

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANTİMİKROBİYAL KİMYASAL MADDELERİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDAKİ (*Oncorhynchus mykiss*) AKUT TOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bal. Tek. Müh. Sait ABDULĞANİOĞLU

MAYIS 2014

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANTİMİKROBİYAL KİMYASAL MADDELERİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDAKİ (*Oncorhynchus mykiss*) AKUT TOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Bal. Tek. Müh. Sait ABDULĞANİOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :14/04/2014
Tezin Savunma Tarihi :06/05/2014**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Erol Çapkın

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında
Sait ABDULĞANIÖĞLU tarafından hazırlanan

ANTİMİKROBİYAL KİMYASAL MADDELERİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDAKİ (*Oncorhynchus mykiss*) AKUT TOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 15/04/2014 gün ve 1549 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Üye : Doç. Dr. Erol ÇAPKIN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda yürütülmüştür. “Antimikrobiyal Kimyasal Maddelerin Gökkuşığı Alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) Akut Toksisitelerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde hızla gelişen sanayi, artan nüfus ve kentleşme oranı birçok problemi beraberinde getirmiştir. Bu problemlerden biri de özellikle nüfusun yoğun olduğu bölgelerdeki çevresel kirleticilerdir. Bu kirleticilerin başında fabrika ve sanayi atıkları, ilaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, evsel atıklar, pestisitler vb. kimyasallar gelmektedir. Bu kirleticilerin çevresel risk oluşturmalarının asıl sebebi doğaya kurallarına uygun bir şekilde bırakılmamalarından kaynaklanmaktadır. Sucul ortama salınan kimyasal maddelerin sucul canlılar üzerindeki etkilerinin tespit edilebilmesi için LC₅₀ değerlerinin saptanması gerekir. Bu araştırmada temizlik ürünlerinde ve evsel ürünlerde antimikrobiyal olarak kullanılan triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraksın gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavruları üzerindeki akut toksik etkileri araştırılmıştır.

Tez danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Erol ÇAPKIN'a teşekkürlerimi borç bilirim. Tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. İlhan ALTINOK'a, Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN'a, Arş. Gör. Recep PARLAK'a, Arş. Gör. Rafet Çağrı ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Gökhan Kalaycı'ya ve Balıkçılık Teknolojisi Mühendisi arkadaşlarım Meryem Cansu Fidan ve Saliha Özdemir'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Bütün yaşamım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Sait ABDULĞANIÖĞLU

Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antimikrobiyal Kimyasal Maddelerin Gökkuşaağı Alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) Akut Toksisitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar Doç. Dr. Erol ÇAPKIN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, verileri kendim topladığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak belirttiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 06.05.2014.

Sait ABDULĖANİOĐLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Dezenfektanların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları	3
1.2.1. Hücre Zarına Etkili Dezenfektanlar	3
1.2.1.1. Yüzey Aktif Dezenfektanlar.....	3
1.2.1.2. Fenol ve Fenol Bileşikleri	3
1.2.1.3. Organik Çözücüler	3
1.2.3. Hücre Proteinlerini Denatüre Ederek Etki Gösterenler.....	4
1.2.4. Mikroorganizma Enzimlerinin İşlevlerini Bozarak Etki Gösteren Dezenfektanlar	4
1.2.4.1. Ağır Metal Tuzları.....	4
1.2.4.2. Okside Edici Maddeler.....	4
1.2.4.3. Alkilleyici Maddeler.....	5
1.2.4.4. Nükleik Asit Üzerine Etkili Dezenfektanlar	5
1.3. Toksik Denemelerde Kullanılan Kimyasallar	5
1.3.1. Triclosan.....	5
1.3.1.1. Triclosan'ın Kullanım Alanları	6
1.3.1.2. Triclosan'ın Etki Mekanizması	7
1.3.2. Chloroxilenol.....	7
1.3.2.1. Chloroxilenol' un Kullanım Alanları	8
1.3.2.2. Chloroxilenol' un Etki Mekanizması	8
1.3.3. Methyloisothiazolinone	9

1.3.3.1. Methyloisothiazolinone'un Kullanım Alanları	9
1.3.3.2. Methyloisothiazolinone'un Etki Mekanizması	10
1.3.4. Boraks.....	10
1.3.4.1. Boraks'ın Kullanım Alanları	10
1.3.4.2. Boraks'ın Etki Mekanizması	11
1.4. Toksikolojik Testler	11
1.4.1. Toksik Deneylerde Kullanılacak Deney Organizmalarının Seçimi	13
1.4.2. Toksikolojik Testlerde Su Kalitesi	14
1.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	14
1.5.1. Difüzyon Testleri.....	15
1.5.1.1. Disk Difüzyon Testi	15
1.5.1.2. E – Test.....	15
1.5.1.3. Dilüsyon Testleri	16
1.5.3.1. Tüp Dilüsyon.....	16
1.5.3.2. Agar Dilüsyon	16
1.6. Önceki Yapılan Çalışmalar	17
1.7. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Gökkuşığı Alabalığı, Bakteriler.....	20
2.2. Metot	20
2.2.1. Gökkuşığı Alabalıklarının Teste Hazırlanması	20
2.2.1.2. Su Kalite Parametreleri	21
2.2.1.3. Akut Toksik Testler.....	21
2.2.2. Kullanılan Kimyasalların Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	22
2.2.2.1. Triclosan'ın Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	22
2.2.2.2. Chloroxyleneol' un Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	23
2.2.2.3. Methyloisothiazolinone'un Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	23
2.2.2.4. Boraks'ın Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	24
2.2.2.5. İstatiksel Analizler.....	24
3. BULGULAR	25

3.1.	Triclosan'ın Toksikolojik Etkileri	25
3.2.	Chloroxylenol'un Toksikolojik Etkileri	25
3.3.	Methyloisothiazolinone'un Toksikolojik Etkileri	26
3.4.	Boraks'ın Toksikolojik Etkileri.....	26
3.5.	Triclosan'ın Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC).....	27
3.6.	Chloroxylenol'un Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC)	28
3.7.	Methyloisothiazolinone'un Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC).....	29
3.8.	Boraks'ın Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC).....	30
4.	TARTIŞMA.....	32
5.	SONUÇLAR	38
6.	ÖNERİLER	41
7.	KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

ANTİMİKROBİYAL KİMYASAL MADDELERİN GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDAKİ (*Oncorhynchus mykiss*) AKUT TOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Sait ABDULĞANİOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Erol ÇAPKIN
2014, 47 Sayfa

Araştırmada, temizlikte antimikrobiyal olarak kullanılan triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraksın gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*; $9,08 \pm 0,72$ g) yavruları üzerine olan akut toksik etkileri belirlenmiştir. Triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraksın gökkuşağı alabalıklarını 96 saat sonunda % 50'sini öldürdüğü konsantrasyonları sırasıyla; 0,063 mg/L, 0,053 mg/L, 0,823 mg/L ve >7 g/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu kimyasalların *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri üzerindeki minimum etki konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Antimikrobiyal kimyasalların bakterilerdeki MIC değerlerinin triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraks için sırasıyla; 0.0153 – 1000, 3.906 – 62.5, 0.0097 – 0.312, 0.46 – 15 µg/µl konsantrasyon aralıklarında olduğu belirlenmiştir. Triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone maddeleri sucul hayat için önemli problem oluşturabileceğinden, bu maddelerin karıştığı su ortamındaki konsantrasyonların toksik sınırları aşip aşmadığı düzenli olarak takip edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Triclosan, Chloroxylenol, Methyloisothiazolinone, Boraks, MIC

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF ACUTE TOXICITY OF ANTIMICROBIAL CHEMICALS ON
RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Sait ABDULĖANIÖĖLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries Technology Engineering Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. Erol ÇAPKIN
2014, 47 Pages

In this study, acute toxic effects of triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone and boraks, used as antimicrobial chemicals, were determined on Rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*; $9,08 \pm 0,72$ g). The concentrations of triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone and boraks which killed %50 of the rainbow trout in 96 hours were found as 0,063 mg/L, 0,053 mg/L, 0,823 mg/L and >7 g/L, respectively. Furthermore minimum inhibitory concentrations (MIC) of these chemicals were determined on *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Yersinia ruckeri*. MIC values of triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone and boraks were found between 0.0153 – 1000, 3.906 – 62.5, 0.0097 – 0.312, 0.46 – 15 µg/µl concentration ranges, respectively. Triclosan, chloroxylenol and methyloisothiazolinone might cause serious problems on aquatic organisms. Thus, the concentrations of these chemicals should be followed regularly if they have exceeded toxic limits or not.

Key Words: Triclosan, Chloroxylenol, Methyloisothiazolinone, Boraks, MIC

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Triclosan'ın Moleküler Yapısı	5
Şekil 2. Chloroxlylenol 'un Moleküler Yapısı	8
Şekil 3. Methyloisothiazolinone'un Moleküler Yapısı	9
Şekil 4. Boraks'ın Moleküler Yapısı.....	10
Şekil 5. Gökkuşığı Alabaklıklarının Deney Ortamına Alıştırılmaları	22
Şekil 6. a) Triclosan uygulanan <i>Aeromonas hydrophila</i> bakterisi b) Chloroxlylenol uygulanan <i>Yersina ruckeri</i> bakterisi	31
Şekil 7. Boraks uygulanan <i>Yersinia ruckeri</i> bakterisi	31

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Triclosan'ın Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri	27
Tablo 2. Chloroxülenol'un Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri	28
Tablo 3. Methyloisothiazolinone'un Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri.....	29
Tablo 4. Boraks'ın Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri	30

SEMBOLLER DİZİNİ

BHI	: Brain Heart Infusion
CFU	: Koloni Oluşturan Birimler
g:	: Gram
L	: Litre
LC ₅₀	: Canlıların Yüzde Ellisini Öldüren Konsantrasyon
ml	: Mililitre
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Buyyon
µg	: Microgram
µl	: Microlitre
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Trypticase Soy Buyyon

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Antimikrobiyal pestisitler olarak adlandırılan dezenfekte edici ajanlar bakteri, virüs ve mantar gibi zararlı mikroorganizmaların kontrol altına alınmasında veya ortamdan tamamen elimine edilmesinde kullanılmaktadır. Dezenfektanlar, hücre içinde değişik etki mekanizmalarıyla mikroorganizmaları öldürerek veya üremelerini durdurarak faaliyet gösterirler (Gruendemann ve Mongum, 2001). Dezenfektan maddelerin konsantrasyonu, uygulanma süresi, ortamın ısısı, pH'ı, ortamda bulunan mikroorganizmaların sayıları, türleri ve ortamda bulunan diğer organik maddelerin varlığı gibi fiziksel ve kimyasal faktörler dezenfektanların mikroorganizmalar üzerindeki aktivitelerini etkilerler (Çetin, 1982).

Dezenfektanlar genellikle ortamdaki potansiyel tehlikeye sahip mikroorganizmaların sayısını ve türünü mümkün olduğu kadar azaltmak veya yok etmek amacıyla kullanılmaktadır. Dezenfeksiyon işleminde etkinlik yeterli konsantrasyon ve süre ile, sporların da yok edilebileceği sterilizasyon derecesine yakınlıkta olabildiği gibi, mikroorganizmaların vejetatif şekillerinin öldürüldüğü şekilde de olabilir. Bunlardan ilkinde yüksek düzeyde dezenfeksiyon, ikincisine ise düşük düzeyde dezenfeksiyon işlemi denir. Bunların arasında kalacak etkinlikte yapılan işlem ise orta düzeyde dezenfeksiyondur. Deri gibi canlı dokular üzerine uygulanan dezenfeksiyon işlemine ise antisepsi denilmektedir (Bilgehan, 1989).

Dezenfeksiyon tarihi çok eskilere dayanmaktadır. MÖ.800 yıllarında yazılan bir eserde, kükürdün dezenfektan amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. 1830 yılında Fremy tarafından deterjanın keşfedilmesi dezenfeksiyon için önemli bir basamak olmuştur. 19. yüzyılda klorlu ve iyotlu çözeltiler ile fenol, yara tedavisinde kullanılmıştır. Lister pansumanlar, aletlerin dezenfeksiyonu ve operasyonlardan önce ameliyathane havasına püskürtmek için fenol kullanılmıştır. Yine 19. yüzyılda Florence Nightingale antisepsi ve dezenfeksiyon uygulamalarını geliştirmek için çaba sarf etmiştir. Gerçek anlamda dezenfeksiyon ilk defa 1904 yılında bir tifo salgınının, sodyum hipoklorit ile klorlama yapılarak önlenmesiyle başlamış ve dezenfeksiyon uygulamaları hızla yaygınlaşmıştır (Murray vd., 1990). Günümüze kadar ilk bulunan dezenfektanların daha etkin ve daha az

yan etkilere sahip olanlarını geliştirmek için yoğun çabalar sarf edilmiş ve birçok dezenfektan madde kullanıma sunulmuştur. Ayrıca dezenfeksiyon amaçlı birçok aletlerin yapılması ve uygulamaları ile ilgili teknolojik gelişmeler kaydedilmiştir.

Hijyen kurallarına uyulması ortak kullanılan yaşam alanlarında insan sağlığı için adeta bir zorunluluktur. Hijyenle, mikroorganizmaların çoğalmaları ve kontaminasyonları önlenmeye çalışılır. Ortam hijyeninin sağlanması ve hastalık etkenlerinin uzaklaştırılmasında antimikrobiyal kimyasallardan yararlanılır. Antimikrobiyal kimyasallar, sağlık alanında dezenfektan ve antiseptik olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Ayrıca kozmetik ürünlerinde, evsel ürünlerde, tekstil ürünlerinin ve yapı malzemelerinin korunmasında, gıda üretim ve işleme tesislerinde, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi pek çok alanda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Hugo ve Russell,1987).

