEC değeri 250 mg/L olduğunu belirtmiştir.

Brain ve diğ. (2002) yaptığı bir çalışmada antibiyotikler antikloroplastik özelliklere

sahip olduğu bilinen, ancak bu etkilerin su bitkileri üzerinde neredeyse bilinmemesi üzerine 22 antibiyotiginde dahil olduğu 25 ilacın, su bitkisi *Lemna gibba*'da fitotoksosite açısından değerlendirmiştir. 7 günlük statik yenileme testi kullanılarak 0, 10, 30, 100, 300 ve 1.000 g/L ilaç içeren büyüme ortamı bitkilerle muamele edilmiştir. Antibiyotiklerin 12 farklı sınıfının değerlendirilmesine rağmen sadece florokinolon, sülfonamid ve tetrasiklin antibiyotik sınıfı üyelerinde önemli fitotoksosite görülmüştür. Test edilen sınıflar arasında en toksik üyeler sülfametoksazol, lomefloksasin klortetrasiklinin yaş ağırlık EC₂₅ değerleri sırasıyla, 38, 37, ve 114 g/L olduğu görülmüştür.

Aguirre Martinez ve diğ., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada kafein, ibuprofen, karbamazepin ve novobiosin kirliliğini değerlendirmek için hücresel stresin bir biyolojik belirteçi olarak *Ruditapes philippinarum* hemositlerinin lizozomal membran stabilitesini kullanılmış. *Ruditapes philippinarum* hemolenfinde LMS (lizozomal membran stabilitesi) değerlendirmek için nötr kırmızı biriktirme testi (NRRA) kullanılmıştır. *Ruditapes philippinarum* türüne laboratuvar şartlarında kafein (0,1, 5, 15, 50 µg/L), ibuprofen (0,1, 5, 10, 50 µg/L), karbamazepin ve novobiosinin (her ikisi de 0,1, 1, 10, 50 µg/mL) konsantrasyonlarına 35 gün boyunca maruz kalmıştır. Deney sonucunda nötr kırmızı biriktirme süresi, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında uygulanan çevresel konsantrasyonlar (kafein=15 µg/L, ibuprofen=10 µg/L, karbamazepin=1 µg/mL, novobiosin=1 µg/mL) maruz kaldıktan sonra % 50'si önemli ölçüde azalmıştır. Etki olmayacağı öngörülen çevresel etki konsantrasyonu (PNEC) sonuçları bu ilaçların test edilen çevresel konsantrasyonlarda çok zehirli olduğu belirtilmiştir.

Aguirre Martinez ve diğ., (2015) tarafından güncel kılavuzlarda uygulanan standart testler ile kafeinin, ibuprofen, karbamazepin ve novobiosin sucul ortamda çevresel konsantrasyonlarının yan etkileri, *Vibrio fischeri*'nin biyoluminesans tepkisi, *Isochrysis galbana* ve *Pseudokirchneriella subcapitata* büyüme inhibisyonu, *Paracentrotus lividus*'de döllenme, embriyo ve larva gelişmesi içeren dört organizmada yan etkileri tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda kafeinin mg/L düzeyindeki çevresel konsantrasyonlarının deniz kestanesi döllenmesi, mikroalg büyüme inhibisyonu ve bakteri biyoluminesans tepkisinin akut toksisite değerlerinden yüksek olduğunu göstermiştir. Buna rağmen, 0,00001 mg/L çevresel ilaç konsantrasyonu maruziyeti sonrasında deniz kestanesi teratojenitesi izlenmiş; karbamazepin ve ibuprofen bu konsantrasyonda kontrol ile karşılaştırıldığında embriyo ve larva gelişimini önemli

ölçüde azalttığı bulunmuştur ($p < 0,01$). Büyüme inhibisyon testi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *I. galbana* ve *P.subcapitata*'da önemli bir büyüme inhibisyonu gözlenmiştir ($p < 0,01$). 96 saat sonunda *I. galbana*'da kafeinin IC_{50} değeri 405,7 mg/L, ibuprofen IC_{50} 86,0 mg/L, novabiosin IC_{50} 72,8 mg/L, karbamazepin IC_{50} 280,2 mg/L, *P.subcapitata*'da kafeinin IC_{50} 89,7 mg/L, ibuprofen IC_{50} 162,1 mg/L, karbamazepin IC_{50} 161,2 mg/L olarak bulunmuştur.

