

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TRİKLOSAN, KLOROKSİLENOL, METİLİZOTİAZOLİNON VE
BORAKS ANTİMİKROBİYAL AJANLARININ, GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*) YAVRULARINDAKİ GENOTOKSİK VE
HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Tuna ÖZCELEP

EKİM 2023
TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**TRİKLOSAN, KLOROKSİLENOL, METİLİZOTİAZOLİNON VE
BORAKS ANTİMİKROBİYAL AJANLARININ, GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*) YAVRULARINDAKİ GENOTOKSİK VE
HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ**

Tuna ÖZCELEP

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 15 / 09 / 2023

Tezin Savunma Tarihi : 11 / 10 / 2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Trabzon 2023

ÖNSÖZ

“Triklosan, Kloroksilenol, Metilizotiazolinon ve Boraks Antimikrobiyal Ajanlarının, Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularındaki Genotoksik ve Histopatolojik Etkileri ” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Çalışma; Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimlerini paylaşarak her konuda destek olan, tez danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a teşekkürlerimi sunarım. Yine tez çalışmalarım esnasında desteğini gördüğüm ve aynı zamanda tez izleme komitesinde yer alan Prof. Dr. Erol ÇAPKIN’a ve tez izleme komitesinde yer alan ve tezime olan katkılarıyla Prof. Dr. Mehmet KOCABAŞ’a teşekkür ederim. Yine çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Şevki KAYIŞ’a ve tez yazım aşamasında her türlü desteğini gördüğüm arkadaşlarım Balıkçılık Teknolojisi Yüksek Mühendisi Recep PARLAK ve Dr. Öğr. Üyesi Rafet Çağrı ÖZTÜRK’e teşekkür ederim.

Tez çalışma dönemi başta olmak üzere benim için her türlü fedakârlığı yaparak, bana destek veren eşim Ayşe ÖZCELEP’e, evlatlarım Ayşe Begüm ve Mehmet Emin’e, bugünlere gelmemi sağlayan, üzerimde hak ve emeği olan, annem Besire ÖZCELEP’e, babam Numan ÖZCELEP’e ve yine hertürlü desteğini gördüğüm kardeşim Erhan ÖZCELEP’e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasının bundan sonraki çalışmalara katkı sağlamasını temenni ederim.

Tuna ÖZCELEP

Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Triklosan, Kloroksilenol, Metilizotiazolinon ve Boraks Antimikrobiyal Ajanlarının, Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularındaki Genotoksik ve Histopatolojik Etkileri ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar Prof.Dr. İlhan ALTINOK’un 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. 11.10.2023.

Tuna ÖZCELEP

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.1.1. Pestisitler.....	2
1.1.2. Dezenfektanlar	4
1.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	8
1.2.1. Triklosan: Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları	8
1.2.2. Kloroksilenol: Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları.....	10
1.2.3. Metiloizotiazolinon: Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları	12
1.2.4. Boraks: Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları	14
1.3. Toksikite Çalışmaları	15
1.3.1. Toksikite Çalışmaları Deney Organizmalarının Seçimi	17
1.3.2. Gökkuşığı Alabalığı.....	17
1.3.3. Toksikite Çalışmalarında Su Kalitesi	18
1.4. Histoloji	19
1.4.1. Fiksasyon (Tespit)	19
1.4.2. Suyunu Alma (Dehidratasyon).....	20
1.4.3. Saydamlaştırma	20
1.4.4. Parafinizasyon	20
1.4.5. Blok hazırlama	20
1.4.6. Kesit Hazırlama.....	21
1.4.7. Boyama.....	21
1.5. Comet Analizi	21

1.6. Real Time PCR	22
1.7. Önceki Çalışmalar.....	23
1.7.1. Triklosan Çalışmaları	23
1.7.2. Kloroksilenol (PCMX) Çalışmaları.....	25
1.7.3. Metilizotiazolinon (MIT) Çalışmaları	26
1.7.4. Boraks (BRX)Çalışmaları	27
1.8. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi.....	29
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	30
2.1. Kullanılan Kimyasallar	30
2.2. Deney Balıkları	30
2.3. Deneysel Tasarım	30
2.4. Histopatoloji.....	32
2.5. Comet analizi	34
2.6. Gen Ekspresyonu (Gen İfadesi).....	37
2.6.1. RNA izolasyonu	37
2.6.2. Revers (Ters) Transkripsiyon.....	37
2.6.3. Primerler	38
2.6.4. Kantitatif Real-Time PCR(qRT-PCR)	39
2.7. İstatiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1. Histopatolojik İnceleme.....	41
3.2. Comet Analizi	45
3.3. Gen Ekspresyonu	45
4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇLAR.....	55
6. ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

TRİKLOSAN, KLOROKSİLENOL, METİLİZOTİAZOLİNON VE BORAKS
ANTİMİKROBİYAL AJANLARININ, GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus
mykiss*) YAVRULARINDAKİ GENOTOKSİK VE HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ

Tuna ÖZCELEP

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
2023, 81 Sayfa

Triklosan (TRC), kloroksilenol (PCMX) ve metilizotiazolinon (MIT) sabunlarda antimikrobiyal olarak yaygın olarak kullanılan, boraks (BRX) ise yaygın olarak ev temizliğinde kullanılan bir kimyasaldır. Bu kimyasallar sucul ekosisteme atık sularla karışarak sucul organizmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yarı statik koşullar altında 40 gün boyunca TRC, PCMX, MIT ve BRX'e maruz bırakılması sonucunda, genotoksitesi, gen ekspresyonu ve histopatolojisi üzerindeki kronik etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan comet analizlerinin sonucuna göre MIT, TRC ve PCMX'in balıkların eritrositlerinde önemli DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. TRC, PCMX, MIT ve BRX'e maruz kalan gökkuşağı alabalıklarının SOD, GPX1, GPX2, GSTA, HSP90BB, HSP90BA, CAT ve HSC70A genlerinin ekspresyon seviyeleri (PCMX'e maruz kalan balıklarda GSTA geninin ekspresyonunun artmaması hariç) istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir. Bu kimyasallara maruz bırakılan balıkların solungaç, dalak, karaciğer ve böbreklerinde histolojik hasarlar tespit edilmiştir. Çalışmamız gökkuşağı alabalığı üzerinde TRC, PCMX, MIT ve BRX'in kronik toksik etkilerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sucul ortamı koruma adına bu kimyasalları temizlik amacıyla kullanırken daha dikkatli olunması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Comet analizi, genotoksite, gen ekspresyonu, histopatoloji, aquatik toksite, antimikrobiyaller

PhD. Thesis

SUMMARY

GENETOXIC AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF TRICLOSAN, CHLOROXYLENOL, METHYLISOTHIAZOLINONE AND BORAX ANTIMICROBIAL AGENTS ON RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) JUVENILES

Tuna ÖZCELEP

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries Technology Engineering Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
2023, 81 Pages

While triclosan (TRC), chloroxylenol (PCMX) and methylisothiazolinone (MIT) are widely used as antimicrobials in soaps, borax (BRX) is used in household cleaning. These chemicals mix with wastewater into the aquatic ecosystem and affect aquatic organisms. In this study, the chronic effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on genotoxicity, gene expression and histopathology were evaluated after exposure to TRC, PCMX, MIT and BRX under quasi-static conditions for 40 days. It was determined by the Comet assay results that MIT, TRC and PCMX caused significant DNA damage in the erythrocytes of fish. Transcription of the SOD, GPX1, GPX2, GSTA, HSP90BB, HSP90BA, CAT and HSC70A genes was significantly regulated as a result of exposure to TRC, PCMX, MIT and BRX, except for the GSTA gene exposed to PCMX. Histological damage was detected in the gills, spleen, liver and kidneys of the fish. Our study shows that the chronic toxic effects of TRC, PCMX, MIT and BRX are high in rainbow trout. Therefore, we must be more careful when using these chemicals for cleaning purposes in order to protect the aquatic environment.

Key Words: Comet assay, genotoxicity, gene expression, histopathology, aquatotoxicity, antimicrobials

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Triklosan'ın (TRC) Moleküler Yapısı	9
Şekil 2. Kloroksilenol (PCMX) 'un Moleküler Yapısı	11
Şekil 3. Metiloizotiazolinon (MIT)'un Moleküler Yapısı	13
Şekil 4. Boraks(BRX)'ın Moleküler Yapısı	15
Şekil 5. Gökkuşığı alabalıkları ve kimyasallara maruz bırakıldığı akvaryumlar	31
Şekil 6. Deney şeması	31
Şekil 7. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşığı alabalığı solungaçlarının histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar nekroz (N), tromboz (T), lamel füzyon (LF), geniş hiperplazik alan (*), hiperplazi (HP) ve lamel apozisyon (LA).	43
Şekil 8. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşığı alabalığı dalağının histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar, nekroz (N) ve melanomakrofaj merkezi (MMC) oluşumu.	43
Şekil 9. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşığı alabalığı karaciğerinin histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar piknotik nükleus (ok başı), hepatik hücre çekirdeklerinde degradasyon (ok), yağ vakuelleri (*).....	44
Şekil 10. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşığı alabalığı böbreğinin histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar, melanomakrofaj merkezi (MMC), piknotik çekirdek (PN), glomerulus dejenerasyonu (*) ve şişkin tübüller (#).....	44
Şekil 11. TRC, PCMX, MIT ve BRX maruz bırakılan Gökkuşığı alabalıklarında Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 1 (GPX1), glutathione peroxidase type 2 (GPX2), glutathione S-transferase A (GSTA), heat shock 90 kDa protein 1 beta isoform b (HSP90BB), heat shock 90 kDa protein 1 beta isoform a (HSP90BA), heat shock 70 kDa protein 8 isoform a (HSC70A) ve katalaz (CAT) genlerinde mRNA ekoresyonun kat değişiklikleri. Kat değişiklikleri, maruz kalmayan kontrol grubuyla karşılaştırılacak elde edildi. Veriler ortalama $\pm$ SEM'i temsil eder.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Gökkuşığı alabalığının taksonomisi.....	18
Tablo 2. Çalışmalar esnasındaki su kalite parametreleri.....	32
Tablo 3. Parafine gömme işlem aşamaları.....	33
Tablo 4. Hematoksilen-Eozin boyama işlem aşamaları.....	33
Tablo 5. Histopatolojik lezyon skor tablosu	34
Tablo 6. Gökkuşığı alabalığından elde edilen; Cu/Zn-süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz 1 (GPX1), glutatyon peroksidaz tip 2 (GPX2), glutatyon S-transferaz A (GSTA), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform b (HSP90BB), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform a (HSP90BA), ısı şoku 70 kDa protein 8 izoform a (HSC70A), katalaz (CAT) ve Uzama faktörü 1 alfa (EF1) genleri için spesifik primer çiftleri.....	38
Tablo 7. Gökkuşığı alabalığının 40 gün antibakteriyel ajanlara maruz kaldıktan sonraki histopatolojik bulguları..	42
Tablo 8. 40 gün süreyle kimyasala maruz bırakılan balıkların kırmızı kan hücreindeki comet assay skoru. DNA hasarı skorları.	45
Tablo 9. 40 gün süreyle triclosan (TRC), chloroxilenol (PCMX), methylisothiazolinone (MIT) ve borax'a (BRX) maruz kalan gökkuşığı alabalığının karaciğer ve böbreğindeki farklı genlerin bağıl gen ekspresyonu.	46