Çoğu ilaç ve temizlik maddelerinin, kanalizasyon yolu ile şehir atık sularına ve akıntılara karıştığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Ancak bu kimyasal maddelerin alıcı ortamlara salınımlarının, sucul ekosistemde nasıl sonuçlar meydana getirdiği konusundaki çalışmalar oldukça azdır. İlaç ve dezenfektanlar su sistemlerine karıştığında sudaki canlılara zarar vermekte ve son yıllarda yapılan çalışmalar da bu kimyasalların, balıkların üremelerini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir (URL-1).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda; triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraks gibi dezenfektan aktif maddelerinin gökkuşağı alabalıklarına olan etkilerinin incelendiği kapsamlı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bakımdan, bu çalışmada triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraks gibi temizlik ürünlerinde ve kozmetikte kullanılan dezenfektan aktif maddelerinin, alıcı su ortamlarına karıştıklarında gökkuşağı alabalıklarında nasıl bir etki oluşturabileceklerini tahmin edebilmek için LC₅₀ değerleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca ülkemizdeki özellikle Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilmiş olan başlıca balık patojenlerine karşı minimum etki konsantrasyonları (MIC) da belirlenmiştir.

1.2. Dezenfektanların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

1.2.1. Hücre Zarına Etkili Dezenfektanlar

Hücre zarı üzerine etkili olan dezenfektanlar, bu aktivitelerini hücre sitoplazma zarının yapısını değiştirerek, hücrenin aktif transportunu ve enerji metabolizmasını bozarak gerçekleştirirler. Bu kategoride yüzey aktif maddeler, fenoller ve organik çözücüler yer almaktadır (Kanra ve Ceyhun, 1985).

1.2.1.1. Yüzey Aktif Dezenfektanlar

Yüzey aktif dezenfektanlar iyonlaşma özelliklerine göre katyonik, anyonik ve noniyonik olmak üzere 3'e ayrılırlar. Katyonik gruba benzalkonium klorür, anyonik gruba ise sabunlar ve yağ asitleri örnek olarak verilebilir. Noniyonik grupta bulunan aktif maddeler ise dezenfektan değil mekanik temizleyicilerdir. Bunlar kirlerin birleşmesini engelleyecek aktivite gösterirler (Kanra ve Ceyhun, 1985).

1.2.1.2. Fenol ve Fenol Bileşikleri

Fenol ve bileşikleri hücre zarını parçalayarak hücre yapısının dışarı çıkmasına neden olurlar. Fenollerin bir diğer etkisi de hücre proteinlerini denatüre etmektir. Günümüzde fenolün yerini daha az toksik olan alkil ve klor türevleri almıştır. Bu maddeler insanlar için daha az toksik ve dezenfektan etkileri de daha fazladır. Fenolün alkil türevine örnek olarak krezol verilebilir. Fenolün klorlü türevi ise heksaklorofen olup, özellikle gram pozitif bakteriler üzerine etkilidir (Kanra ve Ceyhun, 1985).

1.2.1.3. Organik Çözücüler

Alkol, eter, kloroform bu gruba örnektir. Bu maddelerin içerisinde ise en çok kullanılan alkoldür. Alkolün en etkili konsantrasyonu %70 dir. Alkol, aynı zamanda proteinleri de denatüre eder. Ancak sporlu bakterilere karşı etkisi yoktur. Dezenfeksiyon amacıyla en çok kullanılan dezenfektanlardan biridir (Töreci, 1990).

1.2.3. Hücre Proteinlerini Denatüre Ederek Etki Gösterenler

Proteinler, mikroorganizmaların işlevleri için gerekli organik moleküllerdir. Protein moleküllerinin normal işlevlerini görebilmeleri için yapısal olarak uygun bir konumda bulunmaları gerekir. Proteinleri denatüre eden dezenfektanlar, proteinlerin yapısal konumunu değiştirerek rastgele şekil almalarına neden olurlar. Böylece bakterisid etki gösterirler. Asitler, alkaliler, alkoller, aseton ve diğer organik çözücü maddeler bu grupta yer alan dezenfektanlardır. Asitler değişik amaçlarla sulandırılarak kullanılırlar. Bu gruptaki asitlere; asetik asit, sülfürik asit, klorhidrik asit, borik asit ve propiyonik asit örnek olarak verilebilir (Töreci, 1990).

1.2.4. Mikroorganizma Enzimlerinin İşlevlerini Bozarak Etki Gösteren Dezenfektanlar

1.2.4.1. Ağır Metal Tuzları

Civa, gümüş ve bakır tuzları başlıcalarıdır. Ağır metal tuzlarının etkileri enzimlerin sülfidril grupları ile birleşmelerinden ortaya çıkar. Civa bileşikleri, bugün önemli yan etkileri ve antiseptik olarak etkisinin azlığı nedeniyle pek kullanılmaz. Merthiolate ve mercurochrome deri dezenfektanı olarak kullanılır. Gümüş nitratın %1 lik çözeltisi ise çeşitli amaçlarla özellikle yeni doğan bebeklerde göz antiseptiği olarak kullanılmaktadır (Bilgehan, 1989).

1.2.4.2. Okside Edici Maddeler

Hidrojen peroksit, potasyum permanganat, ozon, oksitleyici etkileriyle enzim aktivitesini bozarlar. Halojenlerden klor ve klor vericiler (sodyum hipoklorit, kloraminler), brom ve iyot bileşikleri kuvvetli oksitleyici etkileri olan dezenfektanlardır. Klor ve ozon, suların dezenfeksiyonunda kullanılırlar (Bilgehan, 1989).

1.2.4.3. Alkilleyici Maddeler

Bu grupta formalin, etilen oksit ve betapropiolakton yer alır. Formalin yüksek konsantrasyonda bütün mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Kadavra ve dokuların saklanması için kullanılır. Etilen oksit ve polietilen ise araçların sterilizasyonunda kullanılırlar.

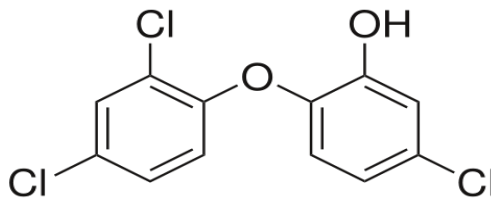
1.2.4.4. Nükleik Asit Üzerine Etkili Dezenfektanlar

Bu grupta da çoğu mikrobiyolojide kullanılan boyalar yer alır. Bu boyaların başlıcaları kristal viyole, malahit yeşili, brillant yeşili, fuksin, metilen mavisi ve akridindir. Bu boyalar nükleik asitlerle bileşikler oluşturarak, onların aktivitelerini bozmak suretiyle dezenfektan etkisi gösterirler. Metilen mavisi ve akridin boyaları, mukozalar üzerinde dezenfektan olarak kullanılırlar (Bilgehan, 1989).

1.3. Toksik Denemelerde Kullanılan Kimyasallar

1.3.1. Triclosan

Triclosan (2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxy-diphenyl ether; $C_{12}H_7Cl_3O_2$) noniyonik, renksiz bir maddedir. Uzun yıllardan beri birçok ticari üründe antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Bu ticari ürünler sabunlar, deodorantlar, losyonlar, plastikler, tekstil ürünleri vs. olarak sıralanabilir. 2006 yılı Avrupa Birliği'ne ait verilerde triclosanın % 85'inin kişisel bakım ürünlerinde, % 5'inin tekstil ürünlerinde, % 10'unun da plastiklerde ve gıdalarla temas eden ürünlerde kullanıldığı ve tüketim miktarının yaklaşık 450 ton olduğu bildirilmektedir (E. C, 2009).



Şekil 1. Triclosan'ın Moleküler Yapısı

Son yıllarda özellikle Amerika ve Avrupa Birliği'ne üye ülkeler giderek artan triclosan kullanımı ve ileride yaşanabilecek olası toplum sağlığı sorunları konusunda farkındalık oluşturmak amacıyla kapsamlı araştırmalar yaparak sonuçlarını raporlar halinde yayınlamaktadırlar. 1999 - 2000 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilen bir çalışmada farklı su kaynaklarından alınan numuneler 95 farklı kimyasal açıdan incelenmiş ve sonuçta en yüksek konsantrasyona sahip kimyasallardan birisinin de triclosan olduğu görülmüştür. Yine araştırmacılar özellikle deniz canlılarının vücutlarında çok yüksek miktarda triclosan tespit etmişlerdir. Çevre Koruma Ajansı triclosanın bir kısmının ultraviyole ışınların etkisi ile bozularak toksik dioksin'e dönüştüğünü rapor etmiştir. Triclosan tatlı suda 8 günde deniz suyunda ise dört günde bozularak (2,8-dichlorodibenzo-p-dioksin)'e dönüşmektedir. Dioksinlerin besin zincirine ulaşmasının ise kötü sonuçlar doğuracağı ifade edilmektedir (McGinnis, 2008).

Triclosan içeren ürünler ile temas sırasında triclosan, cilt, burun ve ağızdan vücuda alınmaktadır. Ayrıca triclosanın deniz, göl ve yer altı sularına karışması ile besin zincirine ulaşması sonucu özellikle deniz ürünleri gibi yiyeceklerden de triclosan insan vücuduna alınmaktadır. Amerika'da yapılan bir dizi çalışma sonucu, triclosan içeren kişisel bakım ürünlerini fazlaca kullandığını ifade eden 36 emziren anne üzerinde yapılan bir çalışmada, annelerin sütlerinde önemli miktarlarda triclosan saptanmıştır. Çalışmalar triclosanın erkek vücudunda androjenleri, dişi vücudunda östrojeni etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Triclosan'ın özellikle dişilerde meme kanserini tetikleyebileceği rapor edilmiştir (McGinnis, 2008).

1.3.1.1. Triclosan'ın Kullanım Alanları

Triclosan antibakteriyel madde olarak ticari ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sabunlar, deodorantlar, kozmetik ürünleri, temizleme losyonları, plastikler, diş macunları ve antibakteriyel tekstil ürünleri bu ticari ürünlerin başlıcalarını oluşturmaktadırlar (Minnesota Sağlık Bölümü, 2010). Triclosan cilt veya yüzey üzerinde temizleme işleminden sonra kalmaya devam eder ve mikroplara karşı uzun dayanımlı etki sağlar. Normal sabunla el yıkama ile ciltte bulunan mikroplarda kısa süreliğine bir azalma görülür fakat elleme ve yüzeylerin teması mikropları tekrar cilde taşır. Triclosan yıkama sonrası ciltte birkaç saat için sürekli çalışır ve gizli bir koruma sağlar. Cilt ve oral bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılır. Cilt kokusunu azaltır ve dışsal hastalıkları engeller.

Hastanelerde hastaların ve cerrahların cilt temizliği ve dezenfeksiyonu için de kullanılır. Yapılan bazı çalışmalarda hastanelerde triclosan içeren el antiseptiklerinin kullanılmasının metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarını azalttığına dair veriler elde edilmiştir (Brady vd., 1990).

1.3.1.2. Triclosan'ın Etki Mekanizması

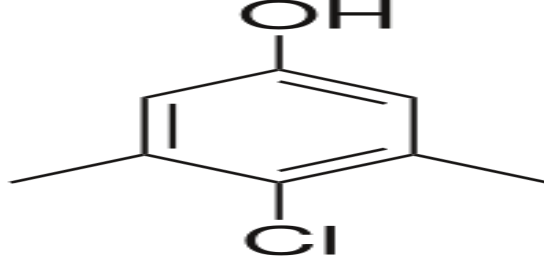
Triclosan, chlorhexidine gibi persistan aktiviteye sahiptir. Triclosan'ın aktivitesi ortamdaki organik maddelerin varlığından etkilenmemesine rağmen ortamda sürfaktanların varlığından etkilenmektedir. Triclosan'ın aktivitesi ortamın pH'ına, sürfaktan varlığına, yağlandırıcı ve nemlendiricilerin ortamda bulunup bulunmamasına göre değişir. Triclosan gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etkiye sahiptir. Gram pozitif bakterilere karşı etkisi gram negatiflere göre daha fazladır. Triclosan aynı zamanda antifungal ve antiviral özelliklere de sahiptir (Webster vd., 1994). Mikobakteriler ve kandida türlerine karşı yeterli etkinliği olmasına rağmen diğer mantarlara karşı etkinliği zayıftır.

Antimikrobiyal etkisini bakteri içine girerek sitoplazmik zarları, bakteri RNA'sını, yağ asidi ve protein sentezini etkileyerek gösterir. Triclosan, mikroorganizmaya ait ENR (Enoyl-Acyl Redüktaz) enzimini bloke ederek lipid sentezini inhibe eder. Böylece mikroorganizmanın gelişmesini ve bölünerek çoğalmasını engeller (Fan vd., 2002).

1.3.2. Chloroxilenol

Chloroxilenol (4-chloro-3,5-dimethylphenol; C_8H_9ClO), parachlorometaxilenol (PCMX) olarak da adlandırılan fenol içeren bir maddedir. Kozmetik sanayinde ve antimikrobiyal sabunların aktif maddesi olarak kullanılır. Chloroxilenol deriden emilir ve nadir olarak alerjik reaksiyonlara neden olur (URL-2).

Chloroxilenol suda diğer fenol türevlerine göre daha yavaş hidrolize olur. Kanalizasyon suyunda yapılan bir çalışmada orijinal bileşiğin 2 gün sonra % 80-95'inin, 7 gün sonra ise % 60-70'inin halen mevcut olduğu görülmüştür. Henry Kanunu sabitine göre de, chloroxilenolun su yüzeylerinden, nehirlerde 10 saatte, göllerde ise 9 günde buharlaştığı tahmin edilmektedir (Pauli, 1983).



Şekil 2. Chloroxylenol 'un Moleküler Yapısı

1.3.2.1. Chloroxylenol' un Kullanım Alanları

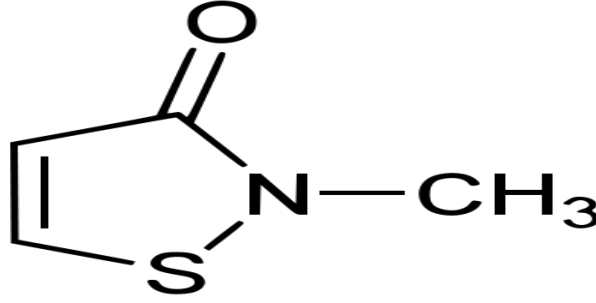
Chloroxylenol, 1920'lerin sonlarında Avrupa'da geliştirilmiş olup 1950'lerden beri de ABD'de kullanılmaktadır (Larson, 1986). Chloroxylenol, bakteri, alg ve mantarları kontrol etmek için antimikrobiyal kimyasal bileşen olarak yapıştırıcılarda, emülsiyonlarda, boyalarda ve yıkama tanklarında kullanılır. Daha yaygın kullanımı ise antibakteriyel sabunlar, evsel antiseptikler, merhemler, kremler ve ilaçlı vazelinlerdir (Aly ve Malbach, 1988).

1.3.2.2. Chloroxylenol' un Etki Mekanizması

Chloroxylenol'un antimikrobiyal etkisi bakteri enzimlerini inaktive etmesi ve bakteri duvarının yapısını değiştirmesi sayesinde olmaktadır. Gram-pozitif bakterilere karşı etkisi çok iyi olmasına rağmen gram-negatif bakteriler, mantarlar ve bazı virüslere karşı etkisi daha azdır. Chloroxylenol, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı daha az etkilidir ancak Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) eklenmesi *Pseudomonas spp.* ve diğer patojenlere karşı etkisini arttırmaktadır. Chloroxylenol'un antimikrobiyal etkisi organik maddelerin mevcudiyetinden minimal düzeyde etkilenmektedir. Ancak iyonik olmayan sürfaktanlar bu etkiyi nötralize eder (Larson, 1988).

1.3.3. Methyloisothiazolinone

Methyloisothiazolinone (2-methyl-4-isothiazolinone-3-one; C_4H_5NOS), deterjanlarda, sulu çözeltilerde, boyalarda, kişisel bakım ürünlerinde, dolgu macunlarında ve kağıt kaplamalarda mikrobiyal gelişimi kontrol etmek için kullanılan biosittir (Collier vd., 1990). Formülasyonu konsantre edilmiş sıvı ve katı maddelerden oluşur. Sucul ortamda alkalın pH'ta hızlı, asidik ve nötral pH'ta ise yavaş hidrolize olur (Doshi, 1994). Deriye teması allerjenik reaksiyonlara, göz teması ise ciddi tahrişlere ya da kimyasal yanıklara sebep olabilir. Bu tür maruziyetler ise genellikle stok çözeltilerinin seyreltilmesi sırasında açığa çıkmaktadır (Castanedo ve Tardana, 2013).



Şekil 3. Methyloisothiazolinone'un Moleküler Yapısı

1.3.3.1. Methyloisothiazolinone'un Kullanım Alanları

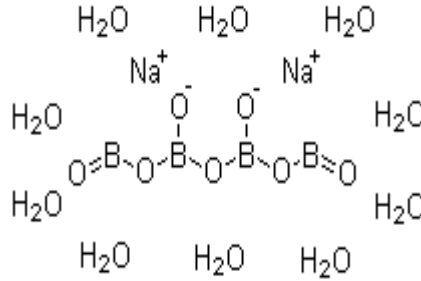
Methyloisothiazolinone ilk olarak Amerika'da 1977 yılında kullanılmaya başlanmıştır. 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolinone-3-one (chloromethylisothiazolinone) ve 2-methyl-4-isothiazolinone-3-one (methylisothiazolinone), en çok kullanılan biositlerdir. İkisinin karışımından Kathon CG olarak isimlendirilen ticari bir ürün elde edilmektedir. Bu ürün endüstriyel su depolarında, soğutma ünitelerinde, madencilikte, kâğıt üretiminde, metal işlemede ve enerji üretim alanında kullanılmaktadır. Sea-Nine 211 (4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolino-3-one, DCOI) isimli ürün ise gemi tabanlarında antifouling boya olarak kullanılmaktadır (Rohm ve Haas, 1984).

1.3.3.2. Methyloisothiazolinone'un Etki Mekanizması

Methyloisothiazolinone'un etki mekanizması bakteri, virüs ve protozoanların büyümelerini yavaşlatması sayesinde olmaktadır. Antifungal etkisi ise mantarların büyüme ve üreme kabiliyetlerini kısıtlaması şeklinde gerçekleşmektedir (URL-3).

1.3.4. Boraks

Sodyum borat olarak da bilinen boraks, borun oksijen asidinin tuzudur. Su, oksijen, sodyum ve bordan meydana gelir. Boraks, sulara borik asit (H_3BO_3) veya sodyum borat olarak bulunmaktadır. Genellikle, kimyasal formülü $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ olarak yazılsa da, $Na_2(OH)_2 \cdot 8H_2O$ formülü tuzun yapısını daha iyi izah etmektedir. Boraks'ın doğadaki biyotransformasyonu hakkında herhangi kayıtlı bir bilgi bulunmamaktadır. Boraks, tuzlu göl sularının buharlaştırılıp kristallendirilmesinden elde edilir. Laboratuvarında ise borik asit ile susuz sodyum karbonatın reaksiyona sokulmasıyla elde edilir (Staff, 2008).



Şekil 4. Boraks'ın Moleküler Yapısı

1.3.4.1. Boraks'ın Kullanım Alanları

1950 yılından sonra gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaya başlanan boraks antiseptik ve antifungal özellikleriyle güçlü bir doğal dezenfektandır. Mantar oluşumunu önlediğinden koku giderici olarak kullanılır, yine bu özelliğiyle küflenmeyi de önler. Boraks suyun sertliğini gidermek için çamaşır ağartmasında, kaynakta (eritici ve pas önleyici olarak), nükleer alanda, savunma sanayisinde, jet ve roket yakıtlarında, sabunlarda, deterjanlarda, lehimde, fotoğrafçılıkta, matbaacılıkta, porselen minelemede,

dayanıklı ve kırılmaz borsilikat camının imalatında, tekstil boyalarında, cam elyaflarında ve genellikle kâğıt sanayinde kullanılır. Aynı zamanda donmayı geciktirmek için antifiriz olarak ve bitki öldürme ilacı (herbisit) olarak da kullanılmaktadır (Hildebrand, 1982).

1.3.4.2. Boraks'ın Etki Mekanizması

Boraks'ın antibakteriyel ve antifungal etkilerinin mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Ancak boraksın mikroorganizmalar üzerine etkisinin, onların fosfat metabolizmalarında rol alan enzimleri engellemesi sayesinde olduğu bilinmektedir. Boraks, stafilokok ve streptokoklara karşı düşük bakteriyostatik etki göstermektedir. Boraks vücutta kısa sürede ve hızla resorbe edilir, ancak uzun sürede dışarı atılır. Boraks'ın toksikolojik özellikleri konusunda yeterli araştırmalar yapılmadığı halde, düşük dozlarda bile köpeklerde zehir etkisi yaptığı bildirilmektedir. Bu nedenle de koruyucu madde olarak gıdalara ilave edilmemektedir. Ancak bazı ülkelerde havyarda 4g/kg düzeyinde kullanılmasına izin verilmektedir (URL-4).

1.4. Toksikolojik Testler

Toksikoloji diğer adıyla zehir bilimi, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkileşimleri zararlı sonuçları yönünden inceleyen veya kimyasalların zararsızlık sınırlarını tespit eden bilim dalıdır. Uygun şekilde ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi oluşturabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde veya biyokimyasal lezyon şeklinde ortaya çıkabilir. Ortaya çıkan etki, geri dönüşümlü olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir (Vural, 1996). Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı olarak gerçekleşen önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin belirlenmesi ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978).

Toksisite testleri, kimyasal maddelerin sadece canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini belirlemek için yapılmaz. Kullanılan kimyasalların toksik etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılır. Eğer uzun süreli kimyasal maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı süre içerisinde aynı özellikteki maddelerin, su hacimlerinin ve test koşullarının uygulanması gerekir (Altınok vd., 2011). Beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu

bilinen kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı şekilde işlediğinin test edilmesi gerekir (Saygı vd., 1991; CPMP, 2000).

Toksikolojik testlerde kullanılan deney organizmaları farklı konsantrasyonlarda toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak bu maddelerin deney organizmaları üzerindeki etkileri araştırılır. Bu araştırmalarda; ölümler, üreme ve denge bozuklukları, gelişim durumları, yüzme kabiliyetleri, histolojik ve biyokimyasal değişiklikler ve organların aktiviteleri gibi faktörler incelenir. Testlerde kullanılan kimyasal, tek bir kirletici olabileceği gibi birden fazla madde içeren kompleks bir karışım da olabilir (APHA, 1992; Laufer ve Nation, 1999). Toksikolojik deneylerde aynı özelliklere sahip canlılar, farklı miktarlarda toksik maddeye maruz bırakılmaktadır. Toksik madde dışındaki faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması amacıyla testlerde ayrıca kontrol grubu oluşturulur. Toksik maddenin belirli miktarlarda çözeltileri kullanılacağı için bu maddenin bir çözücü yardımıyla çözülebilir olması gerekmektedir. Kullanılan bu çözücü maddelerin, toksik etkileri de dikkate alınmalıdır (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altınok, 2004).

Toksisite testleri; testin süresine, test ortamına, toksik madde ilavesine ve amaçlarına göre sınıflandırılmaktadır. Test sürelerine göre yapılan sınıflandırmada testler, akut ve kronik olmak üzere iki şekilde gruplandırılır. Akut toksikolojik testler, deney süresi 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimleri kullanılarak yapılmaktadır. Deney süresi, deneylerde kullanılacak canlı türlerine göre de değişiklik göstermektedir. Bu süre boyunca kullanılan organizmanın büyüme ve gelişimi de göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik testlerde deney süresi bir hafta ile bir ay arasında olabileceği gibi daha uzun süreler de uygulanabilir. Bu test türünde genellikle farklı toksik madde miktarlarının organizmaların üreme ve gelişmeleri üzerine olan etkileri incelenmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Toksikolojik testler, deney ortamına kirletici ilavesine göre statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olacak şekilde üç sınıfa ayrılmaktadır. Statik testlerde deneye tabi tutulacak organizmalar uygun bir düzenek içerisinde hazırlanmış deney ortamına bırakılır ve deney süresi boyunca herhangi bir değişiklik yapılmaz. Bu deneylerde metabolizma sonucu oluşan atıkların su kalite parametrelerinde meydana getireceği olumsuzlukları gidermek amacıyla genellikle 96 saatlik süre tercih edilmektedir. Yarı statik toksik testlerde, deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenmekte olup, bu zaman aralıkları toksik madde ve deneyde kullanılan organizma türüne göre değişmektedir. Bu test türünde genellikle farklı zaman dilimleri tercih edilmektedir. Bu sayede, statik testlerde metabolizma atıkları ve diğer nedenlerden kaynaklanan su kalitesindeki değişimlerin

olumsuz etkileri ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Sürekli akış sistemli testlerde ise, deney ortamı devamlı olarak yenilenir ve deney süresince su kalitesinde metabolizma atıkları nedeniyle herhangi bir değişiklik olmaz. Bu testler kısa süreli toksik deneyler için tercih edilmekle birlikte, doğal ortam şartlarını en iyi şekilde temsil eden test türüdür (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Toksisite deneyleri, toksik maddelerin zararlı etkilerini ve su kalitesini tespit etmek, atıkları ve bu atıkların boşaltıldığı alanları izlemek, gıda zincirinin üst seviyesindeki canlıları korumak, insanlar tarafından tüketilen su ürünlerinin sağlık açısından zararlı olup olmadıklarını belirlemek ve toksik maddelerin organizmalar üzerindeki uyarıcı etkilerini ve biyolojik birikimlerini gözlemlemek için kullanılmaktadır. Bu testler ayrıca, farklı toksik maddelerin canlı organizmalara olan etkilerini karşılaştırmak ve bu maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Braunbeck ve Appelbaum, 1999; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

1.4.1. Toksik Deneylerde Kullanılacak Deney Organizmalarının Seçimi

Toksikolojik testlerde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için test tipinin uygun olmasının yanında, kullanılacak olan test organizmasının da uygun olması gerekmektedir (Rand, 1995). Toksisite testlerinde seçilecek organizmalar mümkün olduğunca ekosistemi temsil eden yerli türler olmalıdır. Seçilecek tür ekolojik ve ekonomik öneme sahip olmalı, temini kolay ve sayı olarak da yeterli olmalıdır. Tür içi ve türler arasında mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığına sahip organizmalar seçilmelidir. Türlerin laboratuvar çalışmalarına adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek ve kültürlerinin yapılabilir olması gerekmektedir. Seçilecek türler en az bir ay süreyle laboratuvar şartlarında muhafaza edilebilmelidir. Türlerin biyolojilerinin, tuzluluk, pH ve sıcaklık isteklerinin önceden bilinmesi gerekir. Organizmanın gıda zincirindeki düzeyi, ekonomik önemi ve en hassas evresi bilinmelidir. Ayrıca, denemelerde kullanılacak olan organizmalar uygun boyda olmalıdır (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995; Atamanalp, 2004).

Akuatik toksikolojide kullanılacak olan canlı materyaller doğrudan doğal ortamdan temin edilebilecekleri gibi üreticilerden de satın alınabilir veya laboratuvar, kuluçkahane vb. suni koşullarda yetiştirme yollarıyla da elde edilebilirler (Atamanalp, 2004). Akuatik toksikolojide test türlerinin seçimi daha çok araştırmanın amacına bağlı olmakla birlikte, omurgalılar içerisinde balıklar temel grubu oluşturmaktadır. Toksikolojik testlerde yaygın

olarak kullanılan balık türleri; gökkuşuğu alabalığı, sazan balığı, japon balığı, güneş balığı, kanal yayın balığı, dikence balığı, zebra balığı ve lepistes balığıdır. Balıkların yanı sıra bakteriler, algler, yüksek yapılı bitkiler, protozoa, sölenetera, rotifer, krustasea, annelidler, su böcekleri ve yumuşakçalar da testlerde kullanılan diğer organizmalardır (Pascoe ve Edwards, 1989).

Bu çalışmada, gökkuşuğu alabalığı; çevre koşullarına çok iyi uyum göstermesi, aktif yem alması, yemlenmesinin kolay olması ve yem değerlendirmesinin iyi olmasından dolayı hızlı büyüme göstermesi, diğer alabalık türlerine göre daha kısa süreli kuluçka dönemine sahip olması gibi özellikleri nedeniyle tercih edilmiştir.

1.4.2. Toksikolojik Testlerde Su Kalitesi

Toksikolojik testlerde kullanılacak olan suların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin tespit edilmesi gerekir. Bu özellikler suyun sıcaklığı, çözünmüş oksijen miktarı, alkalinitesi, pH'ı ve sertliği gibi özelliklerdir ve bunların önceden bilinmesi gerekir. Testte kullanılacak suyun sıcaklık ve çözünmüş oksijen değerleri deneyde kullanılacak canlı türüne göre seçilmelidir. Deney süresince, test suyu sıcaklığında meydana gelen değişikliklerin $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmemesi ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunun da 4 mg/L'nin altına düşmemesi sağlanmalıdır. Ancak suyun havalandırılması bazı toksik maddelerin oksidasyonuna sebep olduğu için bu maddeler toksik etkinin azalmasına yol açabilir. Test suyunun pH ve alkalinitesinde, test sırasında meydana gelen değişiklikler, sonucun da farklı olmasına neden olabilir (FAO, 1987; APHA, 1992; EPA, 1993).

1.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere başlıca iki metod kullanılır.

1.5.1. Difüzyon Testleri

1.5.1.1. Disk Difüzyon Testi

Laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiş ve bu isimlerle de anılmaktadır. Bu test, kâğıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inokule edildiği besiyerine difüze olması esasına dayanır. Bu amaçla; belli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş kâğıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünür ve agara doğru difüze olur. Bu sırada ekimi yapılan mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör etkisi gösteren konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun o ölçüde geniş olduğu görülür. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık durumu tespit edilir.

1.5.1.2. E – Test

Günümüzde katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemler de mevcuttur. E-test bu esasa dayalı olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. MİK değeri bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde, test edilecek bakteri 0,5 McFarland yoğunluğa getirilip Mueller-Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Daha sonra agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat süreyle 35 °C'de inkübasyona tabi tutulur ve MİK değeri belirlenir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon zonunun şerit üzerindeki ölçükle kesiştiği noktadır (Kahlmeter vd., 2006).

1.5.1.3. Dilüsyon Testleri

Dilüsyon testleri, bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır. Dilüsyon testleri "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

1.5.3.1. Tüp Dilüsyon

Tüp dilüsyon "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Her iki yöntemin de prensibi aynı esasa dayanmaktadır. Makro dilüsyonda test tüpleri, "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler kullanılır. Tüp dilüsyon metodunda besiyeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton Buyyon (MHB) kullanılır. Test edilecek olan antibiyotikler önce özel çözücülerinde hazırlanır ve daha sonra sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırımı yapılır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu (1×10^6 CFU/ml) hazırlanıp, antimikrobiyal ajanın çeşitli dilüsyonlarını içeren her bir tüpe eşit miktarlarda eklenir. Antibiyotik içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol tüpüne de eklenir. Bakteri inoküle edilmemiş, sadece besiyeri konmuş bir tüp veya çukur da besiyeri kontrolü olarak hazırlanır. Besiyerleri 24 saatlik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Bakterinin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirilir.

1.5.3.2. Agar Dilüsyon

Agar dilüsyon yönteminin prensipleri tüp dilüsyon yöntemiyle aynıdır. Tek fark, agar dilüsyon yönteminde antibiyotik sulandırımının agar içine konması ve petri plaklarına dökülmesidir. Böylece antibiyotiğin her plakta farklı konsantrasyonları bulunur. Bu yöntem için de önerilen besiyeri Mueller-Hinton Agar'dır. Test edilecek bakterinin yoğunluğu 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanır, takiben 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 CFU/ml elde edilir. Bu bakteri süspansiyonundan manuel olarak 1-2 ml inoküle edilir. Böylelikle agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama 10^4 CFU/ml olur. İnoküle edilen

plaklar 18 - 24 saat süreyle inkübe edilir ve MİK değeri belirlenir. MİK değeri üremenin engellendiği en düşük antibiyotik konsantrasyonudur (CLSI, 2006).

1.6. Önceki Yapılan Çalışmalar

Organik kimya alanındaki çalışmalar günümüzde hız kazanmış ve insan sağlığını tehdit eden zararlı organizmaları etkisiz hale getirmek için yeni kimyasal maddeler üretilmeye başlanmıştır. Antimikrobiyal kimyasalların üretilmesiyle birlikte oluşturabilecekleri toksik etkiler gündeme gelmiş ve üretilen kimyasallara paralel olarak toksikolojik testlerin uygulamasında da günden güne artış olmuştur. İnsan sağlığını korumak için üretilmiş olan kimyasallar arasında dezenfektanlar önemli bir yer almaktadır. Dezenfektanlar, genel olarak hastalık yapıcı mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılmaları veya kontrol altında tutulmaları için kullanılırlar. Ancak yapılan bazı çalışmalarda dezenfektanların da diğer kimyasallarda olduğu gibi sucul ekosistemdeki canlıları olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

Günümüzde temizlik ürünlerinde ve kozmetikte yaygın olarak kullanılan triclosan, chloroxlyenol, methyloisothiazolinone ve boraks gibi dezenfektan aktif maddelerinin sucul canlılar üzerindeki akut toksisitesini ve balık patojenleri üzerindeki minimum etki konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla çok kapsamlı çalışmalar yapılmamış, yapılmış olan çalışmalar ise sınırlı sayıda kalmıştır.

Terrell (1988), triclosanın tatlı su balıklarındaki akut toksisitesini belirlemek için yapmış olduğu 96 saatlik bir denemede, gökkuşuğu alabalığı, ay balığı ve yassı kafalı golyan balığını kullanmıştır. Yapılan denemede bu balık türleri için LC₅₀ değerlerini 0,26 – 0,288 mg/L arasında bulmuş ve bu sonuçlara göre triclosanın tatlı su balıkları için oldukça toksik olduğunu saptamıştır. Başka bir araştırmada, 7 gün süreyle triclosan içeren suda bulundurulmuş balıkların yüzme aktivitelerinde hem normal yüzmede ve hem de yırtıcı bir hayvan tarafından tehdit edildikleri durumu taklit eden yüzme testinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma olduğu belirlenmiştir(URL-5).

Ricart vd. (2010), triclosanın akuatik bakteriler üzerinde toksik etki gösterdiğini, dünyadaki oksijenin büyük miktarını üretmekte olan diatom alglerin fotosentez yeteneklerini kısıtladığını ve bu canlıların triclosandan en çok etkilenen canlılardan biri olduğunu öne sürmüşlerdir. Triclosan'ın yağ asidi sentezi üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada, triclosanın FabI'nin kodladığı ENR enzimini bağladığı ve bağlamanın enzimin

NAD⁺ ya olan benzerliğini arttırdığı ve sonucunda üçlü kompleks olarak ENR-NAD⁺ triclosan oluştuğu ve bu kompleksin yağ asidi sentezine katılmadığı saptanmıştır. (Slater-Radosti vd., 2001).

McMurry vd. (1998) aşırı triclosan kullanımının uzun vadede bakterilerin bağışıklık sistemini güçlendirebildiğini öne sürmüşlerdir. Bu durumun dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve hiçbir bakterisinin etki etmemesine neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Bakteri hassasiyetini belirlemek için triclosan kullanılarak yapılan bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un MIC değeri 0,0625 - 8 mg/L olarak tespit edilmiştir (Kaabar, 2008).

Methyloisothiazolinone'un tatlı su balıklarındaki akut toksisitesini belirlemek amacıyla sıcak su balıklarından ay balığı ve tatlı su balıklarından gökkuşığı alabalığı kullanılarak yapılan toksik testlerde gökkuşığı alabalığı için LC₅₀ değerleri 0,19 ve 0,07 mg/L bulunurken ay balığı için ise 0,30 mg/L olarak bulunmuştur. Methyloisothiazolinone'un denemede kullanılan balık türleri üzerinde önemli derecede toksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Ward ve Boeri, 1990).

Methyloisothiazolinone'un tatlı su balıklarındaki kronik toksisitesini belirlemek amacıyla sazan balığı kullanılarak yapılan testte LC₅₀ değeri 0,035 mg/L olarak bulunmuştur (EPA, 2006). Methyloisothiazolinone'un nehir ağzı balıkları ve deniz balıklarındaki akut toksisitesini tespit etmek için golyan balıkları kullanılarak yapılan 96 saatlik bir testte LC₅₀ değeri 0,36 mg/L olarak bulunmuş ve methyloisothiazolinonun oldukça toksik olduğu bildirilmiştir (Heitmuller, 1980).

Methyloisothiazolinone uygulamasında sıcaklığın 35°C'den 25 ± 2°C'ye düşürülerek ve inkübasyon süresinin 48 ± 2 saat olarak belirlendiği duyarlılık testinde MIC değerleri *Pseudomonas aeruginosa* için 15 mg/L, *Staphylococcus aureus* için 45 mg/L olarak tespit edilmiştir (Steinberg, 2006).

Chloroxylenol'un gökkuşığı alabalıklarındaki akut toksisitesini belirlemek için yapılan bir testte LC₅₀ değerinin 0,76 mg/L den büyük olduğu ve balıklar için oldukça toksik olduğu belirlenmiştir (Leblanc, 1980). Chloroxylenol'un *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi üzerindeki minimum etki konsantrasyonunun incelendiği bir çalışmada ise MIC değeri 1000 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Lear vd., 2001).

Boraks'ın gökkuşığı alabalıklarındaki akut toksisitesini belirlemek için yapılan 24 saatlik bir denemede LC₅₀ değeri 65 - 88 mg/L olarak tespit edilmiştir (WHO, 1998). Diğer bir çalışmada ise 5000 mg/L boraksın alabalıkta sadece derinin koyulaşmasına neden

olduğu ve kk tatlı su balıklarında hiçbir etki yapmadığı belirlenmiştir (DSİ, 1983). Boraks'ın *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkisini belirlemek için yapılmış olan bir çalışmada MIC değerleri sırasıyla 47,60 mg/ml ve 23,80 mg/ml olarak bulunmuştur (Yılmaz, 2012).

1.7. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi

Günümüzde hızla gelişen sanayi, artan nüfus ve kentleşme oranı birçok problemi beraberinde getirmiştir. Bu problemlerden biri de özellikle nüfusun yoğun olduğu bölgelerdeki çevresel kirleticilerdir. Bu kirleticilerin başında fabrika ve sanayi atıkları, ilaçlar, temizlik ve kozmetik ürünleri, evsel atıklar, pestisitler vs. kimyasallar gelmektedir. Bu kirleticilerin çevresel risk oluşturmalarının asıl sebebi doğaya kurallarına uygun bir şekilde bırakılmamalarından kaynaklanmaktadır. Herhangi bir filtrasyon işlemine tabi tutulmadan veya yağmur sularıyla alıcı su ortamlarına karışan kimyasallar birçok sucul canlının hayatını olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle balıklar etkilenen canlıların başında gelmektedir. Sucul ortama salınan kimyasal maddelerin bu ortamda yaşayan canlılar üzerindeki akut ya da özellikle kronik etkilerinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekir.

Bu araştırmada dezenfektan aktif maddeleri olarak kullanılan triclosan, chloroxylenol methyloisothiazolinone ve boraksın, gkkuşadı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavruları üzerindeki akut toksik etkileri ve balık patojenleri üzerindeki minimum etki konsantrasyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Gökkuşığı Alabalığı, Bakteriler

Testlerde kullanılan gökkuşığı alabalığı yavruları (triclosan için; $9,15 \pm 1,79$ g; $9,53 \pm 0,62$ cm, chloroxylenol için; $9,19 \pm 0,59$ g; $7,38 \pm 1,16$ cm, methyloisothiazolinone için; $9,87 \pm 0,81$ g; $10,04 \pm 1,74$ cm ve boraks için; $8,12 \pm 0,92$ g; $9,17 \pm 0,35$ cm) KTÜ, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi'ne ait İbrahim OKUMUŞ Araştırma Uygulama Ünitesi'nden, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılan; *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri ise yine aynı fakülteye ait Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Gökkuşığı Alabalıklarının Teste Hazırlanması

Testlerde kullanılacak olan balıklar, testlere başlamadan önce laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları için $15 - 17$ °C de 14 gün boyunca biyolojik filtrasyon uygulanan 200 L hacimli büyük akvaryumun içerisinde tutulmuştur. Uyum süresince akvaryumun suyu her gün % 20 oranında değiştirilmiştir. Balıklar her gün vücut ağırlıklarının % 5 i oranında ticari alabalık yemi ile yemlenmiştir. Yemleme toksikolojik deneyler başlamadan 2 gün önce kesilmiş ve toksikolojik deneyler sırasında yemleme yapılmamıştır. Laboratuvar ortamına alıştırma ve deney süresince sıcaklık ve pH değerleri düzenli olarak ölçülmüştür.

2.2.1.2. Su Kalite Parametreleri

Deney akvaryumlardaki suların sıcaklığı, pH ve çözünmüş oksijen değerleri (Thermo Orion, Massachusetts, USA) model pH metre ile günlük olarak ölçülmüştür.

2.2.1.3. Akut Toksik Testler

Deneyde kullanılacak balıklar, toksik testlere başlamadan önce 40 L hacimli, statik su içeren cam akvaryumlara aktarılmıştır. Her bir konsantasyon için iki paralel kullanılmış ve her bir paralel için akvaryumlara ayrı ayrı 10 balık konulmuştur. Her bir konsantrasyon için toplamda 20 balık kullanılmıştır. Balıkların içerisinde tutuldukları suların kimyasal konsantrasyonları triclosan için; 0 (kontrol), 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.12, 0.15, 0.17, 0.19, 0.21, 0.23 mg/L, chloroxylenol için; 0 (kontrol), 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mg/L, methyloisothiazolinone için; 0 (kontrol) , 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1 mg/L, boraks için; 0 (kontrol), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 g/L olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca, ölen balıkların kullanılan kimyasallar dışında başka sebeplerden dolayı ölüp ölmediklerini anlayabilmek için kontrol grubu oluşturulmuştur. Deney süresince akvaryum sularının % 70' i kimyasal konsantrasyonu değişmeyecek şekilde günlük olarak yenilenmiştir. Triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraks kullanılarak yürütülen toksik testlerin yürütüldüğü akvaryumlarda deney süresince ölçülen sıcaklık ve pH ve çözünmüş oksijen değerleri sırasıyla; $17 \pm 0,5$ °C, pH $7,2 \pm 0,1$, Ç.O $8,2 \pm 0,1$; $17 \pm 0,4$ °C, pH $7,14 \pm 0,2$; $17 \pm 0,5$ °C, Ç.O $7,8 \pm 0,2$, pH $7,11 \pm 0,15$ ve $17 \pm 0,4$ °C, Ç.O $8,1 \pm 0,1$, pH $8,2 \pm 0,3$, Ç.O $8,3 \pm 0,15$ olarak tespit edilmiştir. Ölen balıkların tespiti amacıyla 0, 6, 8, 12, 24, 72, 96 saat dilimlerinde gözlemler yapılmıştır. Deney süresince ölü oldukları tespit edilen balıklar deney ortamından uzaklaştırılıp boy ve ağırlıkları ölçülmüştür.



Şekil 5. Gökkuşığı Alabaklıklarının Deney Ortamına Alıştırılmaları

2.2.2. Kullanılan Kimyasalların Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

2.2.2.1. Triclosan'ın Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Başlangıçta 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ triclosan ethanolde çözünerek stok çözeltisi hazırlandı. 17 adet mikrosantrifüj tüpüne 0,5 ml ethanol eklendikten sonra hazırlanan stok çözeltisinden 0,5 ml alınıp her bir tüpte (1/1) oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Toplamda 18 adet mikrosantrifüj tüpü kullanıldı. İlk tüpteki konsantrasyon 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (stok çözeltisi konsantrasyonu) son tüpteki konsantrasyon ise 0,000954 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. Daha sonra her bir tüpten 2 μl alınarak 5 mm çapındaki 0,2 mikronluk whatman filtre kâğıtlarına emdirildi. Böylelikle triclosan içeren diskler elde edildi. İlk diskteki kimyasal konsantrasyonu 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ son diskteki kimyasal konsantrasyonu ise 0,001907 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı. *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri triclosana daha karşı dirençli oldukları için en yüksek disk konsantrasyonu olarak 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ denendi. Kullanılacak olan bakterilerin her biri ayrı ayrı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde 1 ml serum fizyolojik su içerisinde süspanse edildi. İçerisinde bakteri olan serum fizyolojik sudan her bir plak için 200 μl alınıp Mueller Hinton Agar (MHA)' a ekim yapıldı ve triclosan emdirilmiş olan diskler agara yerleştirildi.

Hazırlanan plaklar 29 °C de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. 24 saat sonunda oluşan zonların çapları ölçülerek bakterilerin triclosana karşı duyarlılıkları belirlendi.

2.2.2.2. Chloroxylenol' un Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Chloroxylenol'un antimikrobiyal duyarlılık testi için 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde 125 µg/µl chloroxylenol ethanolde çözünerek stok çözeltisi hazırlandı. 9 adet mikrosantrifüj tüpüne 0,5 ml ethanol eklendikten sonra hazırlanan stok çözeltisinden 0,5 ml alınıp her bir tüpte (1/1) oranında seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Toplamda 10 adet mikrosantrifüj tüpü kullanıldı. İlk tüpteki konsantrasyon 125 µg/µl (stok çözeltisi konsantrasyonu) son tüpteki konsantrasyon ise 0,244 µg/µl olarak hesaplandı. Daha sonra her bir tüpten 2 µl alınarak 5 mm çapındaki 0,2 mikronluk whatman filtre kâğıtlarına emdirildi. Böylelikle chloroxylenol içeren diskler elde edildi. İlk diskteki kimyasal konsantrasyonu 250 µg/µl son diskteki kimyasal konsantrasyonu ise 0,488 µg/µl olarak hesaplandı. Kullanılacak olan bakterilerin her biri ayrı ayrı 1 ml serum fizyolojik su içerisinde süspansiyon edildi. İçerisinde bakteri olan serum fizyolojik sudan her bir plak (Mueller Hinton Agar) için 200 µl alınıp ekim yapıldı ve chloroxylenol emdirilmiş olan diskler agara yerleştirildi. Hazırlanan plaklar 29 °C de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. 24 saat sonunda oluşan zon çapları ölçülerek bakterilerin chloroxylenola karşı duyarlı olup olmadıkları belirlendi.

2.2.2.3. Methyloisothiazolinone'un Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Methyloisothiazolinone'un antimikrobiyal duyarlılık testi yapılırken 96'lık microplate plaklar kullanıldı. İlk etapta 20 µg/µl olacak şekilde methyloisothiazolinone suda çözünerek stok çözeltisi ve kuyucuklara doldurulmak üzere Brain Heart Infusion (BHI) çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan BHI çözeltisinden microplate plakta her bir kuyucuğa 150 µl eklendi. Plakın ilk kuyucuklarına 150 µl methyloisothiazolinone çözeltisinden eklendikten sonra 2. sütun sonuna kadar toplamda 16 kuyucukta (1/1) oranında seyreltme yapıldı. İlk kuyucuktaki kimyasal konsantrasyonu 10 µg/µl, son kuyucuktaki kimyasal konsantrasyonu 0,000305 µg/µl olarak hesaplandı. Kuyucuklarda bulunan

methyloisothiazolinone ve broth karışımının üzerine, serum fizyolojik suda süspanse edilmiş bakteri solüsyonundan 2 µl eklendi. Yapılan ekimlerde kontaminasyon olup olmadığını anlamak için bir sütuna sadece methyloisothiazolinone ve broth karışımı eklendi. Ekim işlemleri bittikten sonra 29 °C de 24 saatlik inkübasyon süresi başlatıldı. 24 saat sonunda ekimi yapılan bakterilerin Microplate Reader'da absorbansları ölçüldü. Bulunan absorbans değerlerine göre üremeyi önleyen en düşük kimyasal konsantrasyonu MIC değeri olarak kabul edildi.

2.2.2.4. Boraks'ın Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Boraks'ın antimikrobiyal duyarlılık testi yapılırken 96'lık microplate plaklar kullanıldı. Başlangıçta 30 µg/µl olacak şekilde boraks suda çözünerek stok çözeltisi ve kuyucuklara doldurulmak üzere Brain Heart Infusion (BHI) çözeltisi hazırlandı. 96'lık plakta her bir kuyucuğa Brain Heart Infusion (BHI) besiyerinden 150 µl eklendi. Plagın ilk kuyucuklarına 150 µl boraks çözeltisi eklendikten sonra 1.sutun sonuna kadar toplamda 8 kuyucukta (1/1) oranında seyreltme yapıldı. İlk kuyucuktaki kimyasal konsantrasyonu 15 µg/µl son kuyucuktaki kimyasal konsantrasyonu ise 0,117 µg/µl olarak hesaplandı. Daha sonra her bir kuyucuğa serum fizyolojik suda süspanse edilmiş bakteri solüsyonundan 2 µl eklendi. Yapılan ekimlerde kontaminasyon olup olmadığını anlamak için bir sütuna sadece boraks ve BHI eklendi. Ekim işlemleri bittikten sonra 29 °C de 24 saatlik inkübasyon süresi başlatıldı. 24 saat sonunda ekimi yapılan bakterilerin Microplate Reader'da absorbansları ölçülerek MIC değerleri tespit edildi.

2.2.2.5. İstatiksel Analizler

Gökkuşığı alabalıklarının % 50'sini öldürdüğü tahmin edilen kimyasal konsantrasyonları (LC₅₀) 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerde, SPSS paket programında probit analiz yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Minimum etki konsantrasyonları ise 24 saat sonunda araştırmada kullanılan bakterilerin Microplate Reader'da absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Ölçülen absorbans değerlerinden MIC değerlerinin hesaplanmasında Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraksın gökkuşığı alabalıkları üzerindeki toksikolojik etkilerine ve minimum etki konsantrasyonlarına ait sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

3.1. Triclosan'ın Toksikolojik Etkileri

Yapılan toksisite testlerinde gökkuşığı alabalıklarının laboratuvar ortamına alıştırmaları sırasında ve deney esnasında kontrol gurubunda ölümlere rastlanılmamıştır. Yapılan gözlemlerde 0,12 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda triclosana maruz kalan balıkların solunum hızlarının arttığı, su yüzeyinde toplanıp hava yutmaya çalıştıkları ve daha sonra akvaryum tabanında hareket etmeden sadece solunum yapmaya çalıştıkları gözlemlenmiştir. Ölen balıkların balıkların ağız ve operkulumlarının açık, akvaryum tabanında yan yatmış bir şekilde oldukları gözlemlenmiştir. Triclosan kullanılarak yapılan 96 saatlik toksikolojik testlerde gökkuşığı alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonlar 0,167 mg/L [%95 Güven Aralığı (GA), 0,143 - 0,195 mg/L], 0,157 mg/L [%95 (GA), 0,138 – 0,174 mg/L], 0,084 mg/L [%95 (GA), 0,059 – 0,106 mg/L], 0,063 mg/L [%95 (GA), 0,04 – 0,086 mg/L] olarak tespit edilmiştir.

3.2. Chloroxylenol'un Toksikolojik Etkileri

Chloroxylenol kullanılarak yapılan toksisite çalışmasında 0.5 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda ölümler görülmeye başlanmıştır. Chloroxylenol'a maruz kalan gökkuşığı alabalıklarında triclosan ve methyloisothiazolinona maruz kalan alabalıklardaki gibi benzer davranış değişiklikleri görülmüştür. Ancak chloroxylenol eklendikten sonra balıkların diğer kimyasallara nazaran solunum hızlarının daha çok arttığı gözlemlenmiştir. Ölü balıkların ağızlarının diğer kimyasallardan etkilenen balıklara göre çok daha gergin bir şekilde açık olduğu görülmüştür. Chloroxylenol'un testlerde kullanılan gökkuşığı alabalıklarının (9,19 ± 0,59 g) 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldürdüğü konsantrasyonlar sırasıyla 5,15 mg/L [%95 (GA), 3.64 -10.1mg/L], 0,234 mg/L [%95

(GA), 0,234 -0,713 mg/L], 0,082 mg/L [%95 (GA), 0,071 – 0,102 mg/L], 0,053 mg/L [%95 (GA), 0,023 -0,08 mg/L] olarak saptanmıştır.

3.3. Methyloisothiazolinone'un Toksikolojik Etkileri

Bu çalışmada methyloisothiazolinone kullanılarak yapılan 96 saatlik toksikolojik denemelerde 0,8 mg/L ve üzerindeki konsantrasyonlara maruz kalan gökkuşığı alabalıklarında ölümler ve davranış değişiklikleri görülmeye başlanmıştır. Balıkların sudan çıkmak istemeleri, solunum hızlarının değişmeleri ve daha sonra akvaryum tabanında toplanıp sadece solunum yapmaya çalışmaları gözlemlenen davranış değişiklikleridir. Bu belirtilerin gözlemlendiği balıkların akvaryum tabanında ağız ve operkulumlarının açık halde ölü oldukları tespit edilmiştir. Methyloisothiazolinone kullanılarak yapılan toksikolojik testlerde gökkuşığı alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonlar sırasıyla 0,989 mg/L [%95 (GA), 0,936 – 0,989 mg/L], 0,931 mg/L [%95 (GA), 0,921 -1,057 mg/L], 0,9 mg/L [%95 (GA), 0,85 – 0,963 mg/L], 0,823 mg/L [%95 (GA), 0,803 – 0,895 mg/L] olarak belirlenmiştir.

3.4. Boraks'ın Toksikolojik Etkileri

Bu çalışmada gökkuşığı alabalıkları kullanılarak yapılan toksikolojik denemelerde 1-7 g/L arasındaki kimyasal konsantrasyonlarının balıklarda ölüme neden olmadıkları tespit edilmiştir. Boraks'a maruz kalmış balıklarda herhangi bir davranış değişikliği de gözlenmemiştir.

3.5. Triclosan'ın Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC)

Triclosan'ın araştırmada kullanılan bakteriler üzerindeki MIC değerlerinin 0,0153 – 1000 µg/µl arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Triclosan'ın Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri

BAKTERİLER	MIC (µg/µl)
<i>Aeromonas caviae</i>	62,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,977
<i>Aeromonas salmonicida</i>	R
<i>Lactococcus garvieae</i>	0,0153
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	0,244
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250
<i>Photobacterium damsela</i>	0,244
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,244
<i>Pseudomonas luteola</i>	250
<i>Pseudomonas putida</i>	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5
<i>Vibrio anguillarum</i>	0,977
<i>Vibrio ordalii</i>	0,122
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1,953
<i>Vibrio vulnificus</i>	0,977
<i>Yersinia ruckeri</i>	R

*R:1000 µg/µl'a kadar dirençli

3.6. Chloroxylenol'un Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC)

Chloroxylenol'un araştırmada kullanılan bakteriler üzerindeki MIC değerlerinin 3,906 - 62,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Chloroxylenol'un Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri

BAKTERİLER	MIC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
<i>Aeromonas caviae</i>	31,25
<i>Aeromonas hydrophila</i>	15,625
<i>Aeromonas salmonicida</i>	15,625
<i>Lactococcus garvieae</i>	31,25
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,625
<i>Photobacterium damsela</i>	31,25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	62,5
<i>Pseudomonas luteola</i>	62,5
<i>Pseudomonas putida</i>	3,906
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,625
<i>Vibrio anguillarum</i>	62,5
<i>Vibrio ordalii</i>	62,5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15,625
<i>Vibrio vulnificus</i>	31,25
<i>Yersinia ruckeri</i>	15,625

3.7. Methyloisothiazolinone'un Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC)

Methyloisothiazolinone'un araştırmada kullanılan bakteriler üzerindeki MIC değeri 0,0097 - 0,312 µg/µl arasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Methyloisothiazolinone'un Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri

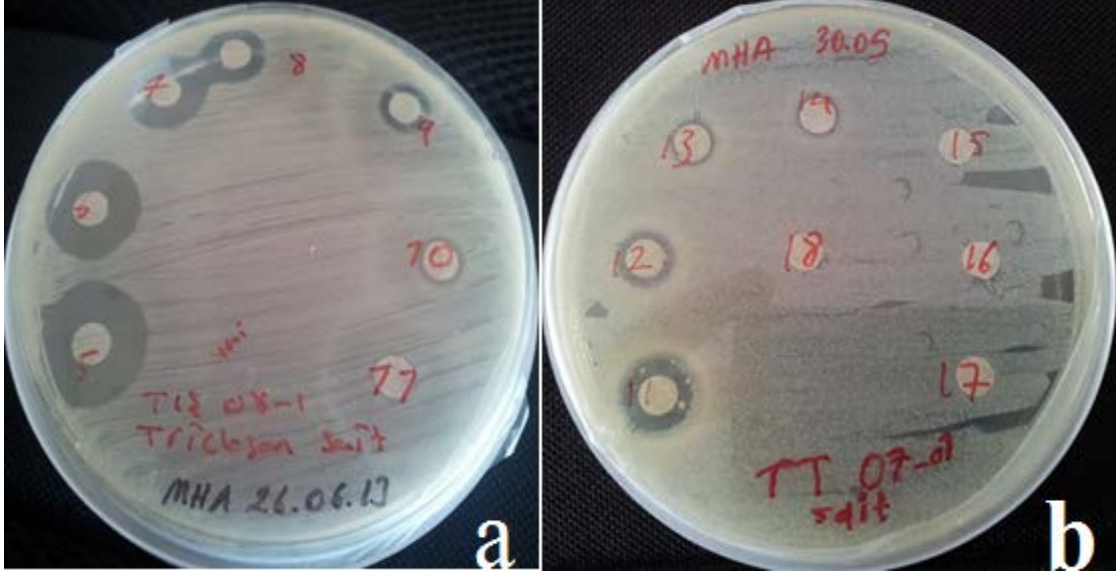
BAKTERİLER	MIC (µg/µl)
<i>Aeromonas caviae</i>	0,0097
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,019
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0,004
<i>Lactococcus garvieae</i>	0,312
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	0,002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,009
<i>Photobacterium damsela</i>	0,019
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,039
<i>Pseudomonas luteola</i>	0,004
<i>Pseudomonas putida</i>	0,039
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0781
<i>Vibrio anguillarum</i>	0,039
<i>Vibrio ordalii</i>	0,0781
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,0097
<i>Vibrio vulnificus</i>	0,0781
<i>Yersinia ruckeri</i>	0,006

3.8. Boraks'ın Bakteriler Üzerindeki Minimum Etki Konsantrasyonu (MIC)

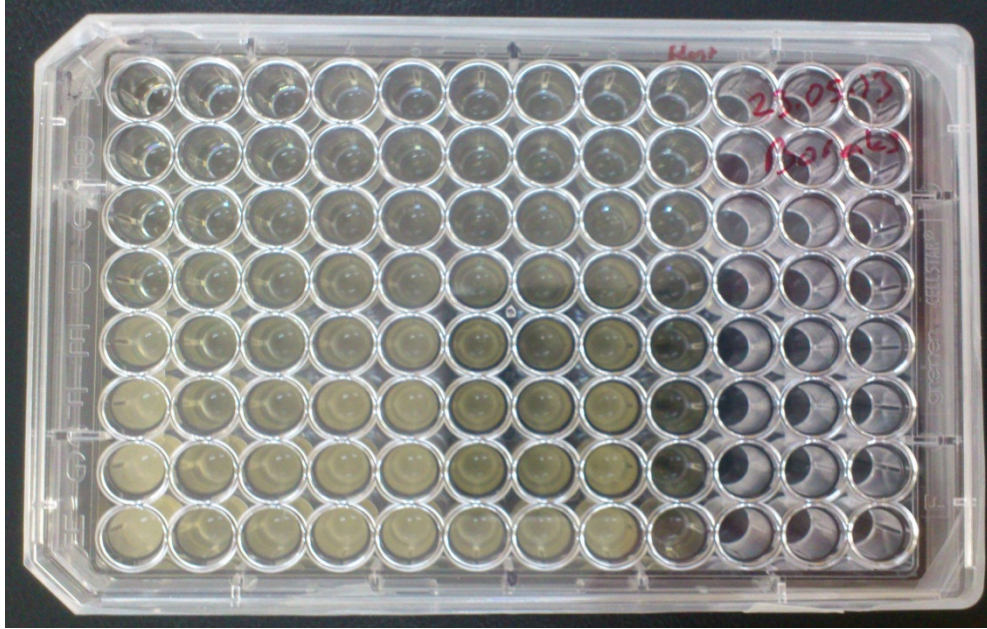
Boraks'ın araştırmada kullanılan bakteriler üzerindeki MIC değerinin 0,46 – 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ arasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Boraks'ın Deney Bakterileri Üzerindeki MIC Değerleri

BAKTERİLER	MIC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
<i>Aeromonas caviae</i>	0,46
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7,5
<i>Aeromonas salmonicida</i>	7,5
<i>Lactococcus garvieae</i>	3,75
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,75
<i>Photobacterium damsela</i>	7,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,5
<i>Pseudomonas luteola</i>	1,875
<i>Pseudomonas putida</i>	7,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,75
<i>Vibrio anguillarum</i>	15
<i>Vibrio ordalii</i>	3,75
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7,5
<i>Vibrio vulnificus</i>	7,5
<i>Yersinia ruckeri</i>	3,75



Şekil 6. a) Triclosan uygulanan *Aeromonas hydrophila* bakterisi , b) Chloroxylenol uygulanan *Yersinia ruckeri* bakterisi



Şekil 7. Boraks uygulanan *Yersinia ruckeri* bakterisi

4. TARTIŞMA

Mikroorganizmalar, yaşamlarını cansız ortamlar ile konakçı canlılar üzerinde sürdüren ve uygun ortam bulduklarında çoğalan organizmalardır. Buldukları yerlerden alınan ve serbest hale geçirilen mikroorganizmaların bir kısmı, suyla birlikte daha geniş bir yüzeye yayılma imkânı bulur ve yeni ortamda üreyerek olumsuz etkiler oluşturur. Bu nedenle kullanılan su ve besin maddelerinin hastalık yapıcı mikroorganizmalardan uzak olması gerekmektedir (Murray vd., 1990). Mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında dezenfektan maddeler kullanılmaktadır. Dezenfektan olarak triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraksın etken maddeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Dezenfektanlar mikroorganizmalar üzerinde etkili oldukları gibi, filtrasyona tabi tutulmadan karıştıkları sucul ortamlardaki canlılar üzerinde de olumsuz etkiler meydana getirebilirler. Bu amaçla bu çalışmada temizlik ürünlerinde ve evsel ürünlerde kullanılan bir takım dezenfektan maddelerinin alıcı su ortamına karıştıklarında nasıl bir toksik etki oluşturacaklarını belirleyebilmek için 96 saatlik akut toksisite testleri yapılmıştır. Bu araştırmada toksikolojik testlerde kullanılacak olan gökkuşuğu alabalığı yavruları 14 gün boyunca laboratuvar ortamına adapte edilmiştir. Casebolt vd. (1998) ortam değişikliğine uğrayan balıkların adaptasyon süresinin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Lerner (2004) adaptasyon süresinin 2 ile 4 hafta arasında olması gerektiğini belirtmiştir. Çalışmamızda uyguladığımız adaptasyon süresinin Lerner'in (2004) belirttiği adaptasyon süresiyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Kane vd. (2004) balıkların, toksik maddelere maruz kalmış olan canlılardaki stres kaynaklı davranış değişikliğinin tespit edilmesinde ideal canlılar olduklarını belirtmişlerdir. Toksik maddeye maruz kalan balıkların davranış değişikliklerinin belirlenmesinin oldukça güç olduğu, ancak bu değişikliklerin bir kısmının gözlemsel olarak belirlenebildiğini ifade etmişlerdir. Araştırmada kullanılan triclosan, chloroxylenol ve methyloisothiazolinone kimyasallarına maruz kalan balıklarda birbirlerine benzer davranış değişiklikleri görülmüştür. Bu üç kimyasala maruz kalan balıklarda, solunum hızlarının artması, su yüzeyinde toplanmaları ve hava yutmaya çalışmaları gibi benzer davranış değişiklikleri görülmüştür. Kullanılan test çözeltilerinin konsantrasyonlarının bu değişikliklerin görülmesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Araştırmada triclosan için; 0,12 mg/L ve üzeri, chloroxylenol için; 0,5 mg/L ve üzeri, methyloisothiazolinone için ise 0,8

mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda ölümler ve davranış değişiklikleri görülmeye başlanmıştır. Ölen balıkların ağız ve operkulumlarının açık olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmada kullanılan boraksın ise 7 g/L gibi en üst konsantrasyonunda dahi herhangi bir ölüm veya davranış değişikliğine rastlanılmamıştır.

Toksikolojik testlerde test suyunun sıcaklık, çözünmüş oksijen, alkalinite, pH, nitrit gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişim, kullanılan kimyasal maddenin canlılar üzerine olan toksik etkilerini değiştirmektedir (Wright, 2001). Bu nedenle yapılan bu çalışmada sıcaklık, çözünmüş oksijen ve pH değerleri günlük olarak ölçülmüştür. Saha vd. (2002) pH değeri yüksek olan suların balıkların solungaçlarından amonyak diffüzyonunu engellediğini, bu durumun da canlı vücudundaki amonyak konsantrasyonunun artmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada ise suların pH, alkalinite ve sertlik değerlerinin kullanılan kimyasalların toksisitesini değiştirdiği ve yüksek orandaki amonyak ve nitritin balık ölümlerine sebep olduğu bildirilmiştir (Middleton ve Reeder, 2002).

Toksikolojik test çalışmalarında, toksik maddenin kullanılan organizmaya olan etkileri, genellikle LC₅₀ değeriyle ifade edilmektedir. Son zamanlarda statik akut testler, test süresinin 96 saatten fazla tutulmaması, deney süresince fiziksel ve kimyasal parametrelerin her deney ünitesinde aynı olmasının sağlanması nedeniyle toksikolojik çalışmalarda tercih edilmektedir (FAO, 1987). Bu nedenle çalışmamızda toksikolojik testlerin yürütülmesinde benzer metotlar uygulanmıştır. Ayrıca 24 saatten uzun toksikolojik testlerde metabolizma artıkları nedeniyle deney suyu kalitesinde bozulmalar meydana geleceği bildirilmiştir (FAO, 1987; Ünsal, 1998). Bu nedenle çalışmamızda, deney suyunun % 70'i 24 saat aralıklarla yenilenerek su kalitesindeki değişmelerin meydana getireceği olumsuzluklar önlenmeye çalışılmıştır. Test suyunun yenilenmesi esnasında toksik madde ilavesi yapılarak, deney süresince balıkların maruz kaldığı toksik madde konsantrasyonu sabit tutulmuştur.

Bu çalışmada triclosan aktif maddesi kullanılarak yapılan toksikolojik testlerde 17 °C de, 9,15 ± 1,79 g ağırlıktaki gökkuşuğu alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonlar 0.167, 0.157, 0.084 ve 0.063 mg/L olarak tespit edilmiştir. Orvos vd. (2002) ve Shibashi vd. (2004) gökkuşuğu alabalıkları ile yaptıkları bir çalışmada LC₅₀ değerini 0,35 mg/L olarak bulmuşlardır. Triclosan'ın tatlı su balıklarındaki toksisitesini belirlemek için yapılan 96 saatlik denemede LC₅₀ değeri 0,26 – 0,288 mg/L arasında bulunmuş ve triclosanın tatlı su balıkları için oldukça toksik olduğu ifade edilmiştir (EPA, 2007). Bu çalışmada, triclosanın gökkuşuğu alabalıkları için belirlenen

LC₅₀ değerlerinin Orvos vd. (2002) ve Shibashi vd.'nin (2004) ve EPA'nın (2007) buldukları değerlerden düşük olduğu ancak EPA'nın (2007) buldukları değerlere daha yakın olduğu görülmektedir. Görülen bu farklılıkların çalışmada kullanılan gökkuşığı alabalıklarının ağırlıklarının ve kullanılan suyun sıcaklığının farklı olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Wright (2001) yapmış olduğu çalışmada balıkların büyüklüklerinin, türlerinin, morfolojilerinin ve taksonomik özelliklerinin, toksik maddeler tarafından etkilenmelerinde önemli olduğunu ve toksik maddenin etki süresinin de toksisiteyi etkilediğini belirtmiştir.

Çalışmada, chloroxylenolun testlerde kullanılan gökkuşığı alabalıklarının ($9,19 \pm 0,59$ g) 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldürdüğü konsantrasyonlar sırasıyla 5.15, 0.234, 0.082 ve 0.053 mg/L olarak saptanmıştır. Leblanc, (1980) chloroxylenolun gökkuşığı alabalığı üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, LC₅₀ değerinin 0,76 mg/L den büyük olduğunu ve chloroxylenolun balıklar için oldukça toksik olduğunu tespit etmiştir. 1 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıkları ile yapılan 96 saatlik statik testte LC₅₀ değeri 0,76 ppm bulunurken, 0,8 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıkları ile yapılan 96 saatlik başka bir statik testte ise LC₅₀ değeri 0,36 ppm olarak tespit edilmiştir (EPA, 2006). Görüldüğü gibi bu çalışmada bulunan değerler ile Leblanc'ın (1980) ve EPA'nın (2006) bulduğu değerler arasında oldukça büyük fark vardır. Bu farklılığın özellikle denemelerde kullanılan balık büyüklükleri arasındaki farklılıktan kaynaklandığı söylenebilir.

Methyloisothiazolinone aktif maddesi kullanılarak 17 °C su sıcaklığında yapılan bu toksikolojik testlerde gökkuşığı alabalıklarının ($9,87 \pm 0,81$ g) 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonlar sırasıyla 0.989, 0.931, 0.9 ve 0.823 mg/L olarak belirlenmiştir. Ward ve Boeri, (1990) methyloisothiazolinonun tatlı su balıklarındaki akut toksisitesini belirlemek için gökkuşığı alabalığını kullanarak yaptıkları testte LC₅₀ değerlerini 0,07 ve 0,19 mg/L olarak bulmuş ve bu değerlerin gökkuşığı alabalıkları için oldukça toksik olduklarını saptamışlardır. Mallak ve Bruncker, (1984) 144 saatlik toksik test sonucunda LC₅₀ değerini 0,14 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bulunan LC₅₀ değerlerinin Mallak ve Bruncker'in (1984) bulmuş oldukları değerlerden düşük, Ward ve Boeri'nin (1990) bulmuş oldukları değerlerden ise yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların su sıcaklığından ve balık büyüklüğünden kaynaklandığı söylenebilir.

Araştırmada boraksın gökkuşığı alabalıklarının ($8,12 \pm 0,92$ g) % 50 sini (LC₅₀) 24, 48, 72, 96 saatte öldüren konsantrasyonlar tespit edilememiştir. Çünkü 7 g/L gibi en

yüksek konsantrasyonda dahi herhangi bir ölüme rastlanılmamıştır. Alabaster'in (1969) yapmış olduğu 48 saatlik bir testte gökkuşağı alabalığı için LC₅₀ değeri 387 mg/L olarak bulunmuştur. Gökkuşağı alabalığı yumurtalarında döllenenmeden hemen sonra yapılan 96 saatlik bir denemede, yumuşak suda LC₅₀ değeri 27 mg/L sert suda ise 54 mg/L olarak bulunmuştur (Birge ve Black, 1983). Gökkuşağı alabalıklarındaki 24 saatlik başka bir denemede ise LC₅₀ değeri 65 - 88 mg/L olarak tespit edilmiştir (WHO, 1998). Görülen bu farklılıkların balık ağırlığı, su sertliği ve su sıcaklığından kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca kullanılan kimyasalın gökkuşağı alabalığı için toksik etki göstermediği de söylenebilir. Çünkü yapılan bir çalışmada 5000 mg/L boraksın alabalıkta sadece derinin koyulaşmasına neden olduğu ve küçük tatlı su balıklarında hiçbir etki yapmadığı tespit edilmiştir (DSİ, 1983).

Mikroorganizmalar farklı koşullara adapte olma yeteneğine sahiptirler. Çeşitli ortamlara karşı direnç kazanabilmeleri de bu adaptasyon kabiliyetleri sonucunda gerçekleşmektedir. Özellikle doğal olarak diğer mikroorganizmalara göre daha dirençli olan mikroorganizmalar uzun temas süreleri sonucu herhangi bir antimikrobiyal maddeye karşı daha kolay direnç kazanabilmektedir. Mikroorganizmalar dezenfektan solüsyonda uzun süre kaldıklarında antibiyotiklere karşı olduğu gibi, direnç kazanarak canlılıklarını koruyabilir ve hatta üremelerini sürdürebilirler. Hastalık yapıcı mikroorganizmalara karşı kullanılan antimikrobisallerin, etken mikroorganizmalar üzerindeki aktivitelerinin belirlenmesi, bu antimikrobisallerin uygulanması esnasında dikkat edilmesi gereken faktörlerden biridir. Bu aktivitenin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden birisi de antimikrobiyal duyarlılık testidir. (Özalp, 1998).

Yapılan literatür taramaları sonucu patojen bakteriler üzerinde triclosan, chloroxyleneol, methyloisothiazolinone ve boraksın minimum etki konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik kapsamlı çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu kimyasallar kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, insanlarda ve balıklarda ortak olarak görülen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde yoğunlaştığı görülmüştür.

Bu çalışmada triclosanın *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi üzerindeki minimum etki konsantrasyonu 250 µg/µl olarak belirlenmiştir. Triclosan'ın *Pseudomonas aeruginosa* üzerindeki minimum etki konsantrasyonunu belirlemek amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, MIC değeri 2,125 mg/L olarak belirlenmiştir (Socoro-Hamud, 2004). Yaptığımız bu çalışmada MIC değeri daha yüksek bulunmuştur. Araştırmamızda triclosanın *Staphylococcus aureus* bakterisi için 29 °C sıcaklıkta 24 saat

inkübasyon süresinde MIC değeri 62,5 µg/µl olarak bulunmuştur. Triclosan'ın MIC değerini saptamak için yapılan 37 °C deki 48 saatlik besin agar testinde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* bakterilerinde triclosanın MIC değerinin 0,025 - 1 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir. Bazı salmonella suşlarının penisilin ve metisilin gibi birkaç antibiyotik türüne karşı dirençli olduğu ancak < 0,1 mg/L triclosana karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Suller ve Russell, 2000). *Staphylococcus aureus* bakterisi kullanılarak yapılan başka bir testte ise triclosanın MIC değeri 0,0625 - 8 mg/L olarak tespit edilmiştir (Kaabar, 2008). Bulduğumuz değerler önceki çalışmalarda bulunan değerlerden yüksektir. Bu durumun bakteri suşları arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklandığı söylenebilir.

Bu araştırmada chloroxylenol kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde MIC değeri *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* için 15,625 µg/µl olarak bulunmuştur. Chloroxylenol'un *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi üzerindeki mikrobiyal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada MIC değeri 1000 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Lear vd., 2001). Chloroxylenol'un 18 - 24 saat inkübasyon süresinde 37 °C sıcaklıkta MIC değeri metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* için ≥ 100 µg/ml, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) için ise 100 µg/ml olarak belirlenmiştir (Ahmad vd., 2013). Önceki çalışmalara nazaran *Pseudomonas aeruginosa* için bulduğumuz değerlerin daha düşük olduğu, *Staphylococcus aureus* için bulduğumuz değerlerin ise daha yüksek olduğu görülmektedir.

Araştırmada, methyloisothiazolinone uygulamasında *Pseudomonas aeruginosa* için MIC değeri 0,009 µg/µl, *Staphylococcus aureus* için ise 0,0781 µg/µl olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın 35°C den 25 ± 2 °C ye düşürülerek ve inkübasyon süresinin 48 ± 2 saat olarak belirlendiği bir çalışmada MIC değerleri *Pseudomonas aeruginosa* için 15 mg/L, *Staphylococcus aureus* için 45 mg/L olarak tespit edilmiştir (Steinberg, 2006). Diğer bir çalışmada ise 30°C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyon süresinde MIC değeri *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* için 40 mg/L olarak bulunmuştur (URL-6). Çalışmamızda methyloisothiazolinonun *Pseudomonas aeruginosa* için bulduğumuz değerlerin Steinberg'in (2006) bulduğu değerden düşük *Staphylococcus aureus* için bulunan değerlerin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada boraksın *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerindeki minimum etki konsantrasyonu 3,75 µg/µl olarak belirlenmiştir. Boraks'ın minimum etki konsantrasyonlarının araştırıldığı önceki çalışmalarda ise yine *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Boraks'ın

Pseudomonas aureginosa ve *Staphylococcus aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkisini belirlemek için 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinde yapılmış olan bir çalışmada MIC değerleri sırasıyla 47,60 mg/ml ve 23,80 mg/ml olarak bulunmuştur (Yılmaz, 2012). Çalışmamızda bulunan değerlerin daha düşük olduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR

Hastalık yapıcı mikroorganizmaların çoğaldığı günümüzde, koruyucu amaçlı kullanılan dezenfektanlar fayda sağlamalarının yanında bir takım zararları da beraberlerinde getirmektedirler. Kurallara uygun şekilde deşarj edilmeyen dezenfektanlar ve diğer kimyasal maddeler ekosistemi tehdit etmekte ve suda yaşayan birçok canlının hayatını olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu nedenle kimyasal maddelerin alıcı su ortamında oluşturabilecekleri etkilerinin belirlenebilmesi için toksisite testleri yapıp etkilerin detaylı bir şekilde ortaya çıkarılması gerekir.

Bu çalışmada triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone ve boraks gibi dezenfektan maddelerin gökkuşağı alabalıkları üzerine olan toksik etkilerini belirlemek amacıyla akut toksik testler yapılmıştır. Bu testlere başlamadan önce gökkuşağı alabalıkları laboratuvar ortamına adapte edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada triclosan, methyloisothiazolinone ve chloroxylenola maruz kalan balıklarda ciddi davranış bozuklukları tespit edilmiştir. Balıklarda solunum hızlarının artması, su yüzeyinde toplanıp hava yutmaya çalışmaları ve akvaryum tabanında hareketsiz bir şekilde bekleyip sadece solunum yapmaya çalışmaları gibi davranış değişiklikleri tespit edilmiştir.

Toksikolojik testler sonucunda triclosanın gökkuşağı alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonları; 0.167, 0.157, 0.084, 0.063 mg/L, olarak tespit edilmiştir. Chloroxylenol'un testlerde kullanılan gökkuşağı alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldürdüğü konsantrasyonları sırasıyla; 5.15, 0.234, 0.082 ve 0.053 mg/L olarak saptanmıştır. Methyloisothiazolinone kullanılarak yapılan toksikolojik testlerde gökkuşağı alabalıklarının 24, 48, 72, 96 saat sonunda % 50'sini (LC₅₀) öldüren konsantrasyonlar sırasıyla; 0.989, 0.931, 0.9 ve 0.823 mg/L olarak belirlenmiştir. Boraks'ın gökkuşağı alabalıklarında 96 saat sonunda ölümlere neden olmadığı tespit edilmiştir.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlara göre chloroxylenolun triclosan, methyloisothiazolinone ve boraksa göre daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Toksisite sırası ise chloroxylenol, triclosan, methyloisothiazolinone ve boraks şeklindedir. Daha önce yapılmış bir çalışmada chloroxylenolun gökkuşağı alabalıkları için oldukça toksik olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise chloroxylenolun sucul ortamda diğer fenol türevlerine göre daha yavaş hidrolize olduğu bildirilmiştir. Chloroxylenol'un yaygın ve

kontROLSÜZ kullanımın alıcı su ortamlarındaki canlılar üzerinde daha ciddi problemler oluşturabileceği görülmektedir. Kullanılan kimyasallar arasında triclosanın en toksik ikinci kimyasal olduğu belirlenmiştir. Yapılmış bir çalışmada alıcı su ortamlarında bulunan triclosanın bir kısmının ultraviyole ışınların etkisi ile bozularak toksik dioksine dönüştüğü rapor edilmiştir. Dioksinlerin besin zincirine ulaşmasının ise kötü sonuçlara sebep olabileceği belirtilmiştir. Triclosanın yaygın kullanımının alıcı su ortamındaki canlılar ve ekosistemdeki diğer canlılar için problem teşkil edebileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada toksisite kategorisinde methyloisothiazolinonun, chloroxyleneol ve triclosandan sonra yer aldığı görülmektedir. Yapılan önceki çalışmalarda methyloisothiazolinonun sucül ortamdaki hidrolizinin alkalın pH'ta düşük, asidik ve nötral pH'ta ise yüksek olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla methyloisothiazolinonun alıcı su ortamındaki gökkuşağı alabalıkları için problem teşkil edebileceği, alıcı su ortamının alkalın pH değerine sahip olmasının da bu toksisiteyi arttırabileceği anlaşılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan boraksın ise herhangi bir toksik etkisine rastlanılmamıştır. Yapılan önceki çalışmalarda da boraksın toksik etkisi görülmemiştir. Boraksın doğadaki biyotransformasyonu hakkında da herhangi bir kayıtlı bilgi bulunmamaktadır. Bu sonuçlara ek olarak boraksın alıcı su ortamında ciddi bir değişikliğe sebep olmayacağı görülmektedir.

Triclosan kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinin sonucunda MIC değerleri *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* için sırasıyla; 62.5, 0.977, 1000, 0.0153, 0.244, 250, 0.244, 0.244, 250, 62.5, 62.5, 0.977, 0.122, 1.953, 0.977, 1000 µg/µl olarak bulunmuştur. Chloroxylenol kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde MIC değerleri *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* için sırasıyla; 31.25, 15.625, 15.625, 31.25, 62.5, 15.625, 31.25, 62.5, 62.5, 3.906, 15.625, 62.5, 62.5, 15.625, 31.25, 15.625 µg/µl olarak belirlenmiştir. Methyloisothiazolinone uygulamasında MIC değerleri *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Pseudomonas damsela*, *Pseudomonas*

fluorescens, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* için sırasıyla; 0.0097, 0.019, 0.004, 0.312, 0.002, 0.009, 0.019, 0.039, 0.004, 0.039, 0.0781, 0.039, 0.0781, 0.0097, 0.0781, 0.006 µg/µl olarak bulunmuştur. Boraks'ın antimikrobiyal duyarlılık testinde MIC değerleri *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas aereginosa*, *Pseudomonas damsela*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Yersinia ruckeri* için; 0.46, 7.5, 7.5, 3.75, 7.5, 3.75, 7.5, 7.5, 1.875, 7.5, 3.75, 15, 3.75, 7.5, 7.5, 3.75 µg/µl olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre *Aeromonas caviae*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aereginosa*, *Pseudomonas luteola*, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia ruckeri* bakterilerinde en etkili kimyasal sıralamasının methyloisothiazolinone, boraks, chloroxyleneol ve triclosan şeklinde olduğu belirlenmiştir. *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus lactis lactis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* ve *Vibrio vulnificus* bakterilerinde kimyasalların antimikrobiyal etkilerinin büyükten küçüğe doğru methyloisothiazolinone, triclosan, boraks ve chloroxyleneol şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir. *Pseudomonas putida* bakterisinde methyloisothiazolinonun diğer kimyasallara göre daha etkili olduğu ve en etkili kimyasal sıralamasının; methyloisothiazolinone, chloroxyleneol, boraks ve triclosan şeklinde olduğu belirlenmiştir. *Lactococcus garvieae* bakterisinde ise antimikrobiyallerin etki derecelerine göre triclosan, methyloisothiazolinone, boraks ve chloroxyleneol şeklinde sıralandığı belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER

1. Bu araştırmada elde edilen sonuçlara göre temizlik ürünlerinde, kozmetikte ve diğer evsel ürünlerde kullanılan triclosan, chloroxylenol, methyloisothiazolinone gibi dezenfektan aktif maddelerinin sucul hayat için önemli problem oluşturabileceği ve özellikle chloroxylenolun çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki yapabileceği görülmektedir.

2. Chloroxylenol, alıcı su ortamında diğer fenol türevlerine göre daha yavaş bozulduğu ve alabalıklar için oldukça toksik olduğu için, ekosistemde olumsuz bir etkiye sebebiyet vermemek için bu maddenin karıştığı su ortamında toksik sınırlarını aşıp aşmadığı düzenli olarak kontrol edilmelidir.

3. Su ortamında, triclosan konsantrasyonunun 0,063 mg/L'ye, chloroxylenol konsantrasyonunun 0,053 mg/L'ye, methyloisothiazolinone konsantrasyonunun 0,823 mg/L'ye ulaşması ortamda bulunan alabalıklar üzerinde toksik etki oluşturabilir. Özellikle triclosan, ultraviyole ışıklardan etkilendiğinden dioksinlerin oluşmasına sebep olur. Bu dioksinlerin de besin zincirine ulaşması halinde olumsuz durumlarla karışılaşılabilir. Bu yüzden, triclosan içeren ürünler yerine insan sağlığı için daha güvenli aktif maddelerin bulunduğu ürünler tercih edilmelidir.

4. Toksik maddeler gıda zincirindeki tüm canlı gruplarını etkiler. Bu nedenle toksikolojik çalışmalar gıda zincirinin her basamağındaki canlıları kullanarak yaygınlaştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Ahmad, B., Urbas, F., Jamil, J., Ahmed, J. ve Bashir, S., 2013. Biocides susceptibility pattern and phenotypic detection of Efflux pump in *Staphylococcus aureus* isolates from two tertiary hospitals of Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 25, 3171 – 3178.
- Alabaster, J.S., 1969. Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents, and miscellaneous substances. *International Pest Control*, 11, 2, 29 – 35.
- Aly, R. ve Malbach, H., 1988 "Comparative antibacterial efficacy of a 2-minute surgical scrub with chlorhexidine gluconate, povidone-iodine, and chloroxylenol sponge-brushes". *American Journal of Infection Control*, 16, 4, 7 - 173
- Altinok, I., 2004. Toxicity and Therapeutic Effects of Chloramin-T for Treating *Flavobacterium columnare* Infection of Goldfish, *Aquaculture*, 239, 47-56.
- Altinok, I., Capkin, E. ve Boran, H., 2011. Influence of Bioassay Volume, Water Column Height, and Octanol-Water Partition Coefficient on the Toxicity of Pesticides to Rainbow Trout, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 596-600.
- APHA/AWWA/WEF, 1992. Standart Metods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1.
- Arnold, H., Pluta, H.J. ve Braunbeck, T., 1996. Cytological Alterations in the Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) After Prolonged Exposure to Low Concentrations of Waterborne Endosulfan, *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 39-52.
- Atamanalp, M., 2004. Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Yayınlanmamış.
- Bilgehan, H., 1989 Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi İzmir.
- Birge, W.J. ve Black J.A., 1977 Sensitivity of Vertebrate Embryos to Boron Compounds, NTIS Technical Final Rreport 7716, 1 - 77
- Brady, L.M, Thomson, M., Palmer, M.A ve Harkness J.L, 1990 "Successful control of endemic MRSA in a cardiothoracic surgical unit". *Med. J. Aust.*, 152, 5, 5-240.
- Braunbeck, T. ve Appelbaum, S., 1999. Ultrastructural Alterations in the Liver and Intestine of Carp (*Cyprinus carpio*) Induced Orally by Ultra-low Doses of Endosulfan, *Diseases of Aquatic Organisms*, 36,3, 183-200.
- Casebolt, D.B., Speare D.J. ve Horney, B.S., 1998. Care and Use of Fish as Laboratory Animals: Current State of Knowledge, *Laboratory Animal Science (United States)*, 48, 2, 124-36.

- Castanedo-Tardana, M. P. ve Zug, K. A., 2013. "Methylisothiazolinone". *Dermatitis: contact, atopic, occupational*, 24 ,1, 2 – 6.
- Ciba Specialty Chemicals. 1998. Irganon DP 300, Irgacare MP. Toxicological and Ecological Data. Official Registrations. Technical Brochure 2521. Ciba Specialty Chemical, Basel, Switzerland.
- CLSI 2006 M7- A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically
- Collier, P.J., Ramsey, A., Waigh, R.D., Douglas. K.T., Austin, P ve Gilbert P.,1990. "Chemical reactivity of some isothiazolone biocides". *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 4, 578 – 584. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb01551.x. PMID 2292521.
- CPMP, 2000. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity, CPMW/SWP/1042/99, 1-9.
- Çetin, E.T., 1982. Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon, İstanbul Tıp Fakültesi Yayını.
- DSİ, 1983. "Kırka Yöresi Bor Kirliliği Araştırması Raporu", Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, DSİ İçmesuyu ve Kanalizasyon Dairesi Başkanlığı.
- EPA, 1993. Methods for Measuring The Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C., EPA/600/4-90/027F
- EPA, Office of Pesticide Programs; Pesticide Ecotoxicity Database (2000) on 4-Chloro-3,5-dimethylphenol (88-04-0), 2006: http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm
- European Commission, 2009. Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Consumer Products Opinion on Triclosan.
- Fan, F. Yan, K. ve Wallis NG, ve ark. 2002. "Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus". *Antimicrob. Agents Chemother*, 46, 11, 3343–7.
- FAO., 1987. Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shortterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247, Roma.
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. ve Clesceri, L.S., 1985. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition.
- Gruendemann,B.J., 2001. Mongum,S.S.:İnfection Prevantion in Surgical Suites.Saunders Company,U.S.A.

- Heitmuller, T., 1980. Acute Toxicity of Kathon WT to Sheepshead Minnows, *Cyprinodon variegatus*: Report No. BP-80-3-53. (Unpublished study received under 707-128; prepared by EG&G, Bionomics, submitted by Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pa.; CDL:243239-A)
- Hildebrand, G. H., 1982. "Borax Pioneer: Francis Marion Smith." San Diego: Howell-North Books, 267, ISBN 0-8310-7148-6
- Hugo W.B. ve Russell A.D., 1987. *Pharmaceutical Microbiology*, Blackwell Scientific Publications, London.
- Kaabar, F., 2008. Comparative Susceptibility to Triclosan and Antibiotics Among *Staphylococcus* Isolates From Southern Vancouver Island, Undergraduate Research Project, Malaspina University-College, British Columbia.
- Kahlmeter, G., Brown, D.F, Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton J.W., Odenholt, I, Rodloff, A., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Soriano, F. ve Stetsiouk O., 2006. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 12, 501 - 503.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C.A. ve Hunter, C., 2004. A Video-Based Movement Analysis System to Quantify Behavioral Stress Responses of Fish. *Water Research*, 38, 3993-4001.
- Kanra G. ve Ceyhun M., 1985. Hastane İnfeksiyonlarının Önlenmesinde Temel İlkeler Katkı, 6, 6, 421-432.
- Klauning, J.E., 2000. *Pesticide Toxicology, Evaluating Safety and Risk*, Purdue Pesticide Programs, Purdue University Cooperative Extension Service, PPP-40, Indiana University School of Medicine.
- Larson, E et al. 1986. An approach for selection of health care personnel handwashing agents. *Infection Control*.
- Larson, E., 1988. Guideline for use of topical antimicrobial agents. *American Journal of Infection Control*, 16 - 253.
- Laufer, B. ve Nation, P.A., 1999. Vocabulary-Size Test of Controlled Productive Ability, *Language Testing*, 16, 36-55.
- Lear, J. C., Maillard, J. Y., Goddard, P. A.; Dettmar, P. W. ve Russell, A. D., 2001. Studies on chloroxyleneol- and triclosan-tolerant strains of bacteria. Abstracts Of The General Meeting Of The American Society For Microbiology, 101, 594
- Leblanc, G., 1980. Acute Toxicity of Ottasept to Rainbow Trout (*Salmogairdneri*): Lab Project Number: BW-80-10-756. Unpublished study prepared by EG & G, Bionomics.

- Leblond, V.S., Bisson, M. ve Hontela, A., 2001. Inhibition of Cortisol Secretion in Dispersed Head Kidney Cells of Rainbow Trout (*O. mykiss*) by Endosulfan, An Organochlorine Pesticide, *General and Comparative Endocrinology*, 121,1, 48-56.
- Lerner, A., 2004. Guidelines for the Use of Fishes in Research, Publications Manager American Fisheries Society, 5410 Grosvenor Lane Bethesda, MD 20814.
- Loomis, T.A., 1978. *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Mallak, F.P, and Brunker, R.L. 1984. Determination of the toxicity of selected metal working fluid preservatives by use at the microtox system and in vitro enzyme assay *Drug Chem Toxicol Toxic Screening Proc Using Bact Syst* 1 – 65 -76
- Mc Ginnis, D., 2008. Toxicological Profile of Triclosan in the Aquatic Environment, Department of Marine and Environmental Systems Florida Institute of Technology Melbourne.
- Mc Murry, L.M., Oethinger, M. ve Levy, S.B., 1998. "Triclosan targets lipid synthesis". *Nature* 394, 6693, 531–2.
- Middleton, R.J. ve Reeder, B.C., 2002. Dissolved Oxygen Fluctuations in Organically and Inorganically Fertilized Walleye (*Stizostedion vitreum*) Hatchery Ponds. *Aquaculture*, 219, 337-345.
- Minnesota Department of Health, 2010. Drinking Water Contaminants of Emerging Concern Program, Triclosan Exposure and Toxicity Summary.
- Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, G.S. ve Thompson J.H., 1990. *Medical Microbiology*, Wolfe Medical Publ. Ltd. Print. USA.
- Nowak, B., 1992. Histological Changes in Gills Induced by Residues of Endosulfan, *Aquatic Toxicology*, 23, 65-83.
- Orvos, DR., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M, Rothenstein, A. ve Cunningham V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ Toxicol Chem* 21, 1338–1349.
- Özalp M., 1998. Antiseptik, Dezenfektan ve Koruyuculara Karşı Bakteriyel Direnç. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. Antalya, Ekim, 20 - 3.
- Pascoe, D. ve Edwards, R.W., 1989. *Aquatic Eco.: Fundamental Concepts and Methodologies*. Volume II. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, 203, 93-126.
- Pauli O. ve Franke G., 1983. *Proc Int Biodeteriation Symp* 2nd. 52-60 (1971) (2) Paulus W, Genth H; *Biodeteriation* 5, 701-712.
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of Aquatic Tox.*, Second Edition, ISBN 1-56032-090-7

- REDSHAW,C.,1995.Ecotoxicological Risk Assesment of Chemicals Used in Aquaculture;a Regulatory Viewpoint.Aquaculture Research
- Ricart, M., Guasch, H. ve Alberch M, et al. 2010. "Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms". *Aquat. Toxicol*, 100, 4, 53 - 346.
- Rohm and Haas, Toxicology Department, 1984. "Evaluation of the toxicity of Kathon biocide".
- Saygı, Ş., Deniz, G., Kutsal, O. ve Vural, N., 1991. Chronic Effect of Cadmium on Kidney, Liver, Testes and Fertility of Male Rats, *Biological Trace Element Research*, 31, 209-214.
- Shibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y. and Arizono, K., 2004. Effects on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*, 67, 167 - 179.
- Slater-Radosti C, Van Aller G, Greenwood R, et al. 2001. "Biochemical and genetic characterization of the action of triclosan on *Staphylococcus aureus*". *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 1, 1 - 6.
- Socoro-Hamud, A., 2004. A. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline and triclosan, *Cantaurus*, 12, 7 - 9.
- Staff. 2008. "Creating Flame Colors". The Science Company. Retrieved November, 30.
- Steinberg DC. 2006. *Preservatives for Cosmetics*. 2nd ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2006.
- Suller, M., T. ve Russell, A., D. 2000. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *J Antimicrob Chemother*, 46, 8 – 11.
- Terrell, Y. 1988. The Acute Toxicity Bioassay of Issue Plus on Rainbow Trout; Project No. 88-474; Prepared by American Standard Biosciences Corp. for Diversey Wyandotte Corporation, Wyandotte, Michigan. Triclosan and Antibiotics resistance summary by GreenFacts of an opion by the European Commission Scientific Committee on Consumer Safety (March 2010)
- Töreci, K., 1990. Dezenfeksiyon Yöntemleri ve Seçimi, *ANKEM Dergi* 4, 3, 364 – 371.
- URL-1,
<http://biyorss.com/2010/11/atik-kimyasallar-balik-davranislarini-degistiriyor> ,12
Kasım 2013
- URL-2,
<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/3045fact.pdf> , September 1994

URL-3,

<http://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do;jsessionid=11FA34AAE6AF2729BB9D3915388F4634?chebiId=35718>, 06.04.2013

URL-4,

http://www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu428/kimyasallarla_muhafaza.pdf, 15.04.2013

URL-5, <http://www.gimdes.org/triklosan-iceren-urunlerle-gelen-buyuk-tehlike.html>, 21.05.03

URL-6,

http://www.dow.com/assets/attachments/business/biocides/preservatives_for_household_and_I-and-I/neolone_m-10/tds/neolone_m-10.pdf, 26.05.2013

USEPA. 2007. 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (triclosan): Toxicology Chapter for the Reregistration Eligibility Decision (RED) document.

Ünsal, M., 1998. Kirlilik Deneyleri: Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, No. 11, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bodrum.

Vural, N., 1996. Toksikoloji, A.Ü.Ecz.F. Yayınları No: 73, Ankara, A.Ü. Basımevi, 1-20.

Ward, T.; Boeri, R., 1990. Acute Flow Through of Kathon 886 Biocide to the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*: Lab Project Number: 9003-RH: 89RC-0343. Unpublished study prepared by Resource Analysts Inc., EnviroSystems Div. 250 p

Webster J, Faoagali JL, Cartwright D. Elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a neonatal intensive care unit after hand washing with triclosan. *J Paediatr Child Health* 1994;30:59-64.

WHO. Environmental Health Criteria 204: Boron; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998

Yazdankhah SP, Scheie AA, Høiby EA, et al. (2006). "Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview". *Microb. Drug Resist.* 12 (2): 83–90. doi:10.1089/mdr.2006.12.83.PMID 16922622

Yılmaz, M. T. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J Med Sci*, 42 (2012) 1423-1429

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Hatay'ın Reyhanlı ilçesinde doğdu. İlk orta ve lise öğrenimi Hatay'da tamamladı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği'ni kazandı. 2012 yılında lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Lisansüstü eğitime başladı. Halen lisansüstü eğitime devam etmektedir.