Moore ve diğ., (2008) göllerde yaşayan üç tatlısu organizması; *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas* ve *Chironomus dilutes* üzerinde kafeinin tepkisel cevapları çalışılmıştır. Her bir organizma 0-200 $\mu\text{g/L}$ aralığında değişen çeşitli kafein konsantrasyonlarına 48 saat maruz kaldıktan sonra, üreme ve büyümenin zarar görmesi gibi akut tepkiler gözlemlendi.

Domozych (1989) tarafından yapılan bir çalışmada *Gloeomonas kupfferi* türünde kafeinin diktiyozom vezikül inhibisyonuna sebep olduğu belirtilmiştir.

Klobucar ve diğ., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada nitrofurantoinin kontrol ile 24 saat sonunda karşılaştırıldığında 30 μM nitrofurantoin maruz kalan *Desmodesmus subspicatus*'un büyüme oranı önemli derecede inhibe olduğu görülmüştür. Çalışmada akut toksisite EC_{50} değeri 12,4-17,4 mg/L aralığında değişmektedir. Bu sonuçların akuatik organizmalar için toksik ve zararlı olduğu belirtilmiştir.

Roudriguez del Rey ve diğ., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada hücresel stresin moleküler belirteci Hsp70 kullanılarak, *Mytilus californianus* türü üzerinde kafeinin çevresel konsantrasyonlarının letal hücre toksisitesini araştırmıştır. 10, 20 ve 30 gün boyunca 0,05, 0,2 ve 0,5 $\mu\text{g/L}$ kafein konsantrasyonuna maruz bırakılan midyelerin manto dokusu ve solungaçlarında Hsp70 konsantrasyonları, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Laboratuvar şartlarında kafeinin çevresel konsantrasyonlarına maruz kalan *M. californianus* türünün Hsp70 belirteğine karşı bir tepkisel cevap göstermiştir.

Fernandez ve diğ., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada paraksantin (1,7-dimetilksantin) su pire üzerinde ölümcül etkisini belirlemek için $LC_{50} > 100$ mg/L'yi aşan konsantrasyonlar gerektiğini bildirmiştir.

Walsh (1983) tarafından yapılan bir çalışmada denizel diatom türü *Skeletonema costatum*'un, böcek ilaçları; heksaklorosiklopentadien, EPN, klorpirifos,

karbofenotiyon ve atrazine maruz bırakılmış ve Evans blue boyası ile hücre ölümü için incelenmiştir. Tüm pestisitler hücrelerin ölümüne sebep olmuştur. Fakat önemli derecede ölüm sadece popülasyon büyüme çalışmaları sonucu hesaplanan EC₅₀ değerinden daha yüksek konsantrasyonlarda meydana gelmiştir. Bir insektisit olan Amdro denizel alg olan *S. costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella sp.* ve *Dunaliella tertiolecta* öldürmemiştir. Buna rağmen Amdro, düşük konsantrasyonlarda alg popülasyon büyümesini büyük ölçüde inhibe edici olmuştur. Örneğin 48. saatte EC değerleri. *T. pseudonana* için 0,14 µg/L ve *D. tertiolecta* için 10,3 µg/L olarak belirtilmiştir.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kafein dünyada en çok tüketilen kimyasallar arasındadır. Şehir merkezlerinde ve yerleşimin yoğun olduğu yerlerde, kanalizasyon, atık su, göl, akarsu, yeraltı suyu ve deniz suyunda bulunan kafein antropojenik indikatör olarak kullanılır. Bu çalışmada kafein ve kafein molekülünün bileşimindeki en önemli metabolit olan paraksantin, çevremizdeki deniz ekosistemlerinde de bulunan, deniz ürünleri yetiştiriciliğinde balık, kabuklu ve yumuşakçaların beslenmesinde de kullanılan, *Isochrysis galbana* ve *Thalassiosira pseudonana* türlerinin çoğalmasında üzerine etkilerinin araştırılmıştır.