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BIT	: Benzisothiazolinone
BRX	: Boraks
CMIT	: Klorometilizotiazolinon
ÇO	: Çözünmüş Oksijen
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroetan
DCOIT	: Dichlorooctylisothiazolinone
EC ₅₀	: %50 Etki Elde Etmek İçin Gereken Konsantrasyon
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
g	: Gram
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
L	: Litre
LC ₅₀	: Canlıların %50'sini öldüren konsantrasyon
ml	: Mililitre
MIT	: Metilizotiazolinon
µg	: Microgram
µl	: Microlitre
OIT	: Octylisothiazolinone
PCMX	: Kloroksilenol
PPM	: Milyonda bir birim (Parts per million)
RT-PCR	: Gerçek zamanlı-Polimeraz zincir reaksiyonu
TRC	: Triklosan

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Toksikoloji terimi Yunanca ok zehri anlamına gelen “toksikos” ile bilim dalı anlamına gelen “logos” sözcüklerinden oluşur. Toksikolojinin kelime anlamı “zehir bilimi” dir. Ancak bu tanım, bilim ve teknolojinin son yıllardaki hızlı gelişiminin toksikoloji bilimine de etkisiyle yeterince açıklayıcı değildir. Günümüzde ise; kimyasallar ile etkiledikleri sistemler arasındaki ilişkiyi inceleyen veya kimyasalların etki derecesini belirleyen bilim dalıdır. (Güner, 2014). Modern toksikoloji yeni ortaya çıkmış olsa da önceki nesillerin toksik maddelerin neden olduğu sorunların farkında olduğu anlaşılmaktadır. Dünyadaki zararlıların bertaraf edilmesinde zehirli bitki ve hayvanların kullanılması ve gezegenimizin zehirli metaller ve mineraller açısından zengin olması, toksikolojinin çok eskilere dayandığını göstermektedir. Bununla birlikte modern toksikoloji bilimi çok geniş alana hitap ettiği için, tanımlayıcı toksikoloji, klinik toksikoloji, çevresel toksikoloji, mesleki toksikoloji, düzenleyici toksikoloji, adli toksikoloji, analitik toksikoloji ve mekanik toksikoloji gibi alt dallara ayrılarak çalışılmaktadır (Burcham, 2013).

Bütün kimyasal maddeler doza bağlı olarak toksik etki gösterebilmektedir. Kimyasalların etkiledikleri sistemlerde yapısal değişiklik veya lezyon şeklinde ortaya çıkabilen toksik etkileri, biyolojik sistemler tarafından geri dönüştürülebileceği gibi geri dönüştürülemeyip hücrelerin ölümü ile de sonuçlanabilmektedir (Vural, 1996). Canlılarda kimyasal maddelerin toksik etkilerine bağlı olarak gerçekleşen yapı ve fonksiyon değişikliklerinin tespit edilip yorumlanması için deneye dayalı çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Çeşitli etkenlere bağlı toksik etkileri ortaya çıkarmak ve toksik etkilere ilişkin bilgileri artırmak amacıyla bilimsel araştırmalar yapmak, çevredeki kimyasal etkenlerin toksik etki potansiyellerini araştırarak risk değerlendirmesi yapmak, kimyasal maddelerin ve diğer toksinlerin zararlı etkilerini önlemek ve kontrol altına almak toksikolojinin başlıca hedefleridir (Vural, 2005).

20. yüzyılda kimya endüstrisindeki aşırı büyüme, hayatımıza olumsuz etki eden madde sayısında artış meydana getirmiştir. Günümüzde çoğunluğu insanlar tarafından yapay olarak elde edilen 80.000’e yakın kimyasal, birbirinden farklı sektörde farklı amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Bu kimyasalların yarıya yakını (48.000) kimya

endüstrisinde olmakla birlikte; ilaç endüstrisi (6.000), kişisel bakım ürünleri (3.000), gıda ve yem katkıları (2.600) ve tarımsal ilaç (1.500) alanlarında kullanılmaktadır. Bu maddelere her yıl yaklaşık 1.000 yeni kimyasal eklendiği tahmin edilmektedir. Ayrıca sadece sayısal artışın değil kullanılan kimyasal miktarında da artışlar çok büyük oranlarda olmaktadır (Vural, 2005).

1.1.1. Pestisitler

Sabun, diş macunu ve losyon gibi kişisel bakım ürünlerinde de kullanılan (EPA, 2003) ve günümüzde, sıvı, konsantre toz, sprey ve gaz gibi birçok formülasyon türünde pazarlanmakta olan antimikrobiyal ürünlerde farklı türlerde aktif bileşenler kullanılmaktadır (EPA, 2016). Antimikrobiyal pestisitler olarak da adlandırılan bu bileşenler, cansız nesneler ve yüzeyler üzerindeki bakteri, virüs veya mantar gibi zararlı mikroorganizmaları yok etmek veya büyümelerini yavaşlatmak için kullanılan ve Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından tescil edilen maddeler veya madde karışımlarıdır. Ayrıca EPA ya göre; tarımsal ürünlerin üretiminde olumsuzluklar meydana getiren mantarlar, yabani otlar, haşereler ve kemirgenler gibi zararlılarla mücadelede kullanılan fiziksel, kimyasal ya da biyolojik ajanlar da pestisit olarak ifade edilmektedir.

Fiziksel ve biyolojik yollar ile çevreye dağılan pestisitler; gıdalarda, toprak, su ve havada bulunabilmekte ve hedef dışı canlılarda zararlı sonuçları olabilmektedir (Bohmont, 1990). Pestisitlerin dayanıklılığı, doğal şartlarda %95'inin bozunması için gereken süre baz alınarak değerlendirilmektedir. Bozunma süresi 1-12 hafta arasında olanlar orta ömürlüler, 2 yıldan daha fazla olanlar ise uzun ömürlüler sınıfına girmektedir (URL-1). Pestisitlerin meydana getirebileceği olumsuzluklar şu şekilde sıralanabilir;

- Mikroorganizmalar, omurgasızlar, arılar, kuşlar ve balıklar gibi hedef dışı canlılarda ölümlere neden olurlar.
- Balık, kuş ve diğer canlılarda üreme potansiyelini olumsuz etkilerler.
- Hedef dışı canlılarda pestisitlere karşı bağışıklık oluşmasından dolayı, insanlara hastalık taşıyan böceklerin ve parazitlerin kontrolsüz şekilde aşırı artması (Echobichon, 1996).

Pestisitler; etkiledikleri canlı türleri ve kullanım alanları gibi özelliklerine göre farklı guruplara ayrılabilirler. Pestisitler yapılarına göre organo klorlu, organo fosforlu, karbonatlı ve piretroit gurubu pestisitler olmak üzere dört ana gurupta incelenmektedir.

Organo klorlu pestisitler: Bu tür pestisitler bünyelerinde, karbon, hidrojen ve klor atomları bulundurlar. Sentetik kimyasal madde sınıfında yer alan bu maddeler son derece lipofiliktir. Ayrıca doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanması çok zor olan maddelerdir. 1940-1960 yılları arasında dünyanın birçok bölgesinde pestisit olarak kullanılmışlardır. Bu gruba triklosan, heptaklor, lindan, dikloro difenil trikloroetan (DDT), aldrin, endosulfan, toksafen ve endrin örnek olarak verilebilir. Bu kimyasalların arasında tarım sektöründe geçmişte en çok kullanılan kimyasal DDT'dir. Yağlı besinlerin, bu maddelerin lipofilik özelliklerinden dolayı emilim oranını arttırdığı bilinmektedir. Aldrin, dieldrin, metoksiklor ve DDT gibi insektisit deneylerinde kullanılan hayvanlarda bu maddelerin hepatik dolaşıma girdiği belirlenmiştir (Özyurt ve Erkekoğlu, 2016). Bu pestisitlerden bazıları çevreye verdikleri zararlar sebebiyle kullanılmaları yasaklanmıştır. Organik klorlu pestisitler, solunum ve temas yolu ile de etki gösterebilmektedir (URL-2).

Organo fosforlu pestisitler: Etken maddelerinin içinde fosfor atomu olan bu pestisitlere klorpirifos, diazinon, malathion, triklorfon, parathion örnek olarak gösterilebilir. Bu grup içerisinde yüzden fazla sayıda etken madde vardır. Organik fosforlu pestisitler, sindirim, temas ve solunum yoluyla etki gösterebilmektedir (URL-2). Organofosforlu pestisitler, organoklorlu pestisitlere kıyasla yağda daha düşük oranda birikim göstermesinden ve doğada parçalanması nispeten daha kolay olmasından dolayı insektisit olarak organo klorlu pestisitler yerine kullanılmaya başlanmıştır. Ek olarak sentezlenmelerinin de kolay oluşu bu grubun büyümesi ve çeşitlenmesine de neden olmuştur (Akan, 2012).

Karbamatlı pestisitler: Karbamik asit esterleridirler. Aldicarb, methiocarb, methomyl, oxamyl, pirimicarb bu grubun üyeleridir (URL-2).

Piretroit gurubu pestisitler: Piretrinlerin sentetik analogları olan bu pestisitler dayanıklılıkları artırılmış bileşiklerdir. Cyfluthrin, bifenthrin, deltamethrin ve permethrin bu guruba örnek olarak verilebilir. Sinir hücrelerini bloke ederek zehir etkisi göstermektedirler. Sıcakkanlı canlılara karşı zehir etkisi düşüktür. Memeli vücudunda birikim oluşturmaz ve doğada kolay parçalanırlar (URL-2).

1.1.2. Dezenfektanlar

Cansız ortamdaki bakteri endosporları dışında kalan patojen mikroorganizmaların öldürülmesi ve yeni mikroorganizmaların üremesinin engellenmesi için kullanılan kimyasal maddelere dezenfektan denir. İyi bir dezenfektan; suda çözünmeli, ıslatıcılığı iyi olmalı, kısa sürede etki etmeli, toksisitesi az olmalı, allerjenik ve kanserojen etki göstermemeli, kokusu kötü olmamalı, in vivo ve in vitro etki mekanizmaları bilinmeli ve pahalı olmamalı ve etkili olmalıdır (URL-3; Kılıçturgay vd., 1996). Dezenfektanlar, mikroorganizmaları öldürme veya etkisiz hale getirme gibi özelliklere sahip olmalıdır. Bu nedenle dezenfektanların kullanım aşamasındaki önemli bir adım, dezenfektanın gerekli düzeyde biyosidal aktiviteye sahip olmasıdır. Denemelerde temas süresi ve gerekli konsantrasyon gibi iki temel kriterle ilgili verilerin sağlanması gerekir. Bu veriler hem titiz hem de tekrarlanabilir testlere dayanmalıdır (Sandle, 2020). Çalışmamızda da kullanılan antimikrobiyal pestisitlerin içerisinde yer alan dezenfektanlar günlük hayatta önemli yere sahiptirler ve farklı özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar.

1.1.2.1. Etki Mekanizmalarına Göre Dezenfektanlar

1.1.2.1.1. Hücre Zarına Etkili Dezenfektanlar

Hücre zarını etkileyen dezenfektanlar hücre sitoplazma zarının yapısını değiştirerek hücrenin enerji metabolizmasında değişikliklere neden olmaktadır (Kanra ve Ceyhun, 1985).

Yüzey Aktif Dezenfektanlar: Yüzey aktif dezenfektanlar iyonlaşma özelliklerine göre üç grup altında incelenir. Benzalkonium klorür katyonik guruba, sabunlar ve yağ asitleri anyonik guruba örnek olarak verilebilir. Noniyonik grupta bulunan aktif maddeler ise dezenfektan değil mekanik temizleyicilerdir (Kanra ve Ceyhun, 1985).

Fenoller: Fenoller hücre zarını parçalayarak hücre yapısının dışarı çıkmasına neden olurlar. Ayrıca hücre proteinlerini denatüre ederler. Günümüzde daha az toksik olan alkil ve klor türevleri fenolün yerini almıştır. Alkil ve klor türevleri insanlar için daha az toksik, dezenfektan etkileri ise daha yüksektir. Fenolün alkil türevine krezol; klorlu türevine ise heksaklorofen örnek olarak verilebilir (Kanra ve Ceyhun, 1985).

Organik Çözücüler: En çok kullanılan organik çözücü alkol olup (Töreci, 1990); eter ve kloroform da bu guruba dahildir. Dezenfeksiyon amacıyla alkol kullanımında %70'lik konsantrasyon yeterlidir. Alkol, proteinlerin yapısını bozarak primer hale dönüştürür. Sporlu bakterilere ise etki etmemektedir.

1.1.2.1.2. Hücre Proteinlerini Denatüre Eden Dezenfektanlar

Proteinlerin yapısını bozan dezenfektanlar, proteinlerin primer hale gelemesini sağlayarak rastgele şekil almalarına neden olmaktadır. Böylece bakterisit etki gösterirler. Bu grupta yer alan dezenfektanlar, alkaliler, asitler, alkoller ve diğer organik çözücü maddelerdir. Yine hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, borik asit ve propiyonik asit bu guruba dâhil olan asitler arasındadır (Töreci, 1990).

1.1.2.1.3. Mikroorganizma Enzimlerinin İşlevlerini Bozan Dezenfektanlar

Ağır Metal Tuzları: Cıva, gümüş ve bakır gibi ağır metallerin tuzları, enzimlerin sülfidril gurupları ile birleşmeleri sonucunda etkin hal almaktadırlar. Cerrahi antiseptik olarak kullanılan merthiolate ile cıva krom aynı zamanda deri dezenfektanı olarak da kullanılmaktadır. %1'lik Gümüş nitrat çözeltisi de yeni doğan bebeklerde göz antiseptiği olarak kullanılması gibi çeşitli alanlarda kullanılırlar (Bilgehan, 1989).

Okside Ediciler: Oksitleyici etkileriyle kirleticilerin enzim aktivitesini bozan maddeler arasında ozon, hidrojen peroksit potasyum permanganat ile kuvvetli oksitleyici etkileri olan halojenlerden klor ve klor vericiler, brom ve iyot bileşikleri bu gruptaki dezenfektanlardır. Bunların arasında klor ve ozon, suların patojen mikroorganizmalardan arındırılması amacıyla kullanılmaktadırlar (Bilgehan, 1989).

Alkilleyiciler: Bu grupta yer alan formaldehit, yüksek konsantrasyonlarda çoğu mikroorganizma için öldürücüdür. Ölü dokularda meydana gelebilecek bozulmaları belli bir süre engellemek veya yavaşlatmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Polietilen ve etilen oksit ise araçların sterilizasyonu için kullanılmaktadır.

Nükleik Asit Üzerine Etkili Olanlar: Kristal viyole, malahit yeşili, brillant yeşili, fuksin, metilen mavisi ve akridin gibi mikrobiyolojide kullanılan boyalar bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu boyalar bileşik oluşturdıkları nükleik asitlerin aktivitelerini bozarak

dezenfeksiyon etkisi oluşturmaktadırlar. Metilen mavisi ve akrinin boyaları, mukozanın dezenfeksiyonunda da kullanılmaktadırlar (Bilgehan, 1989).

1.1.2.2. Etki Düzeylerine Göre Dezenfektanlar

Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar: Sporların pek çoğu dahil tüm mikroorganizmaları 20 dakikadan daha az bir sürede öldüren dezenfektanlar bu guruba girer. 10 saate kadar varabilen uzun uygulama süresi sonrası bakteri sporlarını öldürebildikleri için, yüksek seviyeli dezenfektanlar olarak değerlendirilir. Bu guruba hidrojen peroksit (%6), formaldehit (%3-8), sodyum hipoklorit (1000 ppm serbest klor), glutaraldehit (%2) ve perasetik asit (%1'in altında) gibi dezenfektan maddeler ve konsantrasyonları örnek verilebilir (Denyer vd., 2004; Tünger vd., 2005.)

Orta Seviyeli Dezenfektanlar: Bazı virüsler ve funguslar üzerinde etkili olmayan, sporları öldürme etkisi çok az olan ancak *Mycobacterium tuberculosis* dâhil tüm vejetatif bakterileri öldürebilen dezenfektanlar bu grupta yer alır. Örnek olarak etil veya izopropil alkol (%60-90), fenol ve fenol bileşikleri (%0,4-5) ve iyodoforlar (30-50 ppm serbest iyot) dezenfektan ve konsantrasyonları bu grupta bulunurlar (Denyer vd., 2004).

Düşük Seviyeli Dezenfektanlar: Vejetatif bakterilerin birçoğunu, bazı fungusları ve uygun bir sürede (≤ 10 dakika) bazı virüsleri öldürebilen dezenfektanlardır. Etil veya izopropil alkol ($< \%50$), fenol ve fenol bileşikleri (%0.4-5), iyodoforlar (30-50 ppm serbest iyot) ve sodyum hipoklorit (100 ppm serbest klor) bu guruba örnek verilir. (Tünger vd., 2005). Düşük seviyeli dezenfektanlar bakteri sporları ve tüberküloz basiline karşı etkili değildir.

1.1.2.3. Dezenfektanların Aktivitesini Etkileyen Etmenler

Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerindeki aktivitesini etkileyen çeşitli etmenler vardır:

Yoğunluk: Dezenfektanların optimal yoğunluğu vardır. Yoğunluk ile doğru orantılı olarak artan antiseptik etkisi en uygun değere ulaştıktan sonra etkide daha artış olmaz. Temas süresi, malzeme uyumluluğu ve biyosidal aktivite gibi faktörler konsantrasyon aralığının ayarlanmasında etkindir. Bir dezenfektanın seyreltme ve biyosidal aktivitesi arasındaki ilişki ne kadar yüksek olursa, hücreleri öldürmek o kadar uzun sürer. Etiketinde yazan

kullanımından daha düşük konsantrasyonların o kadar etkili olmadığı gösterilmiştir. Örneğin, belirli bir konsantrasyon katsayısına sahip bir dezenfektan iki kat seyreltilirse, hücreleri öldürmesi için gereken süre nispeten iki katına çıkabilir. Dezenfektanların etkisi konsantrasyona göre değişebilir ve örneğin bakterisidal (bakteri öldürücü) dezenfektanlar aşırı seyreltildiğinde bakteriyostatik (bakteri büyümesini durdurma) hale gelebilir. Kısaca birçok kimyasal madde yüksek yoğunluklarda mikroorganizmalar için öldürücü etki gösterirken, düşük yoğunluklarda mikroorganizmaların çoğalmalarını engelleyici etki gösterir. Bu da potansiyel olarak patojenlerin hayatta kalmasına ve sayılarının artmasına izin verebilir (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Denyer vd., 2004; Tünger vd., 2005; Sandle, 2020).

Etki Süresi: Antimikrobiyallerin mikroorganizmalar üzerinde etkili olabilmesi için mikroorganizmaların belirli bir süre boyunca bu kimyasallara maruz kalması gerekir. Bu süre; ortamdaki nem'e, ısıya, antimikrobiyal maddenin yapısına, mikroorganizma türüne ve sayısına, bağlıdır (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Tünger vd., 2005). Isı seviyesi arttıkça maddenin solüsyondaki iyonizasyon miktarı yani kimyasalın etkisi de artar (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Denyer vd., 2004; Tünger vd., 2005).

pH: Her dezenfektan için optimal pH değeri vardır. Ortamın pH derecesi optimal değerden uzaklaştıkça mikroorganizmaların dezenfektana olan dirençleri azaldığından dezenfektanın da etkisi artar (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Denyer vd., 2004; Tünger vd., 2005).

Ortamda Bulunan Organik Maddeler: Kan, serum, mukus, dışkı, doku artıkları vb. gibi mikroorganizmaların etrafını saran maddeler, dezenfektan madde ile teması engelledikleri ve ayrıca çoğu kimyasal maddenin yapısını da bozduklarından, özellikle proteinlerin parçalanması yolu ile etkili olan dezenfektanların etkilerinin azalmasına yol açarlar (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Denyer vd., 2004; Tünger vd., 2005).

Antagonistik Etki Gösteren Kimyasallar: Ortamda bulunabilecek başka kimyasal maddeler dezenfektanla etkileşime girerek dezenfektanın etkisini ortadan kaldırabilirler. Örneğin demir klorür ve karbon, fenolün etkisini giderir (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002).

Yüzey Gerilimini Azaltıcı Maddelerin Varlığı: Dezenfektanın ıslatma ve yayılma yeteneğini arttıran bu maddeler dezenfektanın mikroorganizmalarla daha kolay ve doğrudan ilişki kurmasını sağlar (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002).

Ortamın Ozmotik Basıncının Yüksek Olması: Ortam ozmotik basıncı yüksekliği nedeniyle mikroorganizmalar suyunu kaybedeceğinden dezenfektana olan dirençleri artar (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002).

Mikroorganizmalara Bağlı Etmenler: Dezenfektanlar, mikroorganizmaların, türüne, cinsine, yaşam evresine ve miktarına göre farklı etkiler gösterebilmektedir. Aynı türe ait mikroorganizmalar bir dezenfektana aynı derecede duyarlı olmayabilirler. Mikrobiyal toplulukta dezenfektanlara çok duyarlı mikroorganizmalar olabileceği gibi dezenfektanların etki edemediği dirençli mutant suşlar da bulunabilir (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002; Tünger vd., 2005).

Ağır Metallerin Oligodinamik Etkisi: Gümüş, bakır, altın gibi ağır metaller bulundukları ortamlarda mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyici ya da öldürücü etki yapabilmektedirler. Bu etki metallerin ortama yayılan iyonlarının etkisi ile olmaktadır (Kılıçturgay vd., 1996; Bilgehan, 2002).

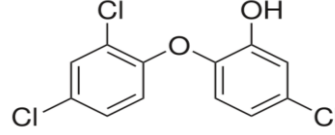
1.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

Triklosan (TRC), kloroksilenol (PCMX), metilizotiazolinon (MIT) ve boraks (BRX) tüketici ürünlerinde antibakteriyel ve deodorant etkisi olarak yaygın olarak kullanılan kimyasallardır. El sabunlarında kullanılan bu kimyasallar, kanalizasyon sistemi ile karıştığı sucul ortamı etkilemektedir. Bozunmaya karşı dirençli olan bu kimyasalların varlığı hemen hemen bütün atık su karışan akarsularda tespit edilmiştir (Bedoux vd., 2012; Carey ve McNamara, 2015; Saleh vd., 2011). Ayrıca bu kimyasalların antibiyotik direncinin yaygınlaşmasına sebep olabilecekleri de belirtilmiştir (Carey ve McNamara, 2015; Saleh vd., 2011). Özellikle COVID-19 salgını sürecinde dezenfektanların kullanımı ve dolayısıyla çevresel açıdan taşıdığı risklerin önemi daha da artmıştır (Hora vd., 2020; Zheng vd., 2020).

1.2.1. Triklosan (TRC): Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları

İlk olarak 1966 yılında sentetik olarak laboratuvar ortamında üretilen TRC (2, 4, 4'-trichloro-2,2'-hydroxy-diphenyl ether; $C_{12}H_7Cl_3O_2$), noniyonik, yağda çözünen, beyazımtırak, kristalize, tatsız ve kokusuz bir antimikrobiyal maddedir (Şekil 1). Molekül ağırlığı 289,536 g mol⁻¹ olan TRC'nin erime sıcaklığı 57±1°C ve kaynama sıcaklığı da 120°C'dir (Glaser, 2004). Avrupa'da 1960'lı yılların sonlarından beri kişisel bakım ürünlerinde, 1980'den sonra

ise ağız bakım ürünlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Avrupa Topluluğu Kozmetik Yönergesi kozmetik ürünler içerisine 1989 yılından itibaren %3 seviyesine kadar TRC katılmasına müsaade etmektedir. 1990'ların ortalarından itibaren Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nın izniyle Amerika Birleşik Devletleri'nde de kullanılmaya başlanmıştır (Glaser, 2004; Rodricks vd., 2010).



Şekil 1. Triklosan'ın (TRC) Moleküler Yapısı

TRC, bakteri RNA'sını, sitoplazmik zarı, yağ asidi ve protein sentezini olumsuz etkileyerek antimikrobiyal etki göstermektedir (Bhargava ve Leonard, 1996; Şenel vd., 2016). Lipid sentezini, mikroorganizmaya ait Enoyl-Acyl redüktaz enzimini bloke ederek engellemekte ve maruz bırakılan mikroorganizmanın gelişmesini ve bölünerek çoğalmasını bu şekilde engellemektedir (Fan vd., 2002; McMurry vd., 1998; Levy vd., 1999). Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarına zarar veren TRC gram pozitif bakterilere karşı daha etkilidir. Yüksek dozları bakterisidal etkiye sahip olan TRC'nin düşük dozları ise kısa süreli ve orta derecede bakteriyostatik etki göstermektedir. Bu etki ancak uzun süreli maruziyet ile oluşabilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* türlerine, bakteri sporlarına ve virüslere karşı etkisi düşük olan TRC'nin %1'lik konsantrasyonları metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı etkilidir. Mayalara karşı yüksek, *Aspergillus* gibi küf mantarlarına karşı ise düşük etkinliğe sahiptir (Fang vd., 2010; Albay, 2005). Memeliler üzerinde ise toksik etkisi olmadığı kabul edilmektedir (Bhargava ve Leonard, 1996).

40 yıldan fazladır yaygın olarak kullanılan TRC, günlük hayatta; kozmetik ürünler, deodorantlar, kişisel bakım ürünleri, sabunlar, diş macunları, mutfak eşyaları, temizlik bezleri, ilkyardım malzemeleri, bilgisayar donanımları, giysiler, el jelleri, yatak pedleri ve oyuncakları gibi birçok ürünün yapısına, bakterileri yok etme amacıyla katılmaktadır (Glaser, 2004; Perencevich vd., 2001). Bir miktar antiviral ve antifungal aktiviteye sahip olan TRC aynı zamanda fenoksifenol sınıfı antimikrobiyaldir (Bhargava ve Leonard, 1996). TRC, kullanıldığı cilt veya herhangi başka bir yüzey üzerinde temizleme işlemi sonrası kalabilmekte ve uzun süreli antimikrobiyal etki sağlamaktadır. Örneğin TRC içeren bir ürünle

el yıkama sonrası mikroplara karşı uzun süreli koruma sağlanmış olur. Ancak normal bir sabunla yıkama sonrası ciltteki mikrop miktarında kısa süreliğine bir azalma olsa da herhangi bir temas sonrası mikroplar tekrar cilde taşınır.

2006 yılı verilerine göre yılda yaklaşık 450 ton olan TRC tüketiminin %85'inin kişisel bakım ürünlerinde, %10'unun plastiklerde ve gıdalarla temas eden ürünlerde, %5'inin ise tekstil ürünlerinde kullanıldığı belirtilmektedir (European Commission, 2009). FDA ise tezgâh üstü ilaç olarak değerlendirdiği TRC'nin el sabunları, diş macunları, çamaşır deterjanları, yumuşatıcılar, yaralar için antiseptikler ve tıbbi aletlerde kullanımına izin vermiştir. Ancak FDA tarafından, 6 Eylül 2016'da TRC'nin sabun ve buna benzer ürünlerden çıkarılması kararı alınmıştır (Fang vd., 2010; Ruszkiewicz vd., 2017).

Yaygın kullanıma sahip TRC, kanalizasyon sularına karışarak ulaştığı ortamlarda çevresel kirliliğe neden olmaktadır. Bu durum içme suyu, yüzey suyu ve atık su gibi sucul ekosistemlerin kontaminasyonu ile sonuçlanmakta (Fang vd., 2010) ve özellikle sucul organizmaların yaşaması için önemli ortamlardan olan sulak alanlardaki su kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Halden, 2014). Su, atık su, toprak ve sediment içerisinde TRC varlığı tespit edilmiştir (Bedoux vd., 2012; Mavri vd., 2012). Lipofilik olan bu kimyasal, kalıcı çevresel kirleticidir. Bu nedenle yüksek bir biyobirikim riski oluşturmaktadır. Özellikle evsel atık suların mansabındaki sucul ortamda bulunan sucul organizmalar üzerinde toksik etkiler göstermektedir (Brausch ve Rand, 2011). TRC'nin varlığı, birçok balık türünde ve yüzey sularında tespit edilmiştir (Benotti vd., 2009; Dougherty vd., 2010). Birden fazla bakteri türünde TRC'ye karşı antibiyotik direnci bulunduğu dair laboratuvar kanıtları elde edilmiştir. (Aiello vd., 2004, 2005). Ancak çevresel ortamda antibiyotik direnci oluşmasının sebebinin TRC içerikli sabun kullanımının artışı ile ilişkili olup olmadığına dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. TRC'nin, çevresel etkilerinden dolayı sabunlardan ve diğer ürünlerden kademeli olarak kaldırılması (Fang vd., 2010) sonrasında daha güvenli alternatifler olarak kabul edilen Kloroksilenol (PCMX) ve farklı sentetik bileşikler kullanılmaya başlanmıştır (Sreevidya vd., 2018).

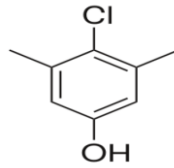
1.2.2. Kloroksilenol (PCMX): Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları

Kloroksilenol (4-chloro-3,5-dimethylphenol; C_8H_9ClO), parachlorometaxylenol (PCMX) olarak da adlandırılan, fenol içeren ve benzen (C_6H_6) halkasına ikame edilmiş bir klorlu ksilenol maddedir (Şekil 2). Hidrofobik ölçüm katsayısı [log oktanol-su dağılım

katsayısı (KOW)] 3,3 olan kloroksilenol orta derecede hidrofobiktir (USEPA, 2019a). İlk olarak Avrupa'da 1920'lerin sonlarında geliştirilen kloroksilenol, ABD'de 1950'lerden beri kullanılmaktadır (Larson vd., 1986).

PCMX, proteinleri denatüre etmesi ve hücre duvarının yapısını değiştirerek bakteri enzimlerini inaktive etmesiyle bakterileri, algleri ve mantarları hedef alan topikal bir antiseptik olarak uzun süredir kullanılmaktadır (USEPA, 1994). Gram-pozitif bakterilere karşı etkisi yüksek; gram-negatif bakterilere, mantarlara ve bazı virüslere karşı ise etkisi nispeten düşüktür. Etilendiamintetraasetik asitin (EDTA) *Pseudomonas* türlerinin hücre duvarındaki metal iyonlarına bağlanması nedeniyle, PCMX'in özellikle gram-negatif olan *Pseudomonas* türlerine ve diğer patojenlere karşı etkinliği, EDTA ilavesiyle artırılabilir. PCMX antibakteriyel etkinin yanında mantar, alg ve virüslere karşı da etkilidir. Singapur'daki Ulusal Çevre Ajansı (NEA)'nın hazırladığı listeye göre, yeni bir koronavirüs türü olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu küresel salgın nedeniyle birçok kozmetik ve ev kimyasalının yapısına, virüse karşı etkili aktif madde olarak %0,12 konsantrasyonda PCMX katılmıştır ((URL-4); Ijaz vd.,2020; Neerukonda ve Katneni, 2020; Wu vd., 2020).

PCMX'in antimikrobiyal etkisi orta düzeydedir, birkaç saat boyunca kalıcılığını sürdürür ve aktivitesi ortamdaki organik madde varlığından çok az etkilenir. PCMX bazik ortamda aktiftir ancak noniyonik yüzey aktif maddeler tarafından nötralize edilir (Larson, 1988). Kloroksilenolün sudaki kimyasal parçalanması ise diğer fenol türevlerine göre daha yavaş gerçekleşmektedir (Pauli ve Franke, 1983).



Şekil 2. Kloroksilenol (PCMX) 'un Moleküler Yapısı

PCMX, antimikrobiyal madde olarak, boyalarda, yapıştırıcı maddelerde, emülsiyonlarda, ve yıkama tanklarında bakteri, alg ve mantarları kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. Antibakteriyel sıvı sabunlar, ev antiseptikleri, merhemler, kremler ve ilaçlı vazelinlerde ise daha yaygın kullanılmaktadır (Bruch, 1996; Aly ve Malbach, 1988). PCMX'in toksisitesi, etkilediği türe ve test koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Tatlı su

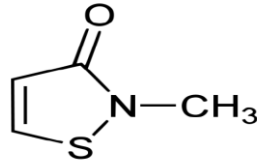
balıkları PCMX'e çok duyarlıyken, sucul omurgasızlar orta derecede etkilenmektedir (EPA, 1994). PCMX deriden emilerek bazı alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir (URL-5). PCMX cildi ve gözü tahriş edebilir ve tekrarlayan oral ve dermal maruziyet sonrasında kan hücrelerini de etkileyebilmektedir (Guess ve Bruch, 1986). Biyolojik olarak parçalanabilen PCMX'in biyobirikim yaptığı tespit edilememiştir (Saarikoski ve Viluksela, 1982; USEPA, 2019b).

PCMX'in çevreye olan zararlı etkisi, atık su arıtma tesislerinden, ozonlama, ultraviyole ışınlama ve termal olarak aktifleştirilmiş persülfatın kullanıldığı ileri bir oksidasyon süreci de dâhil olmak üzere birçok yaygın fizikokimyasal yöntemlerin kullanımıyla elimine edilebilmektedir. (Wu vd., 2020; Li vd., 2020; Sun vd., 2019). Bu yöntemlerin verimliliğine rağmen maliyet, çok sayıda kimyasal çözücü kullanımı ve zararlı yan ürünlerin oluşumu gibi bazı dezavantajlarından dolayı, ucuz ve doğal olan biyolojik yöntemler PCMX dönüşümünde de kullanılabilir (Caraccilo vd., 2015). PCMX'in kloroksilenolun genotoksik ve karsinojenik etkileri konusundaki veriler ise yetersiz düzeydedir (Yost vd., 2016).

1.2.3. Metiloizotiazolinon (MIT): Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları

Bir biyosit olan metiloizotiazolinon (MIT; 2-methyl-4-isothiazolinone-3-one; C_4H_5NOS) (Şekil 3) birçok üründe kullanılmaktadır (Collier vd., 1990). 1970'lerden beri kullanılan (MIT), bakteri, virüs ve protozoanların büyümelerini yavaşlatır; mantarların da büyüme ve üreme kabiliyetlerini kısıtlayarak antifungal etki gösterir (URL-6; de Groot ve Herxheimer, 1989; Menne ve Hospital, 1999). 1980'lerden itibaren çeşitli endüstriyel uygulamalarda, kozmetik, tuvalet malzemeleri gibi ürünlerde gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile mantarlar ve mayalara karşı koruyucu olarak kullanılmıştır (Menne ve Hospital, 1999). Yine 1980'lerden itibaren MIT ve klorometilizotiazolinon (CMIT) karışımı olan ve Kathon CG olarak isimlendirilen ticari ürün Avrupa ve Amerika'da dermatit vakalarında artışlara sebebiyet vermiştir (de Groot ve Herxheimer, 1989; Castaneda ve Tardana, 2013). Ayrıca Kathon CG' nin maksimum dozu, alerjik reaksiyonlara sebep olduğu için kullanımı kısıtlanmıştır (Schwensen vd., 2017; Urwin ve Wilkinson, 2013; Gameiro vd., 2014). Avrupa Komisyonu, vücutta ve saçta belli bir süre bekletilen kozmetik ürünlerinde MIT kullanımını 2017 yılında yasaklamış ve 2018'de ise durulanan vücut bakım ürünlerinde MIT kullanımını 15 ppm ile sınırlandırmıştır (Schwensen ve Johansen, 2020). MIT'e kronik

olarak maruz kalma sinir sistemine zarar verebilir, DNA hasarına neden olabilir ve enzim aktivitesini etkileyebilir (Du vd., 2002). Kanalizasyon arıtma tesislerinde yaşayan yararlı mikroorganizmalar için MIT gibi biyositlerin yüksek konsantrasyonları tehlikeli olabilmektedir (Rafoth vd., 2007).



Şekil 3. Metilozotiazolinon (MIT)'un Moleküler Yapısı

MIT günümüzde; el, yüz ve vücut losyon ve kremleri, nemlendiriciler, bronzlaştırıcı losyonlar, şampuanlar (Uter vd., 2014; Le Hoa vd., 2019), bazı durulama ürünleri, deterjanlar (Yazar vd., 2011), oda spreyleri (Park ve Kwon, 2016), tuvalet kağıtları, ıslak mendiller (Gardner vd., 2010; Chang ve Nakrani, 2014) gibi ürünlerde yaygın olarak kullanılan ev tipi bir biyosit ve koruyucudur (Du vd., 2002; Collier vd., 1990). Bununla birlikte; metal işleme sıvıları (Aerts vd., 2017; Geier ve Lessmann, 2020), su ve yağ bazlı duvar boyaları, ahşap koruyucular (Goodier vd. 2018; Wang vd., 2020) ve gıda paketlenmesinde kullanılan kağıtlar gibi ürünlerde (Lin vd., 2010), soğutma suyu sistemleri, yakıt depolama tankları, kağıt hamuru ve kağıt fabrikası ve petrol çıkarma gibi sistemlerde de endüstriyel bir biyosit olarak kullanılmaktadır (USEPA, 1998). Bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan farklı agar ortamlarında kullanılan bitki koruma karışımında %0,05-%0,1 oranlarında MIT ve CMIT bulunmaktadır (Niedz, 1998). CMIT, BIT ve MIT *Escherichia coli* ve *Schizosaccharomyces pombe* üzerinde de biyosidal etki gösterir (Collier vd., 1990). Ayrıca sucul sistemlerde mantarları, balçık oluşturan bakterileri ve algleri kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok üründe yaygın olarak kullanılan izotiazolinonlar, atık sularda ve yüzey sularında sıklıkla tespit edilmektedir (Voulvoulis vd., 2002; Bollmann vd., 2017; Li, 2019).

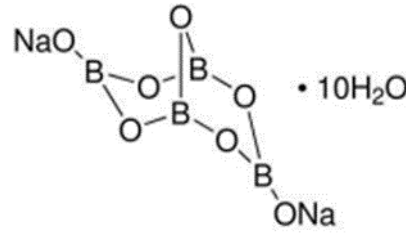
1.2.4. Boraks (BRX): Etki Mekanizması ve Kullanım Alanları

Bor, periyodik cetvelde “B” simgesiyle temsil edilen, atom ağırlığı 10,81, atom numarası 5, yoğunluğu $2,84 \text{ g cm}^{-3}$, ergime noktası 2190°C ve kaynama noktası 2.550°C olan, yarı iletken bir elementtir. Boraks (BRX) ise su, oksijen, sodyum ve bordan meydana gelen ve sodyum borat olarak da bilinen bir bileşiktir. BRX’in kimyasal formülü $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Şekil 4) olarak yazılır ve sularda sodyum borat veya borik asit (H_3BO_3) olarak bulunur (Staff, 2008). BRX çevrede doğal olarak oluşan ve düşük konsantrasyonlarda bulunan bir kimyasaldır (EPA, 1998).

Bitkilerin beslenme fonksiyonlarında hayati öneme sahip bir madde olan bor, hayvanların büyüme ve gelişiminde de rol oynar. Bununla birlikte bitkilerin hayat döngüsündeki rolü bilinen borun, hayvan hücrelerindeki fonksiyonları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Antiseptik ve antifungal etkisiyle mantar oluşumunu önleyen ve bu sayede koku gideren ve küflenmeyi önleyen doğal bir dezenfektan olan BRX, 1950 yılından sonra gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır (Hildebrand, 1982). Boraks, mikroorganizmaların fosfat metabolizmalarında rol alan enzimleri engelleyerek etkisini göstermektedir. Streptokok ve stafilokoklara karşı düşük bakteriyostatik etki gösterir. Vücutta kısa sürede emilen fakat dışarı atılması uzun sürede gerçekleşen BRX’in köpeklerde düşük dozlarda zehir etkisi yaptığı saptanmıştır. Günümüzde gıdalara koruyucu madde olarak ilave edilmemesinin sebebi de bu zehirlilik etkisidir. Buna rağmen havyar üreten bazı ülkelerde BRX 4 g kg^{-1} miktarında kullanımına izin verilmektedir (URL-7).

İnsan kanında $15,3\text{-}79,5 \text{ ng ml}^{-1}$ oranında bulunan borun %98,4’ü borik asit şeklinde, %1,6’sı ise borat anyonu şeklindedir (Devirian, 2003). BRX’in toksisitesi nedeniyle, epilepsi nöbet bozuklukları, sinirlilik ve gastrointestinal rahatsızlıklar görülebilir. En sık görülen bulgular arasında beyin ve beyin zarında gözlenen ödem ve konjesyon olup, karaciğer büyümesi, damar tıkanıklığı, vücut yağı değişimi, şişkinlik ve hücrelerde fazla miktarda su birikimi de görülmektedir (Linden vd., 1986; Litovitz vd., 1988; Penland, 1994). Borik asit, boraks, üleksit ve kolemanit gibi bor bileşiklerinin insan kanında herhangi bir DNA hasarı yapmadan antioksidan enzim aktivitesini değiştirdiği görülmüştür (Türkez vd., 2007).

Balık gibi suda yaşayan organizmalar sudaki BRX varlığına karşı çok hassastır (Schoderboeck vd., 2011). Sudaki organizmalar için toksik olan BRX’ın toksik konsantrasyonu, türe ve test koşullarına bağlı olarak geniş bir aralıkta değişim göstermektedir (Loewengart, 2001; Schoderboeck vd., 2011).



Şekil 4. Boraks (BRX)'ın Moleküler Yapısı

BRX kaynak işlerinde eritici ve pas önleyici olarak, lehimleme işleminde, çamaşır ağartmasında, suyun sertliğini gidermede, sabun ve deterjan içeriklerinde, fotoğrafçılık, matbaacılık, porselen mineleme, cam elyaflarında, kırılmaz borosilikat cam üretimi, tekstil boyaları, kâğıt sanayi, nükleer alan, savunma sanayii ve jet-roket yakıtlarında kullanılmaktadır. BRX'in antifiriz ve herbisit olarak da kullanımı mevcuttur (Hildebrand, 1982). Ayrıca, yalıtım malzemelerinde yaygın kullanan borik asit, boraks ve diğer bor içeren bileşiklerin kullanımının yanı sıra, yanma olaylarında alevlenmeyi geciktirici olarak da kullanılmaktadırlar (Pleus vd., 2018). Yaygın kullanımı nedeniyle çevresel bir kirletici haline gelmesine rağmen birçok canlı organizma için çok önemli bir besin maddesidir (Topal vd., 2016).

1.3. Toksisite Çalışmaları

Günlük hayatta kullanılan kimyasal maddelerin toksisitesi üzerine yapılmış çalışmalar canlılar üzerindeki toksik etkilerinin ve toksik etkilerinin görülmeyeceği dozlarının belirlenmesi, toksik maddelerin zararlı etkilerinin, atıkların ve alıcı ortamların izlenmesi, besin zincirinin üst seviyesindeki canlıların korunması, toksik maddelerin canlılar üzerindeki uyarıcı etkilerinin, biyolojik birikimlerinin tespit edilmesi ve balıklarda üreme biyolojisine etkilerinin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001; Kocabaş vd., 2022; 2021; Kocabaş Kutluyer vd., 2022a,b, 2018a,b; Akça vd., 2021). Bu çalışmalarda; yüzme kabiliyeti, üreme, organ aktiviteleri, ölüm ve histolojik-biyokimyasal değişiklikler incelenmektedir. Denemelerde tek bir kirletici kimyasal kullanılabileceği gibi birden fazla madde içeren karışımlar da kullanılabilmektedir (Laufer ve Nation, 1999). Bu çalışmalarda kimyasala uzun süreli maruz kalma durumuna bağlı toksik etkilerin tespiti için deneyin yapıldığı süre içerisinde tüm gruplar aynı özellikteki maddelere aynı ortam şartları altında maruz bırakılmaları

gerekmektedir (Altinok vd., 2011). Ayrıca toksik etki oluşturduğu bilinen kimyasal maddenin, pozitif kontrol gurubunda denenmesi ve deneyin sağlıklı şekilde işlediğinin test edilmesi de gerekmektedir (Saygı vd., 1991). Toksik madde dışındaki faktörlerin etkilerinin belirlenmesi amacıyla testlerde kontrol gurubu da olmalıdır. Toksik maddenin çözündürülmesi için kullanılacak çözücü maddelerin muhtemel toksik etkileri de dikkate alınmalıdır (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altinok, 2004).

Toksisite testleri; süresi, ortam, toksik madde ilavesi ve amaçlarına göre farklı kategorilere ayrılabilir. Sürelerine göre testler, akut ve kronik olmak üzere iki guruba ayrılmaktadır. 24, 48, 72 ve 96 saat süren testler akut toksikolojik testlerdir. Kronik testler ise genellikle bir hafta ile bir ay arasında sürer fakat daha uzun süre de uygulanabilmektedir. Kronik testlerde genellikle farklı dozdaki toksik maddenin deney organizmalarının üreme ve gelişimlerine etkileri incelenmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Antimikrobiyal kimyasalların yaygın kullanımı nedeniyle bu kirleticilerin balıklar üzerindeki hücresel ve moleküler etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu kimyasalların insan üzerindeki etkilerine odaklanan yeterli sayıda toksikolojik çalışma olmasına rağmen sucul ekosistemler üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır (Levy, 2002; Pirard vd., 2012).

Sucul ortam toksisite çalışmaları deney ortamına toksik madde ilave edilme yöntemine göre; statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olmak üzere üç guruba ayrılmaktadır. Statik testlerde deney organizmaları deney ortamına bırakıldıktan sonra çalışma boyunca herhangi bir değişiklik yapılmamaktadır. Metabolik atıkların su kalitesinde meydana getireceği olumsuzlukları minimize etmek için, 96 saat ve altındaki sürelerde uygulanmaktadır. Yarı statik testlerde ise deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenmektedir. Ortam yenilenmesinin sıklığı kullanılan toksik madde ve deney organizması türüne göre değişiklik göstermektedir. Yarı statik testlerde uygulanan ortam yenilemesi sayesinde metabolizma atıkları ve diğer etkenlerin su kalitesi üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kalkmaktadır. Sürekli akış sistemli denemelerde su giriş ve çıkışının ortamı sürekli yenilemesi sayesinde metabolik atıkların su kalitesine etkisi olmamaktadır. Sürekli akış sistemli ortamlar doğal şartların en iyi şekilde temsil edildiği ortamlar olup, genellikle kısa süreli toksik deneyler için tercih edilmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

1.3.1. Toksisite Çalışmalarda Deney Organizmalarının Seçimi

Test tipi ve test organizmasının uygunluğu, toksikolojik testlerden doğru sonuçlar elde etmek için çok önemlidir (Rand, 1995). Deney organizması olarak ekosistemi temsil eden, ekolojik ve ekonomik öneme sahip, temini kolay, sayı olarak yeterli, uygun büyüklükte, laboratuvar çalışmalarına adaptasyon kabiliyeti yüksek ve kültürü yapılabilen organizmalar tercih edilmelidir. Türlerin biyolojileri, ortam gereksinimleri (tuzluluk, pH, sıcaklık vb), besin zincirindeki yeri, ekonomik önemi ve en hassas evresi bilinmelidir (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995; Atamanalp, 2004).

Akuatik toksikolojide kullanılacak olan deney organizmaları doğal ortamdan yakalama, üreticilerden satın alma veya laboratuvar, kuluçkahane gibi yapay ortam koşullarında üretme ile temin edilebilmektedir (Atamanalp, 2004). Akuatik toksikolojide kullanılacak deney organizması türü daha çok araştırmanın amacına bağlıdır ve omurgalılar içerisinde balıklar temel gurubu oluşturmaktadır. Gökkuşığı alabalığı, sazan türleri, Japon balığı, güneş balığı, kanal kedi balığı, dikence, zebra ve lepistes balıkları toksikolojik testlerde yaygın olarak kullanılan balık türleridir. Akuatik toksikoloji testlerinde kullanılan diğer bazı organizmalar ise; bakteri, alg, yüksek yapılı bitkiler, protozoa, sölenetera, rotifer, krustasea, annelidler, su böcekleri ve yumuşakçalardır (Pascoe ve Edwards, 1989).

Çalışmamızda, ortam koşullarına çok iyi uyum sağlaması, aktif yem alması ve yem değerlendirme oranının iyi olması, hızlı büyüme göstermesi ve kuluçka süresinin diğer alabalık türlerine göre daha kısa olması gibi özellikleri nedeniyle, gökkuşığı alabalığı tercih edilmiştir.

1.3.2. Gökkuşığı Alabalığı

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Salmoniformes takımının tek familyası olan Salmonidae familyasının üyesi olup (Tablo 1), dünyada ve Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen türlerden birisidir. 1836 yılında Colombia Irmağı’nda Richardson tarafından saptanan ve *Salmo gairdneri* adı verilen gökkuşığı alabalığı (Çelikkale, 1982; Akbulut, vd., 1999), 1988 yılında Kamchatka alabalığı (*Salmo mykiss*) ile aynı tür olduğu anlaşıldığından, tür adı *mykiss* adının, Pasifik alabalığı ve salmonu ile Atlantik alabalığı ve salmonundan ayırt edilebilmesi amacıyla da *Salmo* yerine *Oncorhynchus* cins adının kullanılması Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimleri Komitesi tarafından uygun görülmüştür (Akbulut, vd., 1999).

Tablo 1. Gökkuşığı alabalığının taksonomisi

Alem	Vertebrata
Altalem	Pisces
Sınıf	Osteichthyes
Takım	Salmoniformes
Aile	Salmonidae
Cins	<i>Oncorhynchus</i>
Tür	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1972)

Gökkuşığı alabalığının kültür ortamında üretilmesi ilk kez 1912 yılında Norveç'te gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de alabalık yetiştiriciliği 1970'li yıllarda başlamış ve hızlı bir büyüme göstermiştir. 1990'lı yıllara kadar geleneksel alabalık yetiştiriciliği yöntemi (beton ve toprak havuzlarda) uygulanmıştır (Akbulut, vd., 1999). Şu anda ülkemizin hemen her bölgesinde farklı su kaynaklarında (kaynak suları, akarsu, baraj, deniz) alabalık yetiştiriciliği yaygınlaşmıştır (Emre, 1998). Ülkemizde alabalık yetiştiriciliği 1990'lı yıllarda 3000-4000 ton yıl⁻¹ iken bugün hem iç sularda hem de denizlerde üretim yapılabilmekte ve 2021 verilerine göre iç sularda 135732 ton yıl⁻¹ ve denizde 31554 ton yıl⁻¹ alabalık üretilmektedir. Hem iç sularda hem de denizde gerçekleştirilen alabalık üretiminin tamamına yakını gökkuşığı alabalığı oluşturmaktadır. (TUİK, 2022).

1.3.3. Toksisite Çalışmalarında Su Kalitesi

Toksisite çalışmalarında denemelerin yapılacağı su ortamındaki çözünmüş oksijen miktarı, su sıcaklığı, pH, alkalinite ve sertlik gibi fiziksel ve kimyasal parametrelerinin bilinmesi gerekmektedir. Özellikle su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen miktarı deney organizmasının gereksinimlerine uygun olmalıdır. Deney ortamı su sıcaklığındaki dalgalanmalar $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmemeli ve çözünmüş oksijen miktarı da deney organizmasının tolerans sınırının (genellikle 4 mg L⁻¹) altına düşmemelidir. Denemelerde suyun pH ve alkalinite parametrelerindeki değişiklikler, sonuçların tekrarlanabilirliğini tehlikeye attığı gibi sonuçların hatalı olmasına da neden olabilmektedir (FAO, 1987).

1.4. Histoloji

Histoloji yunanca histo (doku) ve logos (bilim) kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşan ve Türkçe karşılığı “doku bilimi” olan bilim dalıdır (Junqueira ve Carneiro, 1983; Firidin, 2004). Bu bilim dalı canlıyı oluşturan elemanların yapısını mikroskobik düzeyde incelemektedir. Bunun için organizmadan alınan dokuların belirli işlemlere tabi tutularak mikroskop altında incelenecek hale getirilmesi gerekmektedir. Yapılan işlemler bütününe “histolojik teknik” adı verilmektedir (Eşrefoğlu, 2017).

Dokular çeşitli hücrelerden ve hücrelerin doku şeklinde organize olmasına yardımcı olan hücre dışı matriks arasındaki ilişkilerden oluşmaktadır. Organların çoğu birkaç dokunun bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Doku bünyesindeki hücre ve matriks bileşenlerin küçük boyutta olması nedeniyle mikroskop kullanımı histolojik çalışmaların ayrılmaz bir parçasıdır (Junqueira ve Carneiro, 1983). Histolojik çalışmanın amacına göre farklı özellikteki mikroskoplar (ışık mikroskobu, floresan mikroskop, faz kontrast mikroskop, polarizasyon mikroskobu, elektron mikroskobu gibi) kullanılmaktadır (Eşrefoğlu, 2017).

Histolojik çalışmalarda dokuların takibi ve yapılması gereken işlemler yedi aşamadan oluşmaktadır. Bunlar fiksasyon, suyunu alma, saydamlaştırma, parafinizasyon, blok hazırlama, kesit hazırlama, boyama işlemleridir (Firidin, 2004).

1.4.1. Fiksasyon (Tespit)

Fiksasyon canlıdan alınan dokuların canlıdaki durumlarına en yakın halde tutulması olarak tanımlanabilir. Fiksasyon ile hücre metabolizmasının durdurulması ve enzimatik faaliyetlerin dokulara zarar vermesinin engellenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmalar ortadan uzaklaştırılmış olur. Doku örneğinin bozulmaya mahal vermeyecek şekilde hızlı alınması ve fikse edilmesi, histolojik çalışma yapılacak örneklerin temininde dikkat edilmesi gereken önemli faktörlerdendir.

Fiksasyon işleminde çeşitli amaçlara göre farklı solüsyonlar kullanılmakta olup bu maddelere fiksatif denilmektedir (Eşrefoğlu, 2017). En iyi fiksatiflerden birisi tamponlanmış izotonik içinde hazırlanan %10'luk formaldehit çözeltisidir (Junqueira ve Carneiro, 1983; Eşrefoğlu, 2017). Formaldehit dışında; gluteraldehit, etanol, bouin ve zenker solüsyonları da kullanılabilir. Çalışılan dokunun özelliğine bağlı olarak uygun solüsyon seçimi yapılmalıdır. Örneğin yağ miktarı fazla olan dokuların tespitte alkol solüsyonu tercih

edilmemelidir. İdeal bir fiksasyon için doku hacminin 10 katı miktarda fiksasyon solüsyonu kullanılmalıdır (Firidin, 2004).

1.4.2. Suyunu Alma (Dehidratasyon)

Dokulardan mikroskopik değerlendirmede kullanılabilecek ince kesitler alınabilmesi için dokuların yeterince sertleştirilmesi gerekmektedir. Sertleştirme için fikse edilmiş doku içerisindeki suyun yerini alkolün alması sağlanmaktadır. Bunun için doku %70-%100 aralığında etanol içeren bir seri alkol muamelesine tabi tutulmaktadır. Daha sonra alkol yerine ksilol ve en son olarak ksilol yerine parafin nüfuz etmesi sağlanmaktadır. Her bir aşamanın süresi çalışılan dokunun türüne ve boyama yöntemine göre değişmekte olup 15 dk ile 1 saat arasında sürmektedir (Firidin, 2004; Eşrefoğlu, 2017).

1.4.3. Saydamlaştırma

Dehidratasyon aşamasında alkolle yer değiştiren ksilen, dokulardaki yağları eriterek dokunun şeffaflaşmasını sağlamaktadır (Firidin, 2004; Eşrefoğlu, 2017). Bu aşamanın süresi dokunun özelliğine bağlı olarak değişmektedir.

1.4.4. Parafinizasyon

Şeffaf hale getirilen dokudan istenilen kalınlıkta kesitler alınabilmesi için doku, uygun bir ortama yerleştirilmelidir. Işık mikroskobu ile takip için parafin, elektron mikroskobu ile takip için araldin veya epon kullanılmaktadır (Eşrefoğlu, 2017). Parafinizasyon aşamasında, etüvde 58-65°C sıcaklıktaki parafin içinde 2-3 saat bekletilen dokulardaki ksilol yerine parafin geçmektedir (Junqueira ve Carneiro, 1983; Firidin, 2004; Eşrefoğlu, 2017).

1.4.5. Blok hazırlama

Etüvden çıkarılan ve parafinin oda sıcaklığında donması nedeniyle sertleşen dokular kesilecek yüzleri alta gelecek şekilde bloklara yerleştirilerek tamamen parafinle kaplanmaktadır. Bu şekilde hazırlanan bloklar soğuduktan sonra kesit alma işlemi için hazır hale gelmektedir (Junqueira ve Carneiro, 1983; Firidin, 2004; Eşrefoğlu, 2017).

1.4.6. Kesit Hazırlama

Parafin bloklardan mikrotom cihazıyla elde edilen 1-7 µm kalınlığındaki kesitler 35-40°C sıcaklıktaki suya atılarak kesilme sırasında kıvrılan dokunun düzgünleştirilmesi sağlanmaktadır. Bir lam yardımıyla sudan alınan doku etüvde bekletilmesi ile içerisindeki parafinin eriyerek akar ve lam üzerinde sadece doku kesiti kalır (Firidin, 2004).

1.4.7. Boyama

Kesit hazırlama aşaması tamamlanan kesitlerde çoğu doku elemanı renksizdir ve mikroskopta incelenebilmeleri için boyanmaları gerekmektedir. Etüvde eritme ile parafinden ayrılan preparatlarda kalmış olabilecek parafinin tamamen temizlenebilmesi için lam üzerindeki dokular ksilolde 1,5 saat bekletilmelidir. Saf alkolden başlamak suretiyle alkol serilerinden geçirilmiş olan doku örnekleri uygun boyama yöntemi ile boyanabilir (Firidin, 2004).

Histolojik çalışmalarda genellikle Hematoksilen-Eosin birleşik boyama yöntemi kullanılmaktadır. Hemotoksilen, hücre çekirdeğini ve diğer asidik yapıları maviye; eozin ise hücre bağ dokusu elamanlarını ve sitoplazmasını kırmızı, turuncu ve pembe renklere boyamaktadır. Boyanan örnekler entellan ile kapatılır ve kurumaya bırakılır (Junqueira ve Carneiro, 1983; Firidin, 2004).

1.5. Comet Analizi

Stres faktörleri canlı organizmalarda; hormon, enzim, karbonhidrat ve protein metabolizmalarını etkileyerek fizyolojik ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadır. Stres faktörlerinin strese maruz kalan organizma üzerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı, hasar varsa derecesinin belirlenmesi önem arz etmektedir (Güner ve Muranlı, 2013). DNA hasarının belirlenmesi için birçok metot kullanılmıştır. Bu yöntemlerin uzmanlık isteyen, pahalı, uzun süren, çok özel donanım ve sarflar gerektiren yöntemler olması, DNA hasarlarının belirlenmesinde alternatif yöntemlere ihtiyaç doğurmaktadır (Tice vd., 2000). Bu ihtiyaca yanıt olarak Singh vd. (1988) tarafından geliştirilen “tek hücre jel elektroforez” veya “Comet Analizi” olarak bilinen yöntem DNA hasarını ve seviyesini gösteren bir metot olarak ortaya çıkmıştır (Cotelle ve Ferard, 1999).

Çevresel biyoizleme çalışmalarında çevresel kirleticilerin genotoksik özelliklerini değerlendirmek için DNA hasarı yararlı bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (Everaarts vd., 1998; Felder vd., 1998; Theodorakis ve Shugart, 1998; Xu vd., 1999). Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) veya comet analizi, indikatör organizmalarda çevresel kirleticilerin genotoksitesini değerlendirmek için kullanılan teknikler arasında öne çıkmaktadır (Mitchelmore ve Chipman, 1998; Rojas vd., 1999). Comet analizi tek tek hücrelerde DNA hasarının görselleştirilmesine olanak sağlamaktadır (Olive vd., 1990). Nispeten daha az sayıda hücreye ihtiyaç duyulan (birkaç yüz hücre) ve çekirdeği olan herhangi bir hücrenin kullanılabildiği comet analizini ön plana çıkarmaktadır. Ayrıca işlem süresi nispeten kısa olup maliyeti diğer birçok yöntemle göre daha az olan bu teknik, organizmaların maruz kaldığı tüm genotoksik kirleticilerin neden olduğu kümülatif genetik toksisiteyi, başka hiçbir geleneksel çevresel etki değerlendirme tekniğinin sağlayamayacağı şekilde ölçebilmektedir. (McKelvey-Martin vd., 1993; Fairbairn vd., 1995; Mitchelmore ve Chipman, 1998; Gedik vd., 1992).

1.6. Real Time PZR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PZR), klasik PZR'dan daha sonra geliştirilen bir yöntemdir. İlk defa 1992 yılında tanıtılmış ve geçen yıllarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Higuchi vd., 1992, 1993). Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde SYBR green ya da Eva green kullanılan bir sistem olan Real-time PZR (RT-PZR) teknolojisi ile amplifikasyon ürünlerinin logaritmik artışını grafik olarak izleyebilmesi ve bu ürünlerin kantitatif analizinin yapılabilmesi sağlanmaktadır (Higuchi vd., 1992). RT-PZR, floresan özellikli boya veya problemlerin hedef bölgeye bağlanarak oluşturdukları amplifikasyon ürünlerinin ışığa yayması ve bu ışınların optik bir modül tarafından algılanması ile izlenebilir hale gelmesi prensibine dayanmaktadır. PZR sırasında oluşan floresan ışımaların algılanması bilgisayar yazılımı ile kaydedilmektedir. PZR döngülerine bağlı olarak artan floresan ışımaların bir amplifikasyon grafiği ile eş zamanlı görüntülenebilmesi bu yazılım sayesinde olmaktadır. Aynı zamanda kantitatif analizler için floresan ışımaya şiddetini sayısal değerlere dönüştürmektedir. RT-PZR teknolojisi klasik PZR teknolojisine göre amplifikasyon örneklerinin (DNA, mRNA) çoğaltımını ve miktarını tek bir tüpte tespit edebilme (Klein, 2002), boyama görüntüleme gibi uygulamalara gerek kalmama ve kontaminasyon riskinin azalması gibi avantajlara sahiptir (Hanna vd., 2005). Northern blot

gibi gen ekspresyonunu incelemeye yönelik diğer analizler hem zaman alıcıdır ve hem de gen ekspresyon seviyelerinin ölçümelerini doğru şekilde oluşturmak zordur. RT-PZR'nin kullanılması, gen ifadesinin tespiti için; daha az numune, verileri hızlı ve doğru şekilde yeniden üretme ve bir seferde birden fazla geni analiz etme kapasitesi gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Fraga vd., 2008).

“RT-PZR” teknolojisi insanda, hayvanlarda ve bitkilerde patojenite oluşturan virüsler, bakteriler, bazı mantar türlerinin meydana getirdiği hastalıkların patojenlerinin tespitinde özel floresan probalar sayesinde rutin uygulamada kullanılan bir metot haline gelmiştir. Diğer taraftan hastalığın etki derecesinin saptanmasında ve tedavisinde, viral genomun sayısal değerinin belirlenmesinde RT-PZR teknolojisi çok büyük önem arz etmektedir (Brunk vd., 2002). Yine onkolojik tanılarda, doğum öncesi tanı çalışmalarında ve genetiği değiştirilmiş organizmaların tespitinde RT-PZR her geçen gün artan şekilde kullanılmaktadır (Van der Velden vd., 2003; Gut vd., 1999;)

1.7. Önceki Çalışmalar

1.7.1. Triklosan Çalışmaları

Brady vd. (1990)'nin yaptığı bazı çalışmalarda TRC içeren antimikrobiyal kullanımının metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarını azalttığını belirten veriler elde etmiştir. Nehir suyuna TRC ekleyen ve suya ultraviyole ışık tutan Latch vd. (2000), TRC'ın %1-12 arasında suda dioksine dönüştüğünü, bunun da güneş ışığının TRC'ı doğal olarak dioksine dönüştürebileceğini göstermiştir. Toder vd. (2002) son yıllarda özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği ülkelerinde artış gösteren TRC kullanımından kaynaklı sorunlarla ilgili kapsamlı araştırmalar yapılarak, sonuçları yayınlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1999 ve 2000 yıllarında yapılan bir çalışmada farklı su kaynaklarından alınan numuneler incelenmiş ve TRC'nin konsantrasyon olarak en yüksek değerdeki antimikrobiyallerden birisi olduğu anlaşılmıştır. Foran vd. (2000)'nin yaptığı çalışmada, embriyonik dönemde TRC'ye maruz bırakılan Japon medaka (*Oryzias latipes*) balıklarında zayıf androjenik etki gösterdiği, dişi/erkek oranını ve yüzgeç uzunluklarını değiştirdiği tespit edilmiştir. Lindström vd. (2002) İsviçre'de TRC üzerine yaptığı bir araştırmada, birçok göl ve nehirde kimyasalın yüksek konsantrasyonlarının yanı sıra, TRC'nin parçalanma yan ürünü olan metil TRC'nin daha düşük seviyelerde bulunduğunu belirtmiştir. Coogan (2007)'da biyolojik metilasyon

denen bir işlemle oluşan metil TRC'nin, TRC'den daha biyobirikimli ve daha lipofilik olduğunu bulmuştur. Wilson vd. (2003) ve Tatarazako vd. (2004) ise TRC'nin sucul ekosistemler ve farklı alg türleri için oldukça zararlı ve toksik olabileceğini belirtmiştir. Adolfsson-Erici vd. (2002) ise lipofilik doğası ve bozunmaya karşı direnci nedeniyle, TRC'nin suda yaşayan organizmalarda emilim ve biyobirikim oluşturabileceği bildirmişlerdir. BBC News (2003)'de yayınlanan makalede, güneş ışığının su arıtma tesislerinde TRC'ile kirlenmiş suyun arıtılmasında klorlu TRC'yi yüksek derecede toksik dioksin formlarına dönüştürmesinin ciddi bir sağlık tehdidine yol açabileceği bildirilmiştir. Balmer vd. (2004) TRC atıklarının etkileyebileceği tatlı su kafeslerinde yetirilmiş balıkların safralarında yüksek miktarda TRC bulunduğunu belirten bir çalışma yürütmüştür. Ishibashi vd. (2004) TRC'nin Japon medaka balıkları için erken yaşam evrelerinde oldukça toksik olduğu ve düşük bir endokrin bozucu olabileceğini gösteren bir çalışma yapmıştır. Chen vd. (2015)'nin zebrafish (*Danio rerio*) embriyolarını döllenmeden sonra farklı dozlarda TRC'ye maruz bıraktıkları çalışmada, toplam morfolojik skorda azalma ve embriyolarda gelişme geriliği oluştuğunu bildirmiştir

Glaser (2004) klasik toksikolojik çalışmalarda TRC'nin insan ve diğer memeliler üzerinde toksik etki yapmadığını belirtmiştir. Fakat bazı farklı çalışmalar TRC'ye maruz kalan deride çeşitli sorunlar oluşturduğunu göstermiştir. Yarası TRC içeren iplik ile kapatılan hastalarda ameliyat sonrası dikiş bölgelerindeki enfeksiyon önlenabilmektedir (Storch vd., 2004; Fleck vd., 2007; Ming vd., 2008).

Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilen kapsamlı çalışmaların sonuçları, triklosan içeren kişisel bakım ürünleri kullanan 36 emziren annelerin sütlerinde önemli miktarlarda TRC saptanmış olduğu ayrıca TRC'nin erkeklerde androjenleri, dişilerde ise östrojeni etkilediğini ortaya çıkarmıştır. TRC'nin dişi bireylerde meme karsinomasını tetikleyebileceği de rapor edilmiştir (McGinnis, 2008). TRC deniz suyunda dört günde, tatlı suda ise sekiz günde bozunarak 2,8-dichlorodibenzo-p-dioksin'e dönüşmektedir. TRC deniz canlılarında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (McGinnis, 2008).

Bazı diş macunu ve sabun ürünlerindeki TRC'nin 12 saate kadar etkisini sürdürdüğü iddia edilmektedir. Böylece kullanıcılar ellerini yıkamak veya dişlerini fırçalamak için geçen süreden çok daha fazla TRC'ye maruz kalmaktadır. Sıçanlar için dermal LD₅₀ (bir test hayvanı popülasyonunun yüzde 50'sini öldüren öldürücü doz) 5000 mg kg⁻¹'dir. Oral LD₅₀ sıçanlar için 4500-5000 mg kg⁻¹, fareler için 4000 mg kg⁻¹ ve köpekler için 5000 mg kg⁻¹'in üzerindedir (URL-8).

Glaser, (2004) araştırmasında TRC'nin kanser oluşumu üzerine etkisini incelemiş ve TRC'nin hem pozitif yönde hem de negatif yönde etki ettiğini belirtmiştir. TRC yüksek oranda DNA hasarına, dolayısıyla kansere neden olmaktadır (Ciniglia vd., 2005; Binelli vd., 2009; Lin vd., 2012; Jirasripongpun vd., 2008). Ancak, yapılan başka çalışmalarda TRC'nin farklı tümör çeşitlerinde çoğalmayı baskıladığını iddia edilmektedir (Liu vd., 2002; Honkisz vd., 2012). Ciniglia vd. (2005) bir alg türü olan *Closterium ehrenbergii* de TRC'nin etkisini comet analiziyle araştırmış ve doz arttıkça DNA hasarların geri dönüşümsüz olarak gerçekleştiği belirtilmiştir.

1.7.2. Kloroksilenol (PCMX) Çalışmaları

Kanalizasyon suyunda bulunan PCMX bileşiğinin ikinci günün sonunda %80-95 ve yedinci günün sonunda ise %60-70'inin halen ortamda kalabildiği bilinmektedir. Henry Kanunu sabitine göre ise, kloroksilenolun, nehirlerden on saatte, göllerden ise dokuz günde buharlaşmaktadır (Pauli ve Franke, 1983). Zhou vd. (2019), adsorpsiyon kinetiği testleri, ikinci dereceden kinetik modelin PCMX'in adsorpsