

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AZOTLU GÜBRENİN *Capoeta capoeta capoeta* (GULDENSTTEAD
1772)'NİN KARACİĞER, BAĞIRSAK, SOLUNGAÇ, BÖBREK
HİSTOPATOLOJİSİ VE SERUM PROTEİNLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Seda VURAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ

KARS

2011

Bu tez çalışması 2011 – FEF – 10 numaralı proje ile Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AZOTLU GÜBRENİN *Capoeta capoeta capoeta* (GULDENSTTEAD 1772)'NİN KARACİĞER, BAĞIRSAK, SOLUNGAÇ, BÖBREK HİSTOPATOLOJİSİ VE SERUM PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Seda VURAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

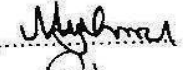


Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ

KARS

2011

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seda VURAL'ın Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ' ın danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "Azotlu Gübrenin *Capoeta Capoeta Capoeta* (Guldenstlead 1772)'nın Karaciğer, Bağırsak, Solungaç, Böbrek Histopatolojisi ve Serum Proteinleri Üzerine Etkileri" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oylar birliği ile kabul edilmiştir.

...../...../.....

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Murat BAYEZİT	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Yusuf ELVAN	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2010. gün ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muzaffer ALKAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada; Azotlu gübrenin *Capoeta capoeta capoeta* (Guldensttead 1772)'nın karaciğer, bağırsak, solungaç, böbrek histopatolojisi ve serum proteinleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Tez konumun seçiminde, tezimin hazırlanmasında ve sonuçlandırılmasında yol gösterici olan, yoğun çalışmalarından bana zaman ayırarak engin tecrübe ve birikimlerinden yararlanma fırsatı veren, değerli yönetici danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhittin YILMAZ' a ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yakın ilgilerini, destek ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yusuf ERSAN'a, arkadaşlarım Arş. Gör. Duygu Tanrıkulu ile doktora öğrencisi Evren Koç'a ve de her zaman yanımda olup, desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca çalışmamı maddi yönden destekleyen Kafkas Üniversitesi Araştırma Fonu (2011– FEF – 10 numaralı proje)'na teşekkürlerimi sunarım.

Kars – 2011

Seda VURAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
RESİMLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Gübre/Gübreleme	3
2.2. Azot	5
2.2.1.Azot Çevrimi	7
2.2.2.Azot Türleri	8
2.2.3.Azotun Yol Açtığı Kirlilik	10
2.3. <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)'nın Sistematikteki Yeri	11
2.3.1. Familya ve cins özellikleri	11
2.3.2. Alttür <i>Capoeta capoeta capoeta</i> (Guldenstaedt 1772)	13
2.4.Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi	14

3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Deney Düzenegi	15
3.2. Histopatolojik calismalar	15
3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemleri	15
3.3.1. Kuyruktan kan alınması	16
3.4. Total Protein Tayini	16
3.5. Elektroforetik Calismalar	17
3.5.1. % 30'luk akrilamid çözeltilisi	17
3.5.2. Stoklama jel tamponu	17
3.5.3. Ayırma jel tamponu	18
3.5.4. Yürütme tamponu	18
3.5.5. Numune tamponu	18
3.5.6. Jelin boyanması işlemi	19
3.5.7. Jelden boya çıkarma işlemi	19
3.5.8. Diğer kimyasallar ve özellikleri	20
3.5.9. Kesikli tampon sistemli jelin hazırlanması	20
3.5.9.1. Ayırma jelin hazırlanması	21
3.5.9.2. Stoklama jelin hazırlanması	21
3.5.10. Ayırma jelin plağa dökülmesi işlemi	22
3.5.11. Stoklama jelin plağa dökülmesi işlemi	23

3.5.12. Serum numunelerinin sulandırılması ve jele yükleme işlemi	24
4.BULGULAR	26
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	36
6. KAYNAKLAR	39
7. ÖZGEÇMİŞ	42

ÖZET

Bu çalışmada, Azotlu gübrenin *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstteadt 1772)'nin karaciğer, bağırsak, solungaç, böbrek histopatolojisi ve serum proteinleri üzerine etkileri araştırıldı. Kars Çayı'ndan yakalanan balıklar 300 litrelik tanklara konularak 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandı. Daha sonra her grupta 12 adet balık bulunan 3 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 15 ve 30 mg/L gübre içeren su ortamlarında 15 gün süreyle bekletildi. Bu süre sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Elde edilen serum örnekleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)'nde yürütüldü. Doku örnekleri ise %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilerek rutin histolojik yöntemlerle parafin bloklar hazırlandı ve 3-5 µ kalınlığında kesitler alındı ve elde edilen kesitlerin tamamı hematoksilin ve eosin boyama metoduna göre boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre, 15mg/L ve 30mg/L azotlu gübre uygulaması sonucunda 118 kD, 89 kD, 53 kD, 49 kD, 45 kD ve 26 kD'luk protein bantlarında kontrol grubuna göre kalınlaşmalar meydana geldiği, 100 kD, 60 kD ve 34 kD'luk protein bantlarının incelendiği, 31kD'luk protein bandının inhibe olduğu ve 68,5 kD'luk protein bandının yeni sentezlendiği saptandı.

Azotlu gübre uygulaması ile oluşturulan gruplardan elde edilen karaciğer, bağırsak, solungaç ve böbrek dokularında yapılan histopatolojik incelemelerde doz artışıyla orantılı olarak dejenerasyon, nekroz ve yangısal hücre infiltrasyonları tespit edildi.

Sonuç olarak, 15 ve 30 mg/L azotlu gübre uygulamasının *Capoeta capoeta capoeta*'da toksik etkilere neden olduğu ve sucul ortamlara azotlu gübrenin fazla miktarda bulaşmasının zararlı olacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Azotlu gübre, *Capoeta capoeta capoeta*, serum protein, SDS-PAGE, azot, histopatoloji.

ABSTRACT

In this study, the effects of nitrogen fertilizer on *Capoeta capoeta capoeta* species (Guldenstaedt 1772) were searched by electrophoretic and histopathological methods. The fish caught from Kars River were put into 300 liters tanks and they were enabled to adapt into the medium for 10 days. Later, they were divided into 3 groups. The fish in the 1st group were held in normal water, 2nd and 3rd groups were held in the water containing 15 mg/L and 30 mg/L nitrogen fertilizer respectively for 15 days. At the end of this period blood and tissue samples were taken from the fish for electrophoresis and histopathological examinations. Serum samples obtained were carried out in Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Tissue samples were fixed in %10 formaldehyde solution and paraffin blocks were prepared by routine histological methods and section 3-5 μ thickness were performed and all of the sections were stained according to hematoxylin and eosin method and investigated under light microscope.

In SDS-PAGE examination of Serum proteins, it was determined that in group applied 15 and 30mg / L nitrogen fertilizer was thickened in protein bands of 118 kD, 89 kD, 53 kD, 49 kD, 45 kD ,26 kD and it was determined that in group applied 15 and 30mg / L nitrogen fertilizer was narrowed in protein bands of 100 kD, 60 kD and 34 kD. Also it was confirmed (determined) that in group applied 15 and 30 mg / L nitrogen fertilizer was disappeared in protein band 31 kD, however, it was determined that in group applied 15 and 30 mg / L nitrogen fertilizer was took place a new protein band of 68,5 kD. In histopathological examination, an increasing level of degeneration, necrosis and inflammation cell infiltration was observed in the tissues of the liver, intestine, gill and kidney tissues in experimental fish groups in proportion with the increasing of dose.

As a result, it was concluded that applications of 15 and 30 mg / L nitrogen fertilizer could be toxic for health of *Capoeta capoeta capoeta*.

Key Words: Nitrogen fertilizer, *Capoeta capoeta capoeta*, serum protein, SDS-PAGE, nitrogen, histopathology.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.2.2. : Su yetiştiricilik sistemlerinde başlıca azot formları	8
Çizelge 3.4.1: Total protein tayin prosedürü	17
Çizelge 3.5.9.1: Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma Jeli Hazırlama Prosedürü	21
Çizelge 3.5.9.2: Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü	21

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 2.3.2: Siraz balığı (<i>Capoeta capoeta capoeta</i>)	8
Resim 4.1: Azotlu gübreye maruz bırakılan <i>Capoeta capoeta capoeta</i> 'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı	13
Resim 4.2: Kontrol grubu karaciğer dokusu	28
Resim 4.3: 15mg/L azotlu gübre uygulanan karaciğer dokusu	28
Resim 4.4: 30mg/L azotlu gübre uygulanan karaciğer dokusu	29
Resim 4.5: Kontrol grubu bağırsak dokusu	30
Resim 4.6: 15mg/L azotlu gübre uygulanan bağırsak dokusu	30
Resim 4.7: 30mg/L azotlu gübre uygulanan bağırsak dokusu	31
Resim 4.8: Kontrol grubu solungaç dokusu	32
Resim 4.9: 15mg/L azotlu gübre uygulanan solungaç dokusu	32
Resim 4.10: 30mg/L azotlu gübre uygulanan solungaç dokusu	33
Resim 4.11: Kontrol grubu böbrek dokusu	34
Resim 4.12: 15mg/L azotlu gübre uygulanan böbrek dokusu	34
Resim 4.13: 30mg/L azotlu gübre uygulanan böbrek dokusu	35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µ	Mikron
rpm	Devir / dakika
°	Derece
C	Santigrant
sn	Saniye
dk	Dakika
µm	Mikromol
M	Molar
ppm	Milyonda bir kısım
%	Yüzde
kD	Kilodalton

V	Voltaj
mA	Amper
N	Azot
N₂	Serbest azot
NH₃	Amonyak
NH₄	İyonize olmuş amonyak
NO₂⁻	Nitrit
NO₃⁻	Nitrat
P	Fosfor
C	Karbon
K⁺	Potasyum
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik Asit
CH₃COOH	Asetik asit

Kısaltmalar

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N',N' - Tetra methylethylen diamine
dH₂O	Distile su
Org-N	Organik azot
TA-N	Toplam amonyak azotu
MHI	Mononükleer hücre infiltrasyonu

1.GİRİŞ

Çevre, doğa ve insan tarafından biçimlenen öğeler ve koşullar bütünüdür. İnsan ve çevre birbirini tamamlayan, karşılıklı etkileşim içinde olan kavramlardır. Fakat son zamanlarda insan-doğa ilişkilerinin olumsuz yönden çeşitli boyutlara ulaştığı görülmektedir. Çünkü insanoğlu varoluşundan itibaren kendi yaşamsal ve kültürel faaliyetleri için doğal çevresini kirletmiş, değiştirmiş ve doğadaki dengeleri bozmuştur [1]. Çağımızda doğal dengeyi, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerin başında çevre sorunları gelmektedir. Hızla artan dünya nüfusunun beslenmesi, gelişen endüstrilerin ve daha uygar yaşama düzeyi sağlama amacı ile sürdürülen çabaların istenilmeyen bir sonucu olarak ortaya çıkan günümüzde de giderek artan boyutlarda önemini korumaktadır [2]. Hayatın temel öğeleri olan hava, su ve toprakta oluşan kirlilik insan hayatını ve geleceğini olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle doğal su kaynaklarında meydana gelen kirlilik, su kaynaklarının sürekliliğini etkileyecek boyutlara ulaşmıştır. Böylece suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri olumsuz yönde değişmiştir [1]. Doğal dengeyi bozan kirletici unsurlar; organik maddeler, endüstriyel atıklar, petrol türevleri, yapay tarımsal gübreler, deterjanlar, radyoaktif maddeler, pestisitler, inorganik tuzlar, yapay organik kimyasal maddeler ve atık ısı şeklinde gruplandırılabilirler [3].

Yapay gübrelerin kullanılmaya başlanmasından sonra gübrelerin toprak verimliliğine, üretilen besin maddelerinin niteliğine ve çevreye etkisi üzerindeki tartışmalar sürüp gitmektedir. Gübrelerin kullanılma alanı ve kullanılan miktarlarının artması, bu tartışmaları daha da alevlendirmiş ve gübreler çevre sularının kirlenmesinde temel unsur olarak gösterilmeye başlanmıştır. Primer kirlenme olarak adlandırılan, suların bitki besin maddeleri ile kirlenmesinin son senelerde arttığı bununla ilgili olarak da suların niteliğinin düştüğü bilinen bir gerçektir. Suların temel kirleticisi olarak da nitrat ve özellikle fosfat görülmektedir. Çünkü bu iki besin maddesi su florasının gelişmesinde temel unsur olarak görülmektedir. Sulardaki bitki besin maddesi oranının yükselmesi algler ve diğer su bitkilerinin gelişmesine ve sürekli olarak organik madde üretilmesine neden olur. Sular kendi kendini

temizlerken, organik maddelerin parçalanması için suyun oksijeni kullanılmakta ve sulardaki oksijen azalmasıyla sekonder su kirlenmesi ortaya çıkmaktadır.

Azotlu gübrelerin nitrat kaynağı olarak suların kirlenmesinde temel etken olması akla yakın gelmektedir. Zira azotlu gübreler masraf-fayda yönünden, faydanın ağır basması ve devlet tarafından çeşitli önlemlerle desteklenmesi nedeniyle; kullanma alanının hızla artması toprak verimliliğini de arttırmıştır [4].

Azotlu ürünler farklı hayvan gruplarında boşaltım, asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve yüzme yeteneği gibi değişik fizyolojik fonksiyonlarda son ürün olarak görülmektedir. Buna ek olarak ortalama % 25 civarında azotlu ürün yemlerle (%11-36) ya da diğer besleyicilerle (organik ve inorganik gübreler) de ortama katılabilmektedir. Bu şekillerde ortama katılabilen azot atıkları birikerek havuzların asimilasyon kapasitesinin üstüne çıkar. Su kalitesinin bozulmasına neden olan bu olay aynı zamanda sucul organizmalar için toksik etki yapmaktadır [5].

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Gübre/Gübreleme

Tohumun çimlenmesinden olgunluk devresinin sonuna kadar, bitki tarafından topraktan sömürülen veya toprak üstü organları tarafından alınabilen organik veya inorganik tabiatlı olan, bitkilerde gelişmeyi uyaran maddelere “gübre” ; bu maddelerin toprağa, gövdeye veya yapraklara verilmesine de “gübreleme” denir [6]. Gübrelemenin başlıca iki amacı vardır. Bunlar;

- 1- Toprakları bitki besin maddelerince zenginleştirmek,
- 2- Toprakların fiziksel ve biyolojik özelliklerini düzeltmek suretiyle yetiştirilecek bitkiye daha iyi bir gelişme ortamı sağlamaktır [7]. Nüfus artışına paralel olarak azalan tarım toprakları nedeniyle birim alandan alınacak ürün miktarının arttırılması amacıyla gübreleme, sulama ve tarım ilacı uygulamaları yapılmaktadır [8].

Gelişmiş ülkelerde nüfus artışı % 0.5 düzeyinde iken gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 2.5'e kadar çıkabilmektedir. İmkânların daha sınırlı olduğu gelişmekte olan ülkelerde, artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla kimi zaman güvenlik ve çevre kirliliği gibi, etkileri uzun süre sonra ortaya çıkabilecek konular daha az dikkate alınmakta ve bunun sonucu olarak tarımsal alanlarda kontrolsüz gübre ve ilaç kullanımı gündeme gelebilmektedir.

Tarım toprakları, bitki besin maddelerinin bitkiler tarafından alınması, yıkanması ve erozyona uğraması sonucu zamanla fakirleşmektedir. Bu nedenle; tarımsal üretimin en önemli kaynağı olan toprak; gübreleme, zararlılarla mücadele, işleme, sulama gibi tarımsal işlemler ile verimli hale getirilmeye çalışılmaktadır. Toprağın verimliliğini sürdürülebilmesinde bitkilerce kaldırılan besin maddelerinin toprağa takviye edilmesi yani gübrenmesi önemli konulardan birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Gübreler bu nedenle yıllardır önceliğini korumaktadır [9].

Ülkemizde 1950'li yıllardan sonra ve özellikle 1960'lı yıllarda tarımda yaygın kullanım alanı bulan suni gübrelerin tarımsal verimi artırdığı tartışılmaz ama ekolojik açıdan rasyonelliği henüz kanıtlanmış değildir. Ancak sularda deterjan, suni gübre ve pestisit atıklarından kaynaklanan alglerin aşırı üremesi ve ötrifikasyon; ötrifikasyonun derecesine göre yumurta bırakılması, yumurtanın döllenmesi ve balıkların beslenmesini olumsuz yönde etkilerken, sularda çözünmüş oksijeni azaltarak çözünmüş oksijen ihtiyacı fazla balık türlerinin yok olmasına da neden olmaktadır. [10].

Gübrelerden kaynaklanan kirlilik kapsamında üzerinde en fazla durulması gereken ve en fazla risk unsuruna sahip olan kirlilik çeşidi sulardaki nitrat kirliliğidir. Çünkü nitrat, tarımsal üretimde kullanılan gübrelere gün geçtikçe artan miktarlarda kullanılmakta ve toprakta birikmektedir. Biriken bu nitrat koşullara göre değişen miktarlarda yıkanarak toprak derinliğine hareket etmektedir. Toprakta mikroorganizmalar tarafından nitrifikasyonla gübre nitrata dönüşür ve nitratin negatif yüklü olması nedeniyle yıkanarak taban suyuna ulaşır. İdeal koşullarda bile toprağa uygulanan azotlu gübrelerin ancak % 50'sinin bitkiler tarafından kullanıldığı, % 2-20'sinin buharlaşma yoluyla kaybedildiği, % 15-25'inin killi toprakta bulunan organik bileşikler ile birleştiği ve geri kalan % 2-10'luk kısmının yüzey ve yer altı sularına karıştığı ifade edilmektedir. Sulardaki yüksek nitrat seviyesi, canlılığın azalmasına, ölü çocuk doğumlarına, düşük doğum ağırlıklarına ve çiftlik hayvanlarında düşük ağırlıklara neden olmaktadır. Nitrat iyonu insan vücudu için toksik değildir. Fakat nitratin indirgenmesi ile oluşan nitrit iyonları bebeklerde, methemoglobin adı verilen bir hastalığa neden olmakta ve ölüme kadar varabilen sonuçlar doğurabilmektedir. Nitratin toksik karakteri üzerinde çalışan araştırmacılar birim alanda kullanılan azot miktarları ile mide kanserinin neden olduğu ölüm vakaları arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmiştir [9].

2.2. Azot

Azot, periyodik cetvelde N simgesi ile gösterilen bir element olup atom numarası 7 dir. Renksiz, kokusuz, tatsız ve atıl bir gazdır. Azot, dünya atmosferinin yaklaşık %78'ini oluşturur ve tüm canlı dokularında bulunur. Azot ayrıca, aminoasit, amonyak, nitrik asit ve siyanür gibi önemli bileşikler de oluşturur [11].

Azot canlı yapısının temel elementlerinden birisidir ve canlı materyallerin kuru ağırlıklarının % 5'ini oluşturmaktadır. Azotun çoğunluğu proteinlerde aminoasitler olarak bulunur ve canlıların besininin vazgeçilmez bir bileşeni oluşturur [5].

Canlı metabolizmasında genetik özelliklerin nesilden nesile geçişini sağlayan azot elementi atmosfer ile yer kabuğunun üst kısmını kaplayan toprak arasında dinamik bir denge ile döngüsünü tamamlamaktadır. Azotun ana kaynağı atmosferde gaz halinde bulunan dildir. Biyolojik yolla fikse edilen (bağlanan) azot canlıların organik dokularının bileşimine girmekte ve yitirilen bu dokular daha sonra parçalanarak organik, inorganik ve gaz formunda bileşiklere dönüşmektedirler. Toprakta bulunan organik bağlı azotun NH_4 formuna dönüşmesi amonifikasyon adını alırken amonyumun NO_2^- ve NO_3^- e dönüşmesine nitrifikasyon denir. Bu işlemin tamamı ise azot mineralizasyonu olarak tanımlanır. Toprakta bulunan azotun tamamına yakını organik formdadır. Maksimum nitrifikasyon için topraktaki optimum sıcaklık 25-35 °C ve pH 6-8 arasında olmalıdır. Mantarlar gibi mikroorganizmaların etkili olduğu çok asidik topraklarda da nitrifikasyon olayı gerçekleşebilir. Bu olayda oluşan nitritin hemen nitrata dönüşmesi istenir. Çünkü nitritin toprakta artışı zararlıdır. Toprakta bağlı bulunan organik formdaki azotun yayılgı hale gelmesi amonifikasyon ve nitrifikasyon olaylarının sonucudur. Toprağa azot kazandırmanın bir başka yolu da yine topraktaki mikroorganizmalar tarafından olmaktadır. Atmosferin serbest halde bulunan azotunun mikroorganizmalar aracılığıyla biyokimyasal olarak organik forma dönüştürülmesi tarımda Biyolojik Azot Fiksasyonu olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar en iyi N_2 bağlanmasının baklagil bitkilerinin bulunduğu topraklarda olduğunu ortaya koymuştur [12].

Azotlu ürünler farklı hayvan gruplarında boşaltım, asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve yüzme yeteneği gibi değişik fizyolojik fonksiyonlarda son ürün olarak görülmektedir. Buna ek olarak ortalama % 25 civarında azotlu ürün yemlerle (%11-36) ya da diğer besleyicilerle (organik ve inorganik gübreler) de ortama katılabilmektedir. Bu şekillerde ortama katılabilen azot atıkları birikerek havuzların asimilasyon kapasitesinin üstüne çıkar. Su kalitesinin bozulmasına neden olan bu olay aynı zamanda sucul organizmalar için toksik etki yapmaktadır.

Canlı bünyesinin yanı sıra besin maddelerinde ve ölü organizmalarda bulunan azot, doğada, atmosfer-su sisteminde azot çevrimi dediğimiz bir döngü içinde sürekli bir dolanım halindedir. Bu nedenle azot bileşiklerinin su kirliliği açısından önemli bir kilit rolü vardır. Bunların başında ötrofikasyon, O₂ bilançosunun etkilenmesi ve içme sularındaki toksikolojik sorunlar gelir. Su ortamında bulunan azot bileşiklerini azot, organik azot, iyonize olmamış amonyak, amonyum, toplam amonyak, nitrit ve nitrat oluşturmaktadır.

Akuatik ortamda amonyak ve nitrit en toksik azotlu bileşiklerdir. Nitritten farklı primer olarak balık tarafından üretilmesi dolayısıyla, amonyağın ve oluşturduğu toksisitenin bilinmesi çok önemlidir [5].

2.2.1. Azot Çevirimi

Atmosferde bol miktarda (% 78) azot (N₂) bulunmasına karşılık canlılar bunu doğrudan alıp kullanamaz. Canlılar, azotu ancak azot bileşikleri (azotlu maddeler) hâlinde alır. Bu amaçla hayvanlar aminoasitlerden, bitkiler çözünmüş azot tuzlarından azot gereksinimlerini karşılar.

Azot döngüsü, aşamalı olarak aşağıdaki gibi gerçekleşir:

- Ölen organizmaların yapısındaki azot bileşikleri toprağa karışır. Bir yandan da hayvanların boşaltım artışı olan amonyak gibi azotlu maddeler de doğaya verilir.
- Toprak ve sularda bulunan bakteriler bu azot bileşiklerini parçalar. Parçalama sırasında çeşitli maddelerin yanında amonyak (NH₃) ve serbest azot (N₂) oluşarak ortama karışır.

- Amonyak, kimyasal tepkimelerle amonyum tuzlarına dönüşür.

- Bazı özel bakteriler, amonyum tuzlarını nitrit (NO_2) ve nitratlara (NO_3) dönüştürür. Baklagillerin köklerindeki gibi azot bağlayıcı bakterilerle algler, havanın serbest azotunu nitrit ve nitratlara dönüştürür. Bu arada şimşek ve yıldırım da havadaki azottan nitrat oluşumunu sağlar.

- Suda kolayca çözünen nitratlar, bitkilerin kökleriyle alınıp kullanılır. Kullanılan azotla bitkilerin protein, nükleik asit gibi azotlu maddeleri üretilir. Bunların bir kısmı bitkilerle beslenen hayvanların vücuduna geçer. Azot oksitleri vb. gazların yapay olarak bol miktarda üretilip kullanılması, ozon tabakasının incelmesine neden olur.

Yukarıda sıralandığı gibi canlılarla cansız çevre arasında azot döngüsü gerçekleşir. Azotun asıl kaynağı olan atmosferdeki azotun azalmaması, azot döngüsü ve doğal dengenin bozulmaması için;

- Gübre üretiminde hava azotunun aşırı kullanılması engellenmeli,

- Fosil yakıtların aşırı kullanılması yerine güneşten, rüzgârdan enerji üreten alternatif enerji kaynaklarının kullanılması sağlanmalıdır [13].

2.2.2. Azot Türleri:

Çizelge 2.2.2. : Su yetiştiricilik sistemlerinde başlıca azot formları [5].

Form	Sembol	Sucul Ortamdaki Rolü
Azot	N_2	Etkisiz gazdır. Atmosferden su içine ve dışına hareket eder, önemi yoktur.
Organik Azot	Org -N	Serbest amonyağın parçalanmasıyla oluşur.
İyonize olmamış amonyak	NH_3	Sucul hayvanlar için oldukça toksiktir. Yüksek pH düzeyinde daha çok ortaya çıkmaktadır.
İyonize olmuş amonyak (Amonyum)	NH_4^+	Çok yüksek konsantrasyonları dışında toksik değildir. Düşük pH düzeylerinde daha çok ortaya çıkmaktadır.
Toplam amonyak	$NH_3 + NH_4^+$	İyonize ve iyonize olmamış amonyağın toplamıdır. Çoğunlukla amonyak testlerinde toplam amonyak azotu olarak ölçüm yapılır. Nitrifikasyon bakterileri ile nitrite dönüşür.
Nitrit	NO_2^-	Sucul hayvanlar için toksiktir ve nitrifikasyon bakterileri ile nitrata dönüşür.
Nitrat	NO_3^-	Çok yüksek konsantrasyonları dışında toksik değildir. Su bitkileri tarafından kullanılabilir.

Amonyak (NH₃): Amonyak doğal sularda genellikle amonyum azotu (NH₄) halinde bulunur ki buna serbest veya tuz halindeki amonyak denir. Sularda amonyak, kimyasal ve fiziksel olaylar veya mikroorganizma faaliyetleri sonucunda oluşur. Kimyasal ve fiziksel olaylar sonucunda oluşan amonyağın sağlığa zararı yoktur. Ancak mikroorganizma faaliyetleri sonucunda oluşan amonyak organik madde kaynaklı olma ihtimali bakımından tehlikelidir. 0.5ppm'den büyük değer de amonyak kirliliğın belirtisidir.

Nitrit (NO₂⁻¹) : İçme suyunda kesinlikle istenmez. Güneş ışığı ve bazı bakteriler nitratları nitrite dönüştürür.

Nitrat (NO₃⁻) : Azotlu organik bileşiklerin son yükseltgenme ürünleridir. Kuyu sularında nitrat genelde daha fazla bulunur. Özellikle bebeklerde blue-baby denilen hastalığa neden olur. Vücudu morarmaya başlayan bebeklerde bu hastalık ölüme dahi neden olabilir.

Nitratlar suya topraktan geçmiş olabilir. Fakat amonyak ve nitritten kaynaklıysa tedbir alınmalıdır. Çünkü nitritlerin mevcudiyeti suda kirlenmeyi ifade eder. Nitritler yüksek miktarda organik madde ile bulunursa daha büyük bir kirlenme söz konusudur. Amonyak ta bazı bakteri türlerinin çoğalmalarına sebep olur ki bunlar suya kötü koku verirler.

Bu azot türleri alıcı ortama aşırı miktarlarda verildiklerinde organizmalar tarafından kullanılırlar. Bu alıcı ortam içerisinde ötrofikasyona (alg patlaması sonucu oksijen azlığı) sebep olur. Biriktirme haznelerinde alg patlamasını önlemek için hazneye giren N,P,C konsantrasyonlarını azaltmak ve ışığı kontrol etmek gerekir. Ayrıca haznedeki algleri çeşitli kimyasal maddelerle öldürmek de çözüm yollarından biridir. Ancak haznedeki canlı hayatı da göz önünde bulundurulmalıdır [14].

2.2.3. Azot'un Yol Açtığı Kirlilik

Azot, canlıların yapısını oluşturan temel elementlerden biridir. Gerek canlı bünyesinde, gerek besin maddelerinde ve gerekse ölü organizmalarda bulunan azot, doğada azot döngüsü içerisinde sürekli dinamik bir haldedir. Evsel atık sular ülkemizde su ortamına çoğunlukla doğrudan karıştığından atık suya kişi başına 8-15 g/gün azot bırakılmaktadır [15]. Endüstriyel tesislerden endüstri türüne bağlı olarak önemli miktarda azot, su ortamına verilmektedir. Azot yükü veren başlıca endüstri kuruluşları; gübre, nitroselüloz, gıda, deri, bira ve su endüstrileri ve mezbahalardır. Nitrat iyonları topraktan kolaylıkla yıkanarak suya geçmekte, böylece tarımsal drenaj suyu içerisinde önemli miktarda nitrat iyonu bulunmaktadır.

Yüzeysel sulardan temin edilen içme sularında amonyum konsantrasyonunun yüksek olması halinde birçok güçlükle karşılaşmaktadır. İçme suyunun temini amacıyla kullanılacak olan yüzeysel sularda amonyum konsantrasyonun 0,2-1,5 mg/L arasında olması istenmektedir. İçme sularında nitrat konsantrasyonları 4,5 mg/L' yi aştığında

sağlık problemleri çıkmaktadır. Yüksek NO_3 konsantrasyonlarında, yetişkinlerde barsak, sindirim ve idrar sistemlerinde iltihaplanmalar görülmektedir. İçme sularındaki yüksek nitrat konsantrasyonları bebeklerde methaemoglobin hastalığına neden olmaktadır. Altı aydan küçük bebeklerde mide asitleri oluşturmaktadır. Ayrıca balıklar ve diğer su hayvanları için nitratın toksite sınırı 3-13 g/L, nitritin 20-30 mg/L'dir. Amonyak, keskin kokulu, renksiz bir gaz olup, suda yaşayan canlılar üzerinde zehir etkisi yapmaktadır. Amonyak çoğu sularda biyolojik aktif bir bileşiktir ve azot içeren organik maddenin biyolojik olarak ayrışması sonucu meydana gelmektedir. Suda çözüldüğünde amonyağın bir kısmı su ile reaksiyona girer ve amonyum iyonları oluşur. Amonyum iyonu ise amonyak kadar toksik bir etkiye sahip değildir [16]. Sudaki serbest NH_3 , balıklarda merkezi sinir sistemi ile kan dolaşımını olumsuz yönde etkilemektedir. 0.2-2 mg/L arasındaki NH_3 konsantrasyonlarının balıklar için zararlı olduğu bildirilmiştir [17].

2.3. *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772)'nin Sistematikteki Yeri

Regnum (Alem)	: Animalia
Subregnum (Alt alem)	: Metazoa
Phylum (Şube)	: Chordata
Subphylum (Alt şube)	: Vertebrata
Superclass (Üst sınıf)	: Pisces
Class (Sınıf)	: Osteichthyes
Subclass (Alt sınıf)	: Actinopterygii
Superordo (Üst takım)	: Teleostei
Order (Takım)	: Cypriniformes
Family (Aile)	: Cyprinidae
Genus (Cins)	: Capoeta
Species (Tür)	: <i>Capoeta capoeta</i>
Subspecies (Alttür)	: <i>Capoeta capoeta capoeta</i> [18].

2.3.1 Familya ve Cins Özellikleri

Ülkemizde yaşayan kemikli balıkların, özellikle de tatlı su balıklarının büyük bir kısmını oluşturan bu familya, Kura-Aras Havzasında da oldukça yaygındır. Bu balıklarda baş çıplak, vücut ise sikloit tip pullarla örtülüdür. Ağızda maksiller (maxiller) diş bulunmaz. Bazı türlerde ağız protraktıl karakterde (körüklü) olup, tıpkı bir körüklü hortum şeklinde ileriye doğru uzayıp kısalabilir. Yağ yüzgeci (adipöz doku) bulunmaz. Bu familyanın en karakteristik özelliği olarak farinks dişlerinin varlığı gösterilebilir. Bu dişler genellikle operkulumun altında ve 4. solungaç yaylarının gerisindeki faringien kemikler üzerinde olup sıra, sayı ve şekilleri türlere

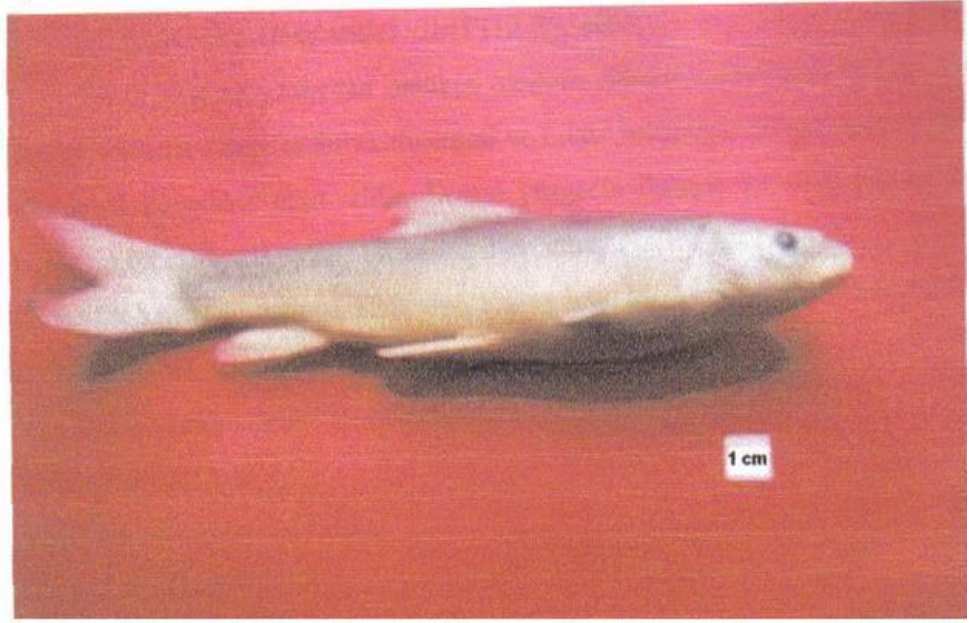
göre büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, cinslerin ve türlerin ayırımında önemli diagnostik özellikler olarak dikkate alınırlar. Sırtta daima tek dorsal yüzgeç vardır. Ventral yüzgeçler ise, bütün cins ve türlerde abdominal tiptedir. Hava keseleri mevcut olup, daima bir boğumla iki loba ayrılmıştır. Ayrıca pneumatofor adı verilen bir kanal sayesinde özofagus ile devamlı irtibat halindedir. Omur şeridinin ilk dört omuru birbiriyle az çok kaynaşarak Weber kemikleri denilen özel bir formasyon meydana getirmişlerdir. Mide civarında pilorik çekum denilen kör bağırsaklar bulunmaz. Genellikle bıyiksız iseler de bazen bir veya iki çift bıyık taşıyan temsilcilerine rastlanmaktadır. Ağız konumu itibariyle terminal, yukarıya yönelik veya alt durumlu olabilir.

Çoğunlukla sürüler halinde yaşarlar. Üreme zamanı ilkbahar ve yaz aylarıdır. Bu zamanda özellikle erkeklerin daha parlak ve süslü bir görünüm kazandığı, özellikle baş ve vücutları üzerinde küçük üreme tüberküllerinin meydana geldiği dikkati çekmektedir.

Ekonomik önemi olan bu familyanın bazı temsilcileri çabuk büyümeleri, yapay dölleme yoluyla yetiştirilmelerinin nispeten kolay olması gibi nedenlerle doğal yaşam alanlarının dışındaki birçok ülkelere insanlar tarafından taşınmışlardır.

Esas itibariyle, Eski Dünya Kıtaları adını verdiğimiz Asya, Avrupa ve Afrika' da yayılış göstermektedirler. Bununla beraber, Amerika'nın Kuzeye yakın bölgelerinde de bulunmaktadır. Daha da genelleştirecek olursak, Madagaskar, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Amerika, Kuzey Kanada ve Alaska, Grönland ve İzlanda hariç olmak üzere bütün dünyaya dağılmışlardır. Madagaskar ve Amazon civarındaki mevcudiyetleri insanlar tarafından çeşitli maksatlar için taşınmalarıyla mümkün olmuştur. Bu familya dünya yüzünde 15000'e yakın tür ile temsil edilirse de, Türkiye'de 30 cins ve 70 türü yaşamaktadır [18, 19].

2.3.2. Alttür *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772)



Resim 2.3.2: Siraz balığı (*Capoeta capoeta capoeta*)

Vücut yuvarlak olup, kısmen iri pullarla örtülmüştür. Baş, boyun, maksimal vücut yüksekliğinden biraz daha büyük veya ona eşit olabilir ve kuyruksuz vücut boyunda 4,3-4,8 defa bulunur. Üzerleri boynuzsu bir madde ile çevrelenmiş ve iyi gelişmiş dudaklar vardır. Ağız köşelerinde bir çift kısa bıyık yer alır. Dorsal'in serbest kenarı hafifçe içeriye doğru kavisli ve sonuncu basit ışının kaideden itibaren 2/3'ü testere şeklinde dişlenmiştir. Aynı ışının serbest ucu ise, tırtıksız, ince ve esnektir.

Renk sırtta koyu esmer, karın bölgesinde kirli sarıdır. Henüz erginlik çağına ulaşmamış genç fertlerde vücut üzerinde siyahımsı renkli küçük benekler görülürse de erginlerde bu benekler tamamen kaybolur ve bütün vücut homojen bir görünüş kazanır. Uzunluğu en fazla 70 cm kadardır.

Esas yayılış alanı Aras ve Kura nehir sistemleri olan bu ırk memleketimizde sadece Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yaşamakta olup, söz konusu nehirlerin sınırlarımız içerisinde kalan kaynak ve kollarında bilinmektedir. Eti lezzetli olup, insan gıdası olarak kullanılır. Bu nedenle memleketimiz için ekonomik önemi vardır [19].

2.4. Çalışma Alanı Hakkında Genel Bilgi

Kars Çayı farklı isimlerle anılan yan kollardan oluşur. Bunlar, Sarıkamış Çayı, Kekeç Çayı, Katranlı Çayı, Bayburt Suyu, Susuz Çayı, Çıldır Gölayağı, Karahan Çayı ve Tazekent Suyudur.

Uzunluğu 93 kilometre olan Kars Çayı'nın en uzun kolu Sarıkamış Çayı'dır. Soğanlı Dağları'nın Aşit Tepe (2350 m) eteklerinden doğan Sarıkamış Çayı, Sarıkamış İlçesi'ni geçtikten sonra Kars Çayı adını alır. Kars Çayı'nın su potansiyeli açısından en önemli kolu Kekeç Çayı'dır. Katranlı Çayı ve Bayburt Suyu ile birleştikten sonra Selim İlçesi Killik Düzü mevkiinde Kars Çayı'na karışır. Bu noktadan itibaren doğu yönünde akışını sürdüren Kars Çayı Kars İli'nin içinden geçerek Kuzeyden gelen Susuz Çayı ve Çıldır Gölü ayağını da alarak Arpaçay Baraj Gölü'ne dökülür [20].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Düzenegi

Bu çalışmada boyutları yaklaşık olarak aynı olan 36 adet *Capoeta capoeta capoeta* kullanıldı. Bu balıklar Kars Çayı'ndan yakalanarak laboratuvar ortamında 300'er L'lik tanklara alındı. 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra her grupta 12 balık olmak üzere 3 ayrı grup oluşturuldu ve I. gruptaki balıklar normal su ortamında, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 15 ve 30 mg/L, %33'lük azotlu gübre (% 16.5 Nitrat azot % 16.5 Amonyum azot) içeren su ortamlarında 15 gün süreyle bekletildi. Özellikle seçilen balıkların sağlık durumlarının iyi olmasına dikkat edildi. Çalışma süresi sonunda elektroforetik ve histopatolojik çalışmalar için balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Alınan kan numuneleri +4 °C ve 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlar analizler yapılmaya kadar -20 °C' de saklandı. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü [21]. Doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna alınarak tespit edildi.

3.2. Histopatolojik Çalışmalar

Formalin solüsyonunda 48 saat tespit edilen karaciğer, bağırsak, böbrek ve solungaç doku örneklerinden 2-4 µ kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlerin tamamı Hematoksilen – eosin boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51, JAPAN) incelendi.

3.3. Balıklarda Kan Alma Yöntemi

Balıkların kalplerinden ve kuyruklarından yeterli miktarda kan alabilmek için aşağıda belirtilen işlemlerden yararlanır.

Canlı: Kan alınacak numune canlı iken başı yukarıda ve kuyruğu aşağıda olacak şekilde tutulur ve bir vuruşta kuyruğu kesilerek dorsal aort damarından kan alımı gerçekleştirilir.

3.3.1. Kuyruktan Kan Alınması

Balıklar, başlarının hemen arkasından kuyruk kısmı aşağıda kalacak şekilde statife bağlı bir kıskaçla tespit edilirler. Pedünkül hemoskülatör ile kan damarlarını kapatamayacak şekilde sıkıştırılıp hareketsiz hale getirildikten sonra keskin bir bıçak ile kuyruk tek darbeye kesilir ve dorsal aorttan akmakta olan kan normal plastik tüplere direkt alınır.

Hangi yöntemle olursa olsun, balıktan kan alma işlemi en fazla 45 saniyede tamamlanmalıdır.

3.4. Total Protein Tayini

Serum örnekleri 1:10 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra Biüret metoduna göre total protein tayini yapıldı [22].

Çizelge 3.4.1. Total protein tayin prosedürü.

Çözeltiler	1-Kör tüpü	2-Standart tüpü	3-Numune tüpü
Albumin standardı (10mg/ml)	--	0.1 ml	--
Serum (Numune)	--	--	0.1 ml
%0,9 NaCl	1.4 ml	1.3ml	1.3 ml
Biüret çözeltisi	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

Çizelge 3.4.1' de verilen sıraya göre kör, standart ve numune tüpleri hazırlandı. Bir numaralı tüp protein taşımayan "kör tüpüdür". Tüpler hazırlanırken biüret çözeltisi en son ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra kör tüpü ile spektrofotometre 540 nanometre dalga boyunda sıfır absorbansa ayarlandı. Daha sonra standart ve numunelerin absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbanslardan aşağıda belirtilen formüllere göre total protein miktarı hesaplandı.

Numunenin Protein Konsantrasyonlarının Hesabı:

Numunenin Absorbansı

Numune Protein Konsantrasyonu (mg/ml): _____ x10

Standardın Absorbansı

3.5. Elektroforetik Çalışmalar

Büret metoduna göre total protein tayini yapılan serum numuneleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE), vertikal slab jel elektroforez sistemi kullanılarak Laemmli [23] ve O'Farrell [24] metotlarına göre yapılmıştır. Bu uygulama için aşağıdaki çözeltilerin hazırlanması yeterlidir.

3.5.1. % 30'luk Akrilamid Çözeltisi

7.5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid hassas terazide tartılarak bir miktar distile suda eritildi. Total hacim 25 ml' ye tamamlandı. Bu çözelti oda sıcaklığında koyu renkli şişede 2-3 ay dayanıklıdır. Akrilamid çözeltisinin nörotoksik etkili olması nedeniyle çalışırken eldiven kullanıldı.

SDS-Poliakrilamid jel solüsyonu için pH ve molariteleri farklı stoklama ve ayırma jel tamponları hazırlandı.

3.5.2. Stoklama Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)

1.5 g Tris ve 100 mg SDS hassas terazide tartılarak yaklaşık 10 ml dH₂O' da eritildi. Daha sonra pH' sı 6.8 olana kadar HCl çözeltisinden (1M) ilave edildi (yaklaşık 1 M HCl' den 7ml). Total hacim dH₂O ile 25 ml' e tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi.

3.5.3. Ayırma Jel Tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)

9.075 g Tris ve 0.2 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) hassas terazide tartılarak 7.5 ml dH₂O' da eritildi. Daha sonra tamponun pH' sı 1 M HCl çözeltisi ile 8.8' e ayarlandı. Total hacim dH₂O ile 25 ml' ye tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi. 1 M HCl çözeltisi, 11.7 M'lık stok HCl'den 8.55 ml alındı ve total hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

3.5.4. Yürütme Tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glisin , pH: 8.3)

3.03 g Tris, 14.4 g Glisin ve 1g SDS hassas terazide ayrı ayrı tartıldı ve ilk önce Tris ve Glisin 750 ml dH₂O' da eritildi, sonra SDS eklenerek pH 8.3' e ayarlandı. Total hacim distile suyla 1000 ml' ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

3.5.5. Numune Tamponu (0.0625 M Tris- HCl, pH: 6.8)

Stacking jel tamponu 1.25 ml

(0.5 M Tris- HCl, pH 6.8)

SDS 195 mg

Gliserol (%99'luk) 1 ml

2- Merkaptoetanol 0.5 ml

Bromophenol blue 1-2 mg

Distile suyla 10 ml' ye tamamlandı ve +4°C' de muhafaza edildi.

3.5.6. Jelin Boyanması İşlemi

Boyama işlemi için önce Coomassie blue çözeltisi hazırlandı.

Boyama çözeltisi:

Coomassie Brilliant Blue R.250	125 mg (%0.025)
Ethanol	200 ml (%40)
Asetik Asit (CH ₃ COOH)	35 ml (%7)

Total hacim distile suyla 500 ml' e tamamlandı. Hazırlanan bu boyama solüsyonu 20-40 defa kullanılabilir. Jeller bu boya solüsyonunda 2-4 saat bekletilmek suretiyle boyanırlar. Her jel için kendi hacminin 5-10 katı hacminde boya solüsyonu kullanıldı. Boyama esnasında hafifçe çalkalama işlemi jellerin daha iyi boyanmasını sağladı. Boyama işlemi çalkalamalı benmari su banyosunda 56-60⁰C' de bekletilmek suretiyle daha kısa sürede (20 dk) tamamlanabilir. Bu esnada sık sık çalkalama işlemi yapılmalıdır.

Bu yöntem her çizgide 0.1-0.5 mg proteini boyayabilir.

3.5.7. Jelden Boya Çıkarma İşlemi

Jeli boyadan çıkarma işleminde iki metot vardır. Bunlar;

1. Metot;

Methanol	%40' lık
Asetik asit (CH ₃ COOH)	%7'lik

Bu solüsyonda jeller 1 saat süreyle bekletilerek ve ara sıra çalkalamak suretiyle boya çıkarma işlemi gerçekleştirilir. Protein bantları dışındaki jel kısımlarının daha iyi beyazlaması isteniyorsa süre daha uzun tutulmalıdır.

2. Metot;

Methanol %5

Asetik asit (CH₃COOH) %7.5

Çalışmamızda boyadan çıkarma işleminde ikinci metod kullanıldı. Bu solüsyonda jellerin boyadan çıkarma işlemi bir gecede tamamlandı. Ancak, bu süre içinde boyadan çıkarma solüsyonu 2-3 defa değiştirilerek daha iyi sonuç elde edildi.

3.5.8. Diğer Kimyasallar ve Özellikleri

1. TEMED (N,N,N',N' - Tetra methylethylen diamine):

Hazır preparat olarak minimum %99'luk hazır çözeltisi bulunmaktadır. Bu çözelti koyu renkli şişede +4 °C'de konsantre halde süresiz bekletilebilir.

2. %1'lik Amonyum persülfat: Poliakrilamid jel çözeltisine polimerizasyon için ilave edilen bir ajandır. Karışıma çok az ilave edilmesi nedeni ile 5ml'lik veya daha az hacimde, özellikle deneyden hemen önce hazırlandı. Bu çözeltinin stabil olmaması nedeniyle her deneme için tazesini hazırlandı.

3.5.9. Kesikli Tampon Sistemli Jelin Hazırlanması

Kesikli jel sistemi, proteinlerin stoklandığı ve birbirinden ayrıldığı iki farklı konsantrasyonda iki ayrı jelden oluşmaktadır.

Bu jelin hazırlanması için ayırma ve stoklama çözeltileri gereklidir.

3.5.9.1. Ayırma Jelin Hazırlanması

Çizelge 3.5.9.1: Değişik Konsantrasyonlarda Ayırma Jeli Hazırlama Prosedürü.

	Ayırma jelin son konsantrasyonları (%)						
Stok çözeltisi (ml)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Poliakrilamid çözeltisi (%30)	20	17.5	15	12.5	10	7.5	5
Ayırma jel tamponu	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
%1 Amonyum persülfat	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Distile Su	5.49	7.99	10.49	12.99	15.49	17.9	20.49

Toplam hacim 30 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu jel hazırlanırken dikkat edilmesi gereken husus; %1'lik amonyum persülfatın çözeltiye en son katılmasıdır. Çünkü çözeltiye amonyum persülfat ilavesinden sonra polimerizasyon işlemi başlamakta ve kısa sürede gerçekleşmektedir.

3.5.9.2. Stoklama Jelin Hazırlanması

Çizelge 3.5.9.2: Değişik Konsantrasyonlarda Stoklama Jeli Hazırlama Prosedürü

	Stoklama Jelin Son Konsantrasyonları (%)			
Stok çözeltiler (ml)	6	5	4	3
% 30 Poliakrilamid	2	1.67	1.33	1
Stok Jel Tamponu	2.5	2.5	2.5	2.5
% 1 Amonyum persülfat	0.5	0.5	0.5	0.5
TEMED	0.075	0.075	0.075	0.075
Distile Su	4.925	5.265	5.595	6.425

Total hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanır. Bu çözeltiyi de hazırlarken %1'lik amonyum persülfat'ın en son ilave edilmesine dikkat edilmelidir.

3.5.10. Ayırma Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi

Plağa ilk önce ayırma jel dökülür. Proteinlerin birbirinden ayrılması %10'luk ayırma jelde yapılmıştır. %10'luk jel çözeltisi için;

%30'luk Poliakrilamid çözeltisi	10 ml
Ayırma jel tamponu	3.75 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0.75 ml
TEMED	0.01 ml
Distile Su	15.49ml

Yukarıdaki miktarlar 30 ml jel çözeltisi hazırlamak için gerekli olan miktarlardır. Ayırma jel çözeltisinin toplam hacminin 10 ml olması yeterlidir. Bunun için yukarıdaki miktarlar 2/3 oranında azaltıldı. Beher içerisine 1:2 ayırma jel tamponu konuldu ve arkasından 5.163 ml dH₂O ilave edildi. Daha sonra 0,0033 ml TEMED ilave edildi. Eğer jel kalınlığı 1 mm' den küçük ise ortamdaki oksijen uzaklaştırılmalıdır. Bunun için çözeltiyi bir kaç dakika vakum etmek yeterlidir. Aksi takdirde ortamdaki oksijen polimerizasyonda gecikmeye neden olacaktır. Polimerizan ajan olarak % 1'lik amonyum persülfat kullanılmıştır. Amonyum persülfat ilave edildikten sonra çözelti hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan ayırma çözelti 10 ml'lik enjektöre alındı ve vakit kaybetmeksizin düzenekteki boşluğa doldurulma işlemine geçildi. Ayırma jel çözeltisi köpürtülmezsizin düzenekteki işaretli yere kadar dolduruldu. Jelin üst yüzeyinin keskin ve düzgün bir çizgi haline geldikten hemen sonra hava ile temasını kesmek için jel yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak kadar dH₂O ilave edildi. %1'lik Amonyum persülfat, 50 mg alınarak 5 ml dH₂O' da çözmek suretiyle hazırlandı. Polimerize olan ayırma jelin üzeri naylon bir poşetle hava almayacak şekilde kapatıldı ve +4 °C' de bir gece bekletildi. Böylece polimerize olmamış akrilamid ve bisakrilamidlerin polimerizasyonu sağlandı. Tam

polimerizasyon sonrası akrilamid ve bisakrilamidin nörotoksitesi ortadan kalkar, dolayısıyla bu aşamadan sonra jellerle direk temasta hiç bir sakınca yoktur.

3.5.11. Stoklama Jelin Plağa Dökülmesi İşlemi

Proteinlerin stoklanması %4'lük stoklama jel üzerinde yapılmıştır. %4'lük stoklama jel solüsyonu hazırlamak için, bir mikropipetle aşağıdaki çözeltilerden uygun miktarlarda alındı ve total hacim 3,5 ml'ye tamamlandı.

Buna göre;

%30'luk Akrilamid çözeltisi	0.468 ml
Stoklama jel tamponu (pH 6.8, 0.5 M)	0.833 ml
%1'lik Amonyum persülfat	0.25 ml
TEMED	0.015 ml
Distile Su	1.95 ml
Toplam Hacim:	3.5 ml

Jel yüzeyindeki distile su boşaltıldı ve iki jelin kolay kaynaşması için ayırma jel yüzeyi stoklama tamponla yıkandı. Daha sonra numune yükleme çukurlarını oluşturmak için tarak cam levhalar arasına yerleştirildi. Tarağın kenarından stoklama jel çözeltisi bir enjektörle yavaş yavaş plağa aktarıldı. Ancak jel içinde hava kabarcığı bulunmamasına dikkat edildi. Bu arada tarak yerleştirildikten sonra protein uygulanacak kanallar cam kalemle işaretlendi. Stok stoklama jel solüsyonu polimerize olduktan sonra tarak alındı ve kanal aralıkları da bir lanset yardımıyla düzeltilti. Protein yükleme çukurları yürütme tamponuyla bir kaç defa yıkanarak jel artıkları temizlendi. Sonra elektroforez tankları yürütme tamponu ile (Tris-Glisin pH 8.6) dolduruldu ve plaktaki lastik conta ve klemler çıkarıldı. Jel tanka yerleştirilerek plağın alt kısmında oluşan hava kabarcıkları enjektör yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu işlemlerden sonra serum numunelerinin hazırlanmasına geçildi.

3.5.12. Serum Numunelerinin Sulandırılması ve Jele Yükleme İşlemi

1 ve 5 numaralı jel çukuruna molekül ağırlıkları bilinen standart proteinler aplike edildi. 2 numaralı jel çukuruna kontrol grubu numunesi, 3 numaralı jel çukuruna 15mg/L dozda azotlu gübre verilen *Capoeta capoeta capoeta* numunesi 4 numaralı jel çukuruna, 30 mg/L dozda azotlu gübre verilen *Capoeta capoeta capoeta* serum numuneleri uygulandı. Standart olarak molekül ağırlıkları farklı olan 4 protein kullanıldı. Bunlar; karbonik anhidraz (29 kD), tripsinojen (18 kD), yumurta albumini (45 kD), sığır albumini (66 kD) 'dir. Bu standart proteinlerin her birinden 1' er mg alındı ve 1 ml dH₂O' da 1 mg/ml'lik standart hazırlandı. 1mg/ml standarttan 200 µl alınıp 200 µl dH₂O ile sulandırıldı. Böylece son protein konsantrasyon 0.5µg/µl oldu. Daha sonra sample tamponla 1/2 oranında sulandırıldı. Jele bu standart proteinlerin her birinden 5 µg uygulandı.

Daha sonra total protein konsantrasyonu bilinen serum numuneleri total proteinlerinin gr/dl cinsinden miktarlarına göre sulandırılması işlemine geçildi. *Capoeta capoeta capoeta*'dan alınan serum numuneleri sulandırılarak son protein konsantrasyonları 4 µg/µl'ye ayarlandı.

En sonunda her bir numune tüpünden 200 µl serum alındı ve her birinin üzerine 200 µl sample tampon ilave edilerek son protein konsantrasyonu 2µg/µl' ye ayarlanmış oldu.

Hazırlanan serum numuneleri bir beher içerisine bir miktar su konularak 100 °C'de 3 dk süreyle kaynatıldı. Numune tamponundaki 2-merkapt ethanol proteinlerdeki disülfid bağlarını açar ve denatüre olmalarını sağlar. Böylece serum proteinleri tek polipeptidler haline gelmiş olur. Her jel çukuruna 20' şer µl numune uygulandı. Böylece 40 µg protein jele yüklenmiş oldu. Numuneler plaktaki yerlerine uygulandıktan sonra proteinler 200 V ve 30 mA' de yürütüldü.

Elektroforez de proteinleri yürütme işlemine yaklaşık 2,5 saat devam edildi. Sürenin sonunda jel tanktan alınarak boyama solüsyonda boyama işlemine geçildi. Bu arada plak üzerindeki stoklama jeli kesilerek atıldı. Jeli içinde 250 ml boyama solüsyonu

olan bir kaba bırakıldı. Jel, 56-60 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 20-30 dk inkübe edildi. Bu esnada kap içindeki boya çözeltisi hafifçe çalkalanarak jelin daha çabuk boyanması sağlandı.

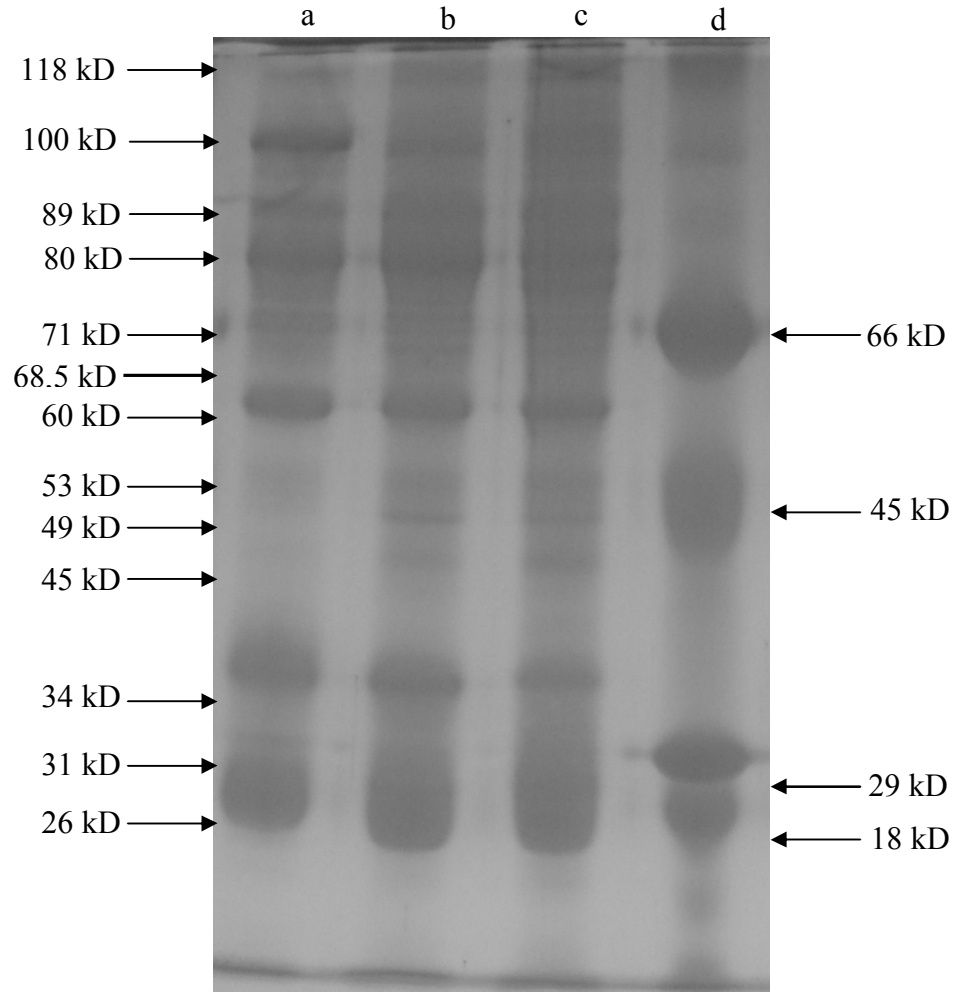
Bu işlem tamamlandıktan sonra her jel, boyadan çıkarma işlemi için %5 metanol ve %7,5 asetik asit bulunan bir kaba alınarak protein bantları dışındaki jel kısımlarının şeffaflaşması sağlandı. Bu işlem, jellerin su banyosunda 55-60°C' de 60-70 dk bekletilmek suretiyle yapıldı. Bu esnada jeller hafifçe çalkalandı. Ancak, boyadan çıkarma işlemi esnasında boyadan çıkarma çözeltisi bir kaç defa yenilendi. Bu işlemlerden sonra jeller %7'lik asetik asit içinde muhafaza edildi. Sonra jellerin fotoğrafları çekildi. Proteinlerin moleküler ağırlığı Weber ve ark. (1972)'lerinin metoduna göre hesaplandı [25].

4.BULGULAR

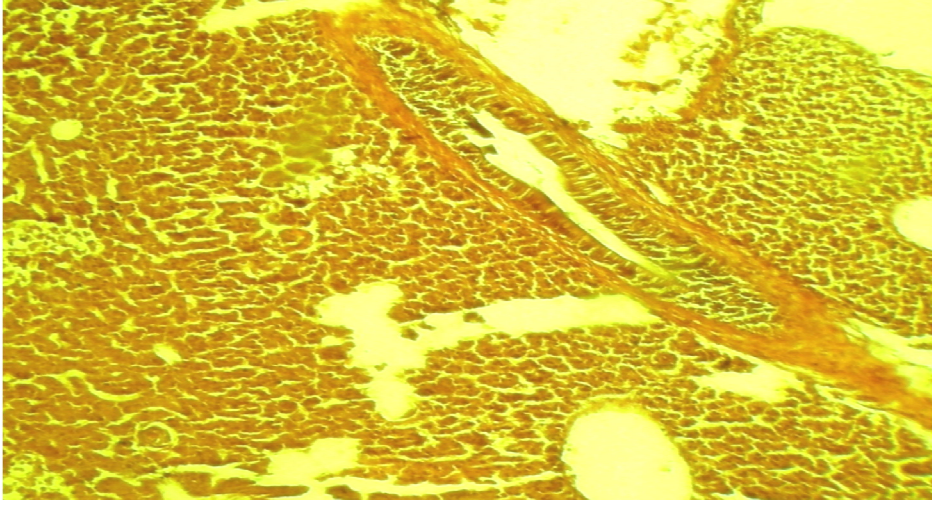
Çalışma süresi içinde hayvanların davranışlarında yavaşlama ve yem alım istediğinde azalma gözlemlendi. Yem alım isteğinin azaldığını tank dibinde biriken yemlerden anlaşıldı. Ayrıca, azotlu gübre uygulamasının 14. gününde 4 balık öldüğü tespit edildi.

Serum numunelerinin SDS-PAGE' den elde edilen elektroforegramında 15 mg/L ve 30mg/L azotlu gübre uygulaması sonucunda 118 kD, 89 kD, 53 kD, 49 kD, 45 kD ve 26 kD'luk protein bantlarında kontrol grubuna göre kalınlaşmalar, 100 kD, 60 kD ve 34 kD'luk protein bantlarında incelmeler, 31 kD'luk protein bandının inhibe olduğu ve 68.5 kD'luk protein bandının ise yeni sentezlendiği saptandı (Resim 4.1.).

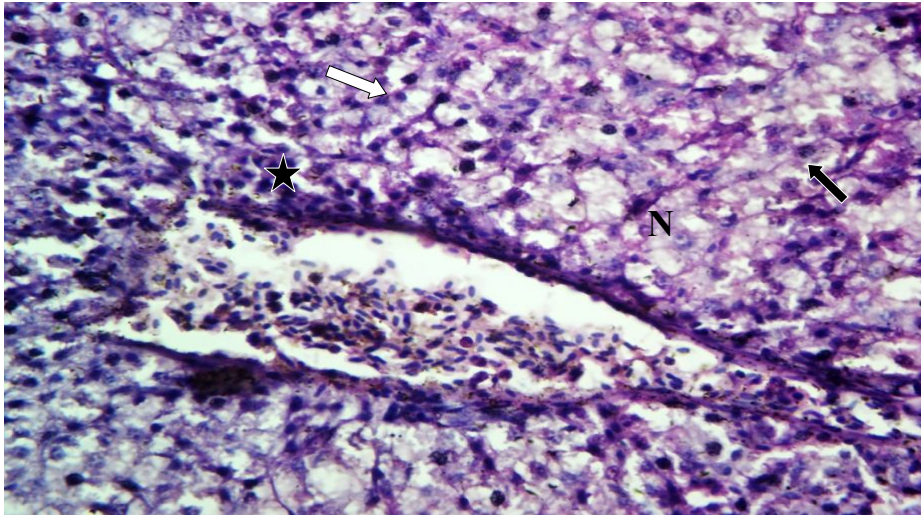
Azotlu gübre uygulaması ile oluşturulan gruplardan elde edilen karaciğer, bağırsak, solungaç ve böbrek dokularında yapılan incelemelerde doz artışıyla orantılı olarak dejenerasyon, nekroz ve yangısal hücre infiltrasyonları tespit edildi. Kontrol grubu deneklerinden alınan doku örnekleri normal görünümdeydi. Çalışma gruplarında karaciğer dokusunda kontrol grubuna kıyasla doz artışıyla orantılı olarak vakuolar dejenerasyon, nekroz, hiperemi ve portal bölgelerde mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Resim 4.8.). Böbrek dokularında korteksde proksimal tubul epitellerinde hidropik ve/veya vakuolar dejenerasyon, bazı tubullerin lümenlerinde hiyalin silindirleri ile intertubuler bölgelerde hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Resim 4.13). Bağırsak dokularının histopatolojik incelemelerinde villusların apeksindeki epitellerde hidropik dejenerasyon, nekroz ile yer yer deskuamasyon belirlendi. Lamina propriada ise hafif mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (Resim 4.15). Solungaç dokularında, sekonder lamellerde sıklıkla füzyon gözlenirken, doz artışına bağlı olarak clara ve epitelyum hücrelerinde nekroz tespit edildi (Resim4.11).



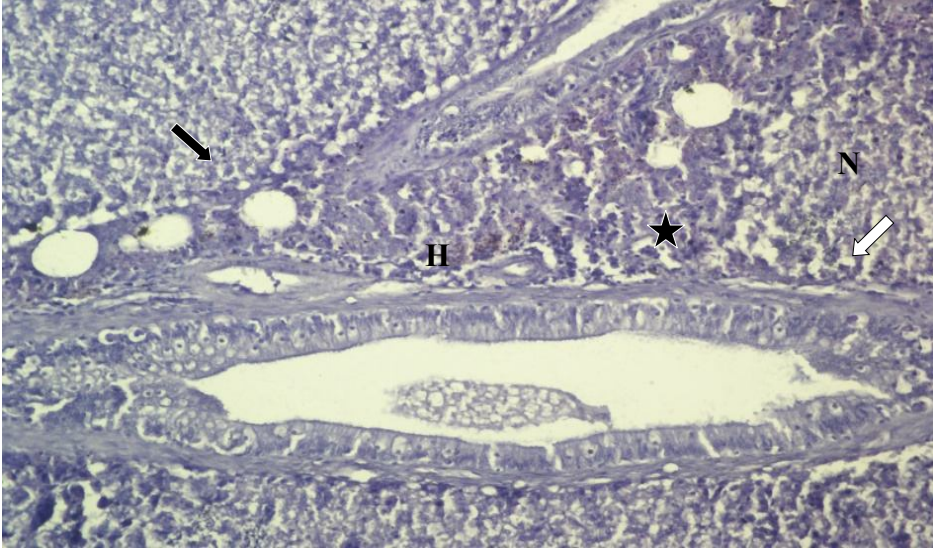
Resim4.1. Azotlu gübreyeye maruz bırakılan *Capoeta capoeta capoeta*'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. a. Kontrol grubu, b. 15mg/L azotlu gübre uygulanan grup, c. 30mg/L azotlu gübre uygulanan grup, d. Standart proteinler.



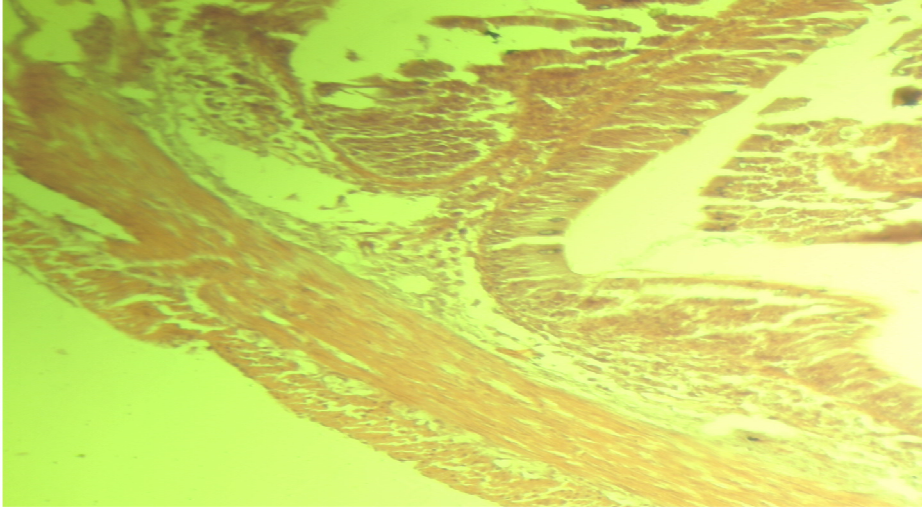
Resim4.2. Karaciğer dokusu kontrol grubu. H-E. 10x



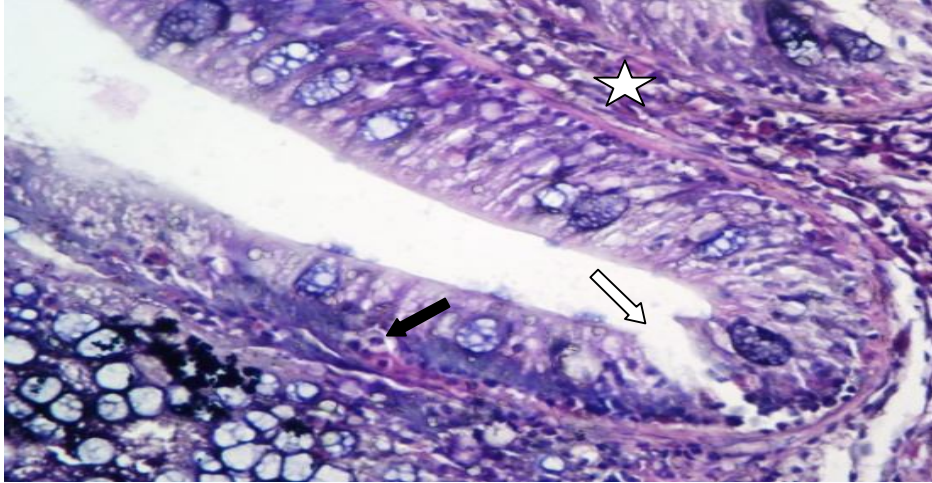
Resim 4.3. 15mg/L azotlu gübre uygulanan karaciğer dokusu. Nekroz (N), Piknotik dejenerasyon (Siyah ok), Vakuolar dejenerasyon (Beyaz ok) ve MHI (Yıldız). H-E. 20X



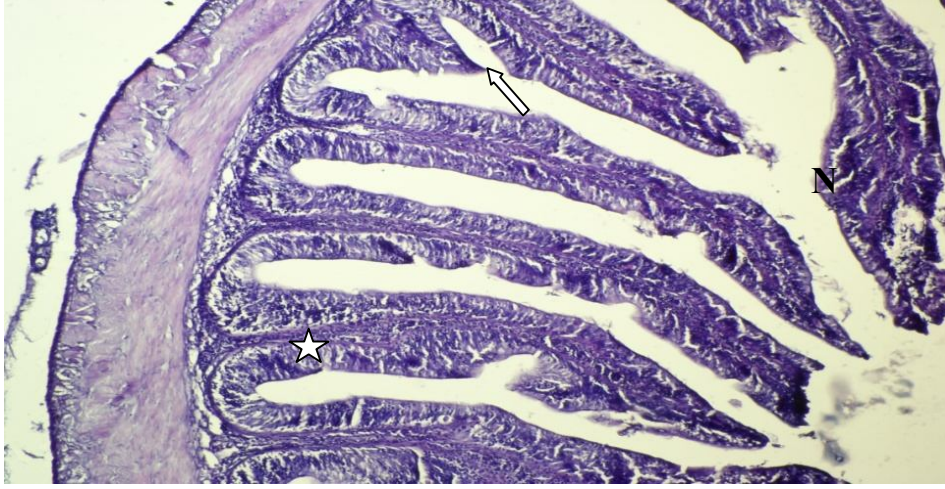
Resim 4.4. 30mg/L azotlu gübre uygulanan karaciğer dokusu. Nekroz (N), Hiperemi (H), MHI (yıldız), Piknotik dejenerasyon (Siyah ok) ve Vakuolar dejenerasyon (Beyaz ok). H-E. 20X



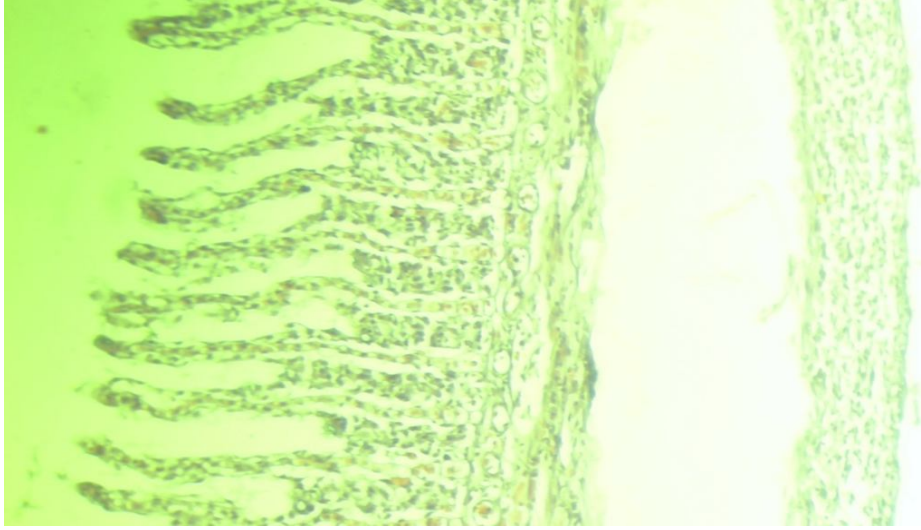
Resim 4.5. Kontrol grubu bağırsak dokusu. H-E. 20X



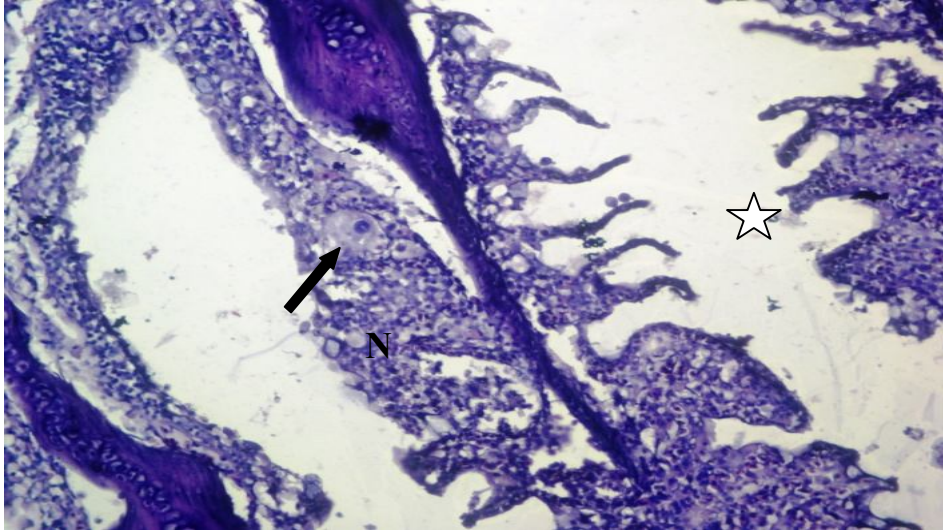
Resim 4.6. 15mg/L uygulanan bağırsak dokusu. Deskuamasyon (beyaz ok), bağı dokuda MHI (yıldız) ve hidropik dejenerasyon (siyah ok). H-E. 40X



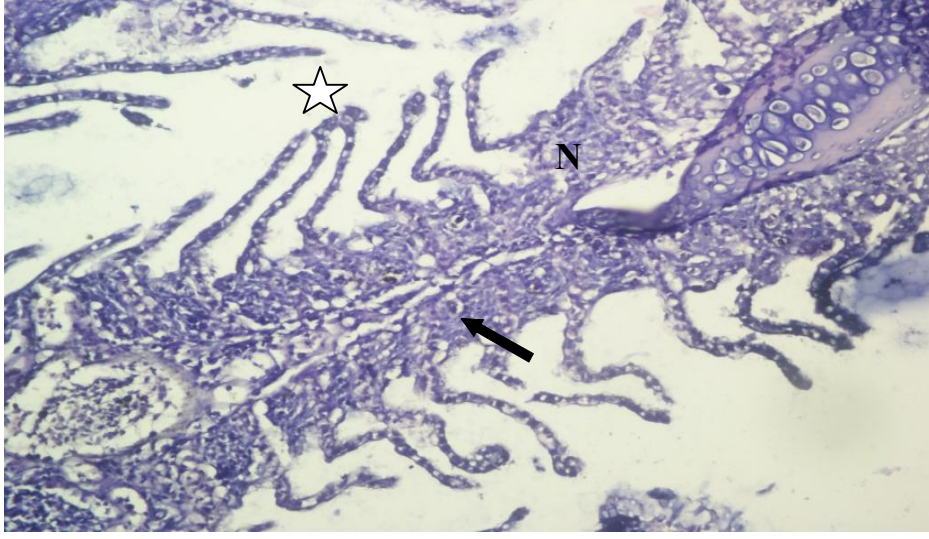
Resim 4.7. 30mg/L azotlu gübre uygulanan bağırsak dokusu (H-E 20x) deskuamasyon (ok), nekroz (N) ve MHI'lar (yıldız) gözlenmektedir.



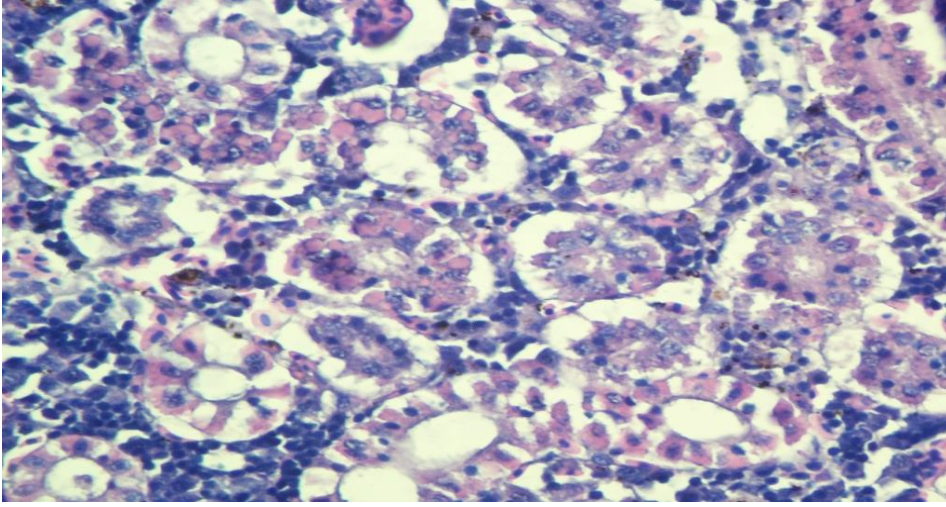
Resim 4.8. Kontrol grubu solungaç dokusu. H-E. 20X



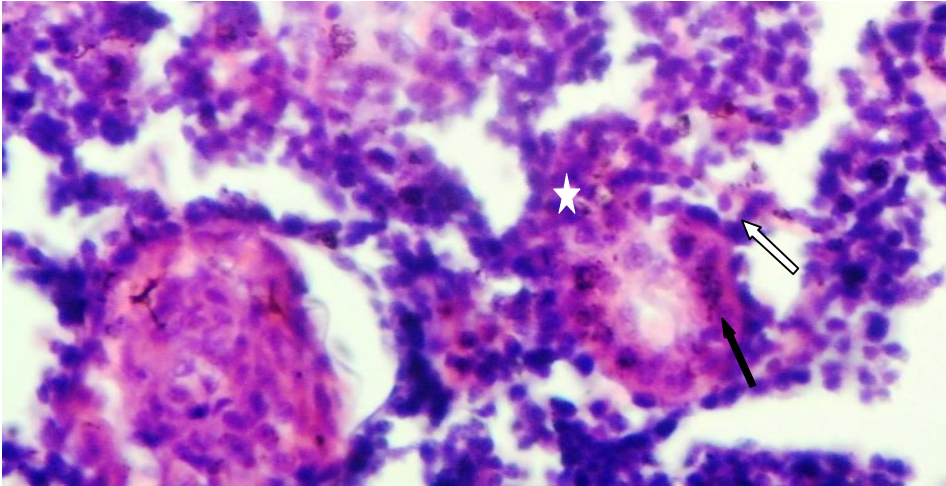
Resim4.9. 15mg/L azotlu gübre uygulanan solungaç dokusu. Sekonder lamellerde füzyon (yıldız), clara hücrelerinde nekroz (beyaz ok) ve epitel hücrelerinde nekroz (N). H-E. 40X



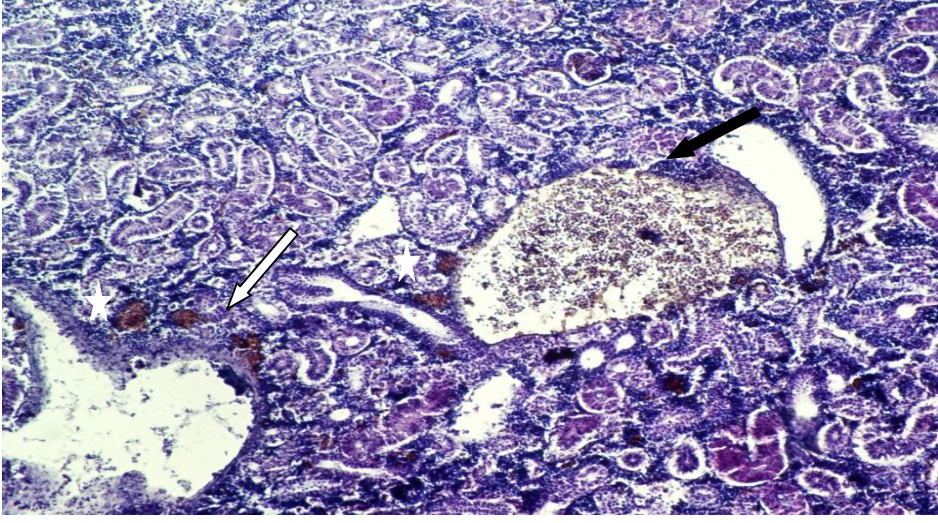
Resim 4.10. 30mg/L azotlu gübre uygulanan solungaç dokusu. Sekonder lamellerde füzyon (yıldız), clara hücrelerinde nekroz (ok) ve epitelyum hücrelerinde nekroz (N). H-E. 40X



Resim 4.11.Böbrek dokusu kontrol grubu. H-E. 20X



Resim 4.12. 15mg/L azotlu gübre uygulanan böbrek dokusu. Vakuolar dejenerasyon (Beyaz ok), MHI (Siyah ok) ve Hiyalin silindiri (Yıldız). H-E. 40X



Resim 4.13. 30mg/L uygulanan böbrek dokusu. Hidropik dejenerasyon (Beyaz ok), MHI (Siyah ok) ve Hiyalin silindirleri (Yıldız). H-E. 20X

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerine yapılan bir çalışmada azot uygulaması ile histolojik olarak balığın böbreğinde, deri, solungaçlar, karaciğer ve pankreas dokularında lezyonlar meydana geldiği, epidermiste boşluklu epithelial hücreleri olduğu, mikrokistik dilatasyon, ve mukus hücresinde intrasellüler ödem, karaciğerde şişkinlik ve lenf bezi yapısını kaybetmeyen hepatositlerle birlikte hematopoetik dokuların, böbreğin proximal tubullerinde nekroz ve vakuoler dejenerasyonlar tespit edilmiş ve dolayısıyla da en çok etkilenmiş organların, deri, karaciğer ve böbrek olduğu bildirilmiştir [26]. Yine gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 2 saat süre ile 0.1 mg/L NH₃'e maruziyet sonucu lamella yüzeyinin tamamen, filament ve lamella epitelinin ise yüzeysel olarak katlandığı, aynı konsantrasyonda 24 saat sonunda ise filament üzerindeki 2 ya da 3 lamellada telangiektazi görülmüştür. 0.5 mg/L NH₃'e maruz kalmış solungaçların lamellalarında daha fazla kıvrılma ve katlanma meydana geldiği, 24 saat sonunda ise epiteldeki deformasyonların daha derin çukurlar şeklinde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca mukus ve klorit hücrelerde artma ile mukus hücrelerinde şekil bozukluğu saptanmıştır [27]. Kanada Ontorio'da gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde Nisan- Mayıs aylarında suda amonyağın toksik düzeylere gelmesi (> 0.04 NH₃-N mg/L) sonucu 48 saat içerisinde 450-500 gr'lık 13000 pazarlık balıktan 4000'nin öldüğü bildirilmiş, patolojik inceleme sonucu solungaç lamellalarında telangiektazi ve böbrekte kongesyona rastlamışlardır [28]. Bu çalışmada da sekonder lamellerde sıklıkla füzyon gözlenirken doz artışına bağlı olarak clara ve epitelyum hücrelerinde nekroza rastlandı. Bu bakımdan yukarıdaki literatürle hemen hemen uygun olduğu gözlemlendi.

Subletal amonyak konsantrasyonlarının Tilapia (*Oreochromis niloticus*) ve Sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında büyüme ve kan parametreleri ile dokulara etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, amonyağa maruz kalan Nil tilapia ve sazan balıklarının solungaç, karaciğer ve böbreklerinde su sıcaklığı ve amonyak konsantrasyonuna bağlı olarak değişen oranlarda histopatolojik bulgular kaydedilmiştir. Her iki türde solungaç dokularında hiperemi, sekonder lamellalarda klorit hücre proliferasyonu, füzyon ve telangiektazi; karaciğerlerde pasif hiperemi, albumin ve hidropik

dejenerasyon; böbreklerde hiperemi, kanama, glomerulonefritis saptanırken, sazan balıklarında kimi böbrek tubul epitellerinde nekroza varan bozukluklar saptanmıştır. Yine pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balıkları üzerinde yapılan bir araştırmada, 20-22°C'de 24 saatlik periyotta LC₅₀ değerleri 12.3 mg/L TA-N (4.55 mg/L NH₃-N) olarak saptanmıştır. Yapılan histopatolojik incelemeler sonucu solungaçlarda hiperemi, ödem ve anevrizma; böbrekte tubul ve glomerulide dejeneratif değişiklikler, Bowman kapsülünde genişleme, hiperemi, kongesyon ile hemoraji; karaciğerde hiperemi, dejenerasyon ve bazı nekrotik alanlar en yaygın görülen lezyonlar olarak belirlenmiştir [5]. Mevcut çalışmada balıkların, böbrek dokularında korteksde proksimal tubul epitellerinde hidropik ve/veya vakuolar dejenerasyon, bazı tubullerin lümenlerinde hiyalin silindirleri ile intertubuler bölgelerde hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonları dikkat çekmektedir.

20 gün süreyle, yaklaşık 2.5 aylık olan çipura (*Sparus aurata*) yavrularının kullanıldığı kronik toksisite çalışmasında, amonyağın büyüme ve yaşama oranı üzerine etkisi incelenmiştir. 20 günün sonunda 13 mg/L TA-N' na maruz kalan çipura yavrularında ağırlık kazancı kontrol grubuna göre % 39 oranında azaldığı gözlenmiştir. Yaşama oranları ise 15.7 mg/L TA-N' na maruz kalan çipura yavrularında kontrol grubuna göre % 50 oranında düştüğü saptanmıştır. Aynı deneyde araştırmacılar, her amonyak konsantrasyonundan iki balığın solungaç, karaciğer, böbrek ve dalaklarını histolojik olarak incelemişlerdir. Amonyaga maruz kalan balıklarda karaciğer hücrelerinin merkezinde bir miktar yağ vakuolizasyonu ve hücre sitoplazmasının çoğunlukla granüler olduğunu saptamışlardır. Karaciğer dokusundaki bu lezyonlar 8.2 mg/L TA-N ve 13 mg/L TA-N dozlarında arasında gözlenmiştir. Ayrıca karaciğerde hepatositlerde bir miktar atrofi, sitoplazmada ayrışma ve yağ vakuolasyonu görülmüştür. Solungaç, böbrek ve dalakta ise herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır [29].

Sibiry Mersin balıklarında (*Acipenser baeri*) yapılan çalışmada, 24 saatlik LC₅₀ değerleri ağırlığı 60 mg olan balıklarda 1 mg/L, 10-270 g arasında olanlarda 1.7 mg/L ve ortalama 450 gr olan balıklarda ise 2.5 mg/L olarak saptanmıştır. Bunun yanında serum K⁺ ve hematokrit konsantrasyonlarının amonyağa bağlı olarak önemli

ölçüde arttığı belirlenirken, solungaç lamellarında hiperplazi, hipertrofi ve nekrozlar saptanmıştır [30].

Mevcut çalışmada balıklardan alınan karaciğer, bağırsak, solungaç ve böbrek dokularında hücre dejenerasyonları, yer yer izlenen MHI'lar ve nekrozlar bakımından yukarıda belirtilen literatürlerle uygunluk gösterdiğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, 15 ve 30 mg/L'lik dozlarda %33'lük azotlu gübreye maruz kalan *Capoeta capoeta capoeta*'nın karaciğer, bağırsak, böbrek ve solungaç dokularında histopatolojik dejenerasyonlara sebep olduğu ve bu hasarın şiddetinin de doz artışına bağlı olarak arttığı gözlemlendi. SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramda ise kontrol grubuna göre deney gruplarındaki bazı serum protein bantlarında kalınlaşmalar ve incelmeler olduğu görüldü. İlaveten, 68.5 kD'luk protein bandının her iki grupta da sentezlendiği ve 31 kD'luk proteinin ise her iki grupta da inhibe olduğu gözlemlendi. Azotlu gübre uygulamasına karşı, balığın bağışıklık kazanmak amacıyla serum proteinlerinde bu değişikliklerin meydana geldiği düşünüldü. Buna ilaveten, her iki azotlu gübre uygulamasında, balığın karaciğer, solungaç, bağırsak ve böbrek dokularına şiddetli bir şekilde hasara yol açtığı gözlemlendi. Bu çalışmada, 14. günde 4 balık öldü. Bunun sebebi Non-Protein Azot (NPN) zehirlenmesinden kaynaklandığı sonucuna varıldı. Bu çalışmanın histopatolojik olarak değerlendirilen sonucunda yüksek miktarda azotlu gübrenin sucul ortamdaki canlılar için toksik etkiye yol açtığı ve bilinçsiz gübrelemenin canlı hayatında olumsuzluklara neden olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Yıldız, K., Sipahioglu, S., Yılmaz M., “Çevre Bilimi”. *Gündüz Eğitim ve Yayıncılık*, Ankara, 26-28, 104-107 (2000).
- [2] Baş, A.L., Demet, Ö., “Çevresel Toksikoloji Yönünden Bazı Ağır Metaller”. *Ekoloji Dergisi*, 5, 42-46 (1992).
- [3] Kaya, S. Pirinçci, İ., Bilgili, A., “Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi”. *Medison Yayın Serisi*, Yayın no/36 (1998).
- [4] Yüksel, A.N., “Tarımda Kullanılan Azotlu Gübrelerin Kayıp Yolları ve çevre Sularına Etkisi”. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10/1-2 (1979)
- [5] Benli, A.Ç.K., “Subletal Amonyak Konsantrasyonlarının Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Ve Sazan (*Cyprinus Carpio*) Balıklarında Büyüme ve Kan Parametreleri İle Dokulara Etkisi”. Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-216 (2006)
- [6] Danışman, F., Bellitürk, K., “Yapraktan Beslenme”. *HR.Ü.Z.F.Dergisi*, 11(1/2):7-12 (2007)
- [7] http://www.tarimkutuphanesi.com/GUBRE_VE_GUBRELEME_00275.html
- [8] Benli, A.Ç.K., Gülen, Z., “Fenitrothion’un Etkisinde Bırakılan Tilapia’da (*Oreochromis niloticus* L.) Sekonder Stres İndikatörleri Hematokrit ve Plazma Glukoz Seviyesinin Değişimi”. *YYÜ Tar Bil Derg* (Yyu J Agr Scı), 19(1): 19-22 (2009)
- [9] Sönmez, İ., Kaplan, M., Sönmez, S., “Kimyasal Gübrelerin Çevre Kirliliği Üzerine Etkileri Ve Çözüm Önerileri”. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 25(2):24-34 ISSN 1300-3496 (2008)
- [10] Nuhoglu, Y., Öymen, T., “Doğu Karadeniz Bölgesi (Bölümü) Su Kaynakları Kirliliği İle Balık Populasyonları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi”. *Çevre Dergisi* sayı:6 syf: 28-33 (1993)

- [11] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Azot>
- [12] www.bahceselform.com
- [13] <http://www.canlibilimi.com/madde-donguleri-nedir.asp>
- [14] <http://www.diyadinnet.com/YararliBilgiler-925&Bilgi=su-ve-suyun-%C3%B6nemi>
- [15] Tepe, Y., Ateş. A., Mutlu, E., Töre, Y., “Karagöl’ün (Erzin-Hatay) Bazı Fiziko-Kimyasal Özellikleri”. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, Cilt 23, (1/1): 155-161 (2006)
- [16] Erdem, E., “Mersin-Tarsus Arasında Alüvyon Akiferde Yeraltı Suyu Kirliliğinin Fotometrik Ölçümler İle Araştırılması”. Yüksek Lisans Tezi, *Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (2006)
- [17] <http://duzce.cevreorman.gov.tr/Duzce/AnaSayfa/CYCEDSubeMudurlugu/suKirliligi.aspx?sflang=tr>
- [18] Kuru, M., “Omurgalı hayvanlar”. *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, No:646, s735 (1987).
- [19] Geldiay, R., Balık, S., “Türkiye tatlısu balıkları IV Baskı”, *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No:9, İzmir, s361-s367(1988).
- [20] Karakuş, S., “Kars Çayı’ndan avlanan siraz balıklarında (*Capoeta capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1772) bazı ağır metallerin (demir, bakır, çinko, krom, kobalt ve kadmiyum) derişim düzeylerinin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kars, 1-33 (2004).
- [21] USEPA. “Ecological soil screening levels for cobalt.” Washington, DC: *US EPA*; (2005).
- [22] Robert, R., Michael, J.D., “Enzyme assays”, *Oxford University Pres*. Newyork: 225-332 (1993).

- [23] Laemmli, U.K., “Cleavage of structural proteins during the assemble, of the head of bacteriophage”. *T4, Nature*, 227,680 (1970).
- [24] O’Farrell, P.H., “High resolution two-dimensonal electrophoresis of biological properties and significance”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 M, 497-501 (1975).
- [25] Weber, K., Pringle, J., Osborn, M., “Measurment of molecular weights by electrophoresis on sds- acrylamide gel”. *Meth. Enzymol.*, 26,3 (1972).
- [26] Çapkin, E., Birincioglu, S., Altinok, I. “Histopathological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to sublethal composite nitrogen fertilizers”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2009)
- [27] Kirk, R. S. and Lewis, J. W., “ An evaluation of pollutant induced changes in the gills of rainbow trout using scanning electron microscopy”. *Environmental Technology*, 14, 577-585 (1993)
- [28] - Speare, D. and Backman, S.,” Ammonia and nitrite waterborne toxicity of commercial Rainbow Trout”. *Can. Vet. J.* , 29, 666 (1988)
- [29] Wajsbrodt, N., Gasith, A., Diamant, A. and Popper, D. M., “ Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and related histopatological effects”. *Journal of Fish Biology*, 42, 321-328 (1993)
- [30] Salin, D. and Williot, P.,. Acute toxicity of ammonia to Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)”. (Ed.) *Acipenser, Cemagref Publ.* 153-167 (1991)

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: **Seda VURAL**

Doğum Yeri: **İĞDIR**

Doğum Tarihi: **05.05.1986**

Medeni Hali: **BEKAR**

Yabancı Dili: **İNGİLİZCE**

Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)

Lise: **İĞDIR M.E.V. ANADOLU LİSESİ**

Lisans: **PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

Yüksek Lisans: **KAFKAS ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİDROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI.**