Son yıllarda çevresel ortamda farmasötikler varlığı, bu bileşiklerin ve metabolitlerinin yan etkilerinin oluşumu hakkında genel bilimsel ilgi artmıştır (Heberer 2002, Halling Sorensen ve diğ. 1998). İlaçlar sürekli olarak atık suda ya da doğrudan insan ve hayvan atılımı ile çevreye salınır. Tıpta insanlar için kullanılan birçok ilaç, tamamen metabolize edilmediği bilinmektedir. Bu ilaçlar vücuttan atılır, kısmi olarak dönüştürülür veya değişmeden polar moleküle bağlanabilir. Bu bağlanan moleküller kolayca atıksu arıtma işlemleri sırasında ayrılabilir ve sonrasında ilaçlar sucul ortamda bulunabilir (Heberer, 2002).

Çalışma sonucunda 96. saat sonunda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, *I. galbana* türünün üremesinin 500 mg/L kafein ve 150 mg/L paraksantin konsantrasyonlarında en düşük düzeyde olduğu tespit edildi. *T. pseudonana* türünde ise 550 mg/L kafein konsantrasyonunun üremenin en düşük düzeyde olduğu tespit edildi. *I. galbana* türünde kafeinin IC₅₀ değeri 447 mg/L, *T. pseudonana* türünde IC₅₀ değeri 409 mg/L, *I. galbana* türünde paraksantin IC₅₀ değeri 146 mg/L olarak belirlendi. *I. galbana* türünde belirgin bir hücre duvarının bulunmaması (Zhu ve diğ.,1997) nedeniyle kafein ve kafeinin en önemli metaboliti olan paraksantin konsantrasyonlarından, *T. pseudonana* türü ile karşılaştırıldığında daha fazla etkilendiği düşünülmektedir.

Bu çalışma tez çalışması sonucunda kafein ve kafein metaboliti paraksantin *I. galbana* ve *T. pseudonana*'da hücre döngüsü (Yeung, 2008) ve pigment üretimini (Kumar, 1964) inhibe ettiği düşünülmektedir. Kafeinin *I. galbana*'da neden olduğu inhibisyon değeri Aguirre Martinez (2015) tarafından yapılan çalışma sonucu ile

benzerlik göstermektedir.

Bu çalışma antropojenik indikatör olarak kullanılan kafeinin fitoplankton çoğalması üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. Moleküler düzeyde kafeinin fitoplankton çoğalması üzerine etkilerinin araştırılması fitoplankton çoğalması hakkında fikir sahibi olunmasına ve kentsel deşarjların kıyı ekosistemlerindeki canlı sistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Aguirre Martinez G. V., Buratti S., Fabbri E., Del Valls A. T., Martin Diaz M. L., Using Lysosomal Membrane Stability of Haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a Biomarker of Cellular Stress to Assess Contamination by Caffeine, Ibuprofen, Carbamazepine and Novobiocin, *Journal of Environmental Science*, 2013, **25**(7), 1408-1418.

Aguirre Martinez G. V., Owour M. A., Garrido Perez C., Salamanca M. J., Del Valls T. A., Martin Diaz M. L., Are Standard Tests Sensitive Enough to Evaluate Effects of Human Pharmaceuticals in Aquatic Biota? Facing Changes in Research Approaches When Performing Risk Assessment of Drugs, *Chemosphere*, 2015, **120**, 75-85.

Armbrust E. V., The Genome of the Diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, Evolution and Metabolism., *Science*, 2004, **306**(5693), 79–86.

Atay Ş., Kirlenmiş Su Ortamının Ekotoksikolojik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 2009, 233102.

Balkis N., The Effect of Marmara Earthquake on the Chemical Oceanography of İzmit Bay, Turkey, *Marine Pollution Bulletin*, 2003, **46**(7), 865–878.

Barone J. J., Roberts H. R., Caffeine Consumption, *Food and Chemical Toxicology*, 1996, **34**(1), 119-129.

Bendz D., Paxeus N. A., Ginn T. R., Loge F. J., Occurrence and Fate of Pharmaceutically Active Compounds in the Environment, a Case Study: Höje River in Sweden, *Journal of Hazardous Materials*, 2005, **122**(3), 195–204.

Boyd G. R., Reemtsma H., Grimm D. A., Mitra S., Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Surface and Treated Waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada, *Science of the Total Environment*, 2003, **311**(1-3), 135–149.

Brain R. A., Johnson D. J., Richards S. M., Hanson M. L., Sanderson H., Lam M. W., Solomon K. R., Microcosm Evaluation of the Effects of an Eight Pharmaceutical Mixture to the Aquatic Macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*, *Aquatic Toxicology*, 2004, **70**(1), 23–40.

Buerge I. J., Poiger T., Buser H., Wa C., Caffeine; an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters, *Environmental Science and Technology*, 2003, **37**(4), 691–700.

Burkiewicz K., Synak R., Tukaj Z., Toxicity of Three Insecticides in a Standard Algal Growth Inhibition Test with *Scenedesmus subspicatus*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, **74**(6), 1192–1198.

Burton G. A., Allen G., Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1991, **10**(12), 1585-1627.

Cheney R. H., The Effects of Caffeine on Oxygen Consumption and Cell Division in the Fertilized Egg of the Sea Urchin *Arbacia punctulata*, *The Journal of General Physiology*, 1945, **29**(2), 63-72.

Cirik S., Gökpınar Ş., *Plankton bilgisi ve Kültürü*, 6. Basım, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2009.

Cleuvers M., Mixture Toxicity of Antiinflammatory Drugs Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen and Acetylsalicylic Acid, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, **59**(3), 309-315.

Çevre Durum Raporu (ÇDR), *Kocaeli Valiliği İl Çevre ve Orman Müdürlüğü*, 2015.

Daneshvar A., Svanfelt J., Kronberg L., Prvost M., Weyhenmeyer G. A., Seasonal Variations in the Occurrence and Fate of Basic and Neutral Pharmaceuticals in a Swedish River Lake System, *Chemosphere*, 2010, **80**(3), 301–309.

Delepee R., Pouliquen H., Le Bris H., The Bryophyte *Fontinalis antipyretica* Hedw. Bioaccumulates Oxytetracycline, Flumequine and Oxolinic Acid in the Freshwater Environment, *Science of the Total Environment*, 2004, **322**(1-3), 243–253.

Delorenzo M. E., Flemming J., Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*, *Arch Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **54**(2), 203-210.

Doğan M., Saylak M., *Su kimyası*, Erciyes Üniversitesi Yayınları, Kayseri, 2000.

Domozych D. S., The Disruption of Dictyosomae Integrity by Caffeine in the Green Algae Flagellate *Gloeomonas kupfferi*, *Journal of Cell Science*, 1989, **93**(2), 375-382.

Duman E., Atıksuların Fenton Oksidasyonu ile Arıtılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006, 182342.

Fent K., Weston A. A., Caminada D., Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 2006, **76**(2), 122–159.

Fernandez C., Gonzalez Doncel M., Pro J., Carbonell G., Tarazona J. V., Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Surface Waters of the Henares Jarama Tajo River System (Madrid, Spain) and a Potential Risk Characterization, *The Science of the Total Environment*, 2010, **408**(3), 543–551.

Ferreira A. P., Caffeine as an Environmental Indicator for Assessing Urban Aquatic Ecosystems, *Caderno de Saude Publica*, 2005, **21**(6), 1884–1892.

Fraker S. L., Smith G. R., Direct and Interactive Effects of Ecologically Relevant Concentrations of Organic Wastewater Contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles, *Environmental Toxicology*, 2004, **19**(3), 250-256.

Gagne F., Blaise C., Andre C., Occurrence of Pharmaceutical Products in a Municipal Effluent and Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, **64**(3), 329–336.

Gomez E., Bachelot M., Boillot C., Munaron D., Chiron S., Casellas C., Fenet H., Bioconcentration of Two Pharmaceuticals (benzodiazepines) and Two Personal Care Products (UV filters) in Marine Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) Under Controlled Laboratory Conditions, *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, **19**(7), 2561–2569.

Grung M., Kuallqvist T., Sakshaug S., Skurtveit S., Thomas K. V., Environmental Assessment of Norwegian Priority Pharmaceuticals based on the EMEA Guideline, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, **71**(2), 328–340.

Güner H., Aysel V., *Algoloji Laboratuvar Uygulama Kılavuzu*, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 1997.

Güven K. C., Çetintürk K., Yalova, Marmara Denizi Dere, Kuyu ve Deniz Suyunda Kafein Tanısı, *Turkish J. Marine Science*, 2003, **9**(3), 179-186.

Halling Sorensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceuticals Substance in the Environment, a Review, *Chemosphere*, 1998, **36**(2), 357–393.

Heberer T., Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: a Review of Recent Research Data, *Toxicology letters*, 2002, **131**(1-2), 5–17.

Holten H. C., Halling Sorensen B., Jorgensen S. E., Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming, *Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, **36**, 1-6.

Knee K. L., Paytan A., Submarine Groundwater Discharge, Editors: Wolanski E., McLusky D. S., *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, 1st ed., Elsevier Academic Press, Waltham, 205-233, 2011.

Klobucar R. S., Brozovic A., Stambuk A., Ecotoxicological Assessment of Nitrofurantoin in Fish Cell Lines, Unicellular Algae *Desmodesmus subspicatus* and Bacterial Strain of *Salmonella typhimurium*, *Fresenius Environmental Bulletin*, 2013, **22**(9a), 2669-2675.

Koray T., *Denizel Fitoplankton*, 3. Basım, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2011.

Kumar H. D., Streptomycin and Penicilin Induced Inhibition of Growth and Pigment Production in Blue-green Algae and Production of strains of *Anacystis nidulans* Resistant to These Antibiotics., *Journal of Experimental Botany*, 1964, **15**(2), 232-250.

Kurissery S., Kanavilli N., Verenitch S., Mazumder A., Caffeine as an Anthropogenic Marker of Domestic Waste: A study from Lake Simcoe Watershed, *Ecological Indicators*, 2012, **23**, 501–508.

Kuşçu I., Okamura M., Matsuoka H., Awata Y., Active Faults in the Gulf of Izmit on the North Anatolian Fault, NW Turkey: a High-Resolution Shallow Seismic Study, *Marine Geology*, 2002, **190**, 421–443.

Lavens P., Sorgeloos P., Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, *FAO Fisheries Technical Paper*, No: 361, 10-16, 1996.

Manahan S. E., *Environmental Chemistry*, 7. Basım, CRC Press, Florida, 2000.

Metcalf C. D., Koenig B. G., Bennie D. T., Servos M., Ternes T., Hirsch R., Occurrence of Neutral and Acidic Drugs in the Effluents of Canadian Sewage Treatment Plants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, **22**(12), 2872–2880.

Moore M. T., Greenway S. L., Farris J. L., Guerra B., Assessing Caffeine as an Emerging Environmental Concern Using Conventional Approaches, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, **54**(1), 31–35.

Nakada N., Kiri K., Shinohara H., Harada A., Kuroda K., Takizawa S., Takada H., Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Water-Soluble Molecular Markers of Sewage, *Environmental Science and Technology*, 2008, **42**(17), 6347–6353.

Nath J., Rebhun L. I., Effects of Caffeine and Other Methylxanthines on the Development and Metabolism of the Sea Urchin Eggs: Involvement of NADP and Glutathione, *The Journal of Cell Biology*, 1976, **68**(3), 440-450.

Newman M. C., Unger M. A., *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2. Basım, Lewis Publishers, Florida, 2002.

Oberholster P. J., Botha A. M., Cloete T. E., Using a Battery of Bioassays, Benthic Phytoplankton and the AUSRIVAS Method to Monitor Long-term Coal Tar Contaminated Sediment in the Cache la Poudre River, Colorado, *Water Research*, 2005, **39**(20), 4913–4924.

OECD Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, *Organisation for Economic Cooperation and Development Publishing*, Test no: 201, 1-25, 2011.

Ofluoğlu F. E., Ratlarda Beyin L-Arginin Metabolizması Üzerine Kafeinin Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007, 194218.

Okauchi M., The Status of Phytoplankton Production in Japan; Rotifer and Microalgae Culture Systems, *Proceeding of a US-Asia Workshop*, Honolulu, USA, 28-31 Ocak 1991.

Parlak H., Arslan Ö. Ç., Boyacıoğlu M., Karaaslan M. A., *Ekotoksikoloji Ders Kitabı*, 2. Basım, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2011.

Pollack K., Balazs K., Ogunseitan O., Proteomic Assessment of Caffeine Effects on Coral Symbionts, *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**(6), 2085–2091.

Rand G. M., Petrocelli S. R., Introduction, Editors: Rand G. M., Petrocelli S. R., *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1-28, 1985.

Rand G. M., Wells P. G., McCarty, L. S., *Fundamentals of Aquatic Toxicology Methods and Applications*, Hemisphere Publishing Corporation, Michigan-USA, 1985.

Roberts P. H., Thomas K. V., The Occurrence of Selected Pharmaceuticals in Wastewater Effluent and Surface Waters of the Lower Tyne Catchment, *Science of the Total Environment*, 2006, **356**(1-3), 143–153.

Roudriguez del Rey Z. R., Granek E. F., Buckley B. A., Expression of HSP70 in *Mytilus californianus* Following Exposure to Caffeine, *Ecotoxicology*, 2011, **20**(4), 855–861.

Sacher F., Lange F. T., Brauch H. J., Blankenhorn I., Pharmaceuticals in Groundwaters, *Journal of Chromatography A*, 2001, **938**(1-2), 199–210.

Sawyer S. J., Muscatine L., Cellular Mechanisms Underlying Temperature-induced Bleaching in the Tropical Sea Anemone *Aiptasia pulchella*, *The Journal of Experimental Biology*, 2001, **204** (20), 3443–3456.

Siegener R., Chen R. F., Caffeine in Boston Harbor Seawater, *Marine Pollution Bulletin*, 2002, **44**(5), 383–387.

Smith G. R., Burgett A. A., Effects of Three Organic Wastewater Contaminants on Amerikan Toad *Bufo americanus* Tadpoles, *Ecotoxicology*, 2005, **14**(4), 477-482.

Ternes T. A., Bonerz M., Schimdt T., Determination of Neutral Pharmaceuticals in Waste Waters and Rivers by Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2001, **938**, 175–185.

Ternes T., Occurrence of Drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers., *Water Research*, 1998, **32**(11), 3245–3260.

URL-1:

http://www.mmo.org.tr/resimler/dosya_ekler/7d16d00201083a2_ek.pdf?dergi=142
(Ziyaret tarihi: 16 Şubat 2016)

URL-2: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Microphyte> (Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2015)

URL-3:

http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/denizcilik/moduller/fitoplankton_kulturu.pdf (Ziyaret tarihi: 3 Kasım 2015)

URL-4: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Kafein> (Ziyaret tarihi: 20 Şubat 2016)

URL-5: <https://en.wikipedia.org/wiki/Paraxanthine> (Ziyaret tarihi: 20 Şubat 2016)

URL-6: <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> (Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2016)

URL-7: https://algaebase.org/search/species/species_id=s70a3641a7a16c580
(Ziyaret tarihi: 18 Şubat 2016)

URL-8: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=32239 (Ziyaret tarihi: 18 Şubat 2016)

URL-9: <https://ncma.bigelow.org/ccmp1323#.VmXV3uOLSu4> (Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2015)

URL-10: <https://ncma.bigelow.org/ccmp1335#.VmXWkeOLT-Y> (Ziyaret tarihi: 4 Kasım 2015)

URL-11: http://insilico.ehu.es/counting_chamber/thoma.php (Ziyaret tarihi: 22 Şubat 2016)

Ünlü S., Alpar B., Hydrocarbon Balance of Surface Sediments in Izmit Bay (Marmara sea), Turkey, *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 2004, **73**(1), 85–92.

Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I., Garland C. D., Fatty Acid and Lipid Composition of 10 species of Microalgae Used in Mariculture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1989, **128**(3), 219–240.

Walker C. H., Hoplin S. P., Sibley S. P., Peakall D. B., *Principles of Ecotoxicology*, 4. Basım, CRC press, USA, 2012.

Walsh G. E., Cell Death and Inhibition of Population Growth of Marine Unicellular Algae by Pesticides, *Aquatic Toxicology*, 1983, **3**(3), 209-214.

Weigel S., Kuhlman J., Hühnerfuss H., Drugs and Personal Care Products as Ubiquitous Pollutants, Occurrence and Distribution of Clofibric acid, Caffeine and DEET in North Sea, *The Science of the Total Environment*, 2002, **295**(1-3), 131-141.

Yeung P. K. K., Lam C. M. C., Ma Z. Y., Wong Y. H., Wong J. T. Y., Involvement of Calcium Mobilization from Caffeine-sensitive Stores in Mechanically Induced Cell Cycle Arrest in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, *Cell Calcium*, 2006, **39**, 259-274.

Yoon Y., Ryu J., Oh J., Choi B. G., Snyder S. A., Occurrence of Endocrine Disrupting Compounds, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in the Han River (Seoul, South Korea), *Science of the Total Environment*, 2010, **408**(3), 636–643.

Yu M., *Environmental Toxicology, Biological and Health Effects of Pollutants*, 2. Basım, CRC press, Florida, 2005.

Zhu C. J., Lee Y. K., Chao T. M., Effects of Temperature and Growth Phase on Lipid and Biochemical Composition of *Isochrysis galbana* TK1, *Journal of Applied Phycology*, 1997, **9**(5), 451-457.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Ergül H. A., Aksan S., **İpşirođlu M.**, Kűcűk A., Assessment of The Spring 2015 Plankton Blooms in Izmit Bay (The Marmara Sea), *3rd Science for the Environment Conference*, Aarhus, Denmark, 1-2 October 2015.

Ergül H. A., Kılıç, S., Aksan S., **İpşiroğlu, M.**, Aşadı Sakarya Nehrinin Bazı Fizikokimyasal Özelliklerinin Araştırılması, *22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014.

İpşiroğlu M., Ergül H. A., Farklı Kafein Konsantrasyonlarının Fitoplankton Üremesi Üzerine Etkileri, *22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014.

Ergül H. A., Kılıç, S., Aksan S., **İpşiroğlu, M.**, Baysal A., Assessment of Consecutive Plankton Blooms on March and April 2014 in İzmit Bay (Marmara Sea), *1st International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic Environment-HydroMedit 2014*, Volos, Greece, 13-15 October 2014.

Ergül H. A., Çelebi N. G., **İpşiroğlu, M.**, İzmit Körfezinde Meydana Gelen Plankton Çoğalması ile İlgili Bir Çalışma, *17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyum*, İstanbul, Türkiye, 3-6 Eylül 2013.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmit Kocaeli’de doğdu, 2007 yılında Kocaeli Anadolu Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2007 yılında Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2009-2010 yılları arasında Farabi Öğrenci Değişim Programı dahilinde Kocaeli Üniversitesi’nde, 2010-2011 yılları arasında Socrates Erasmus Programı dahilinde Romanya West University of Timișoara’da eğitim aldı. 2012 yılında mezun olduktan sonra, 2012 Eylül ayında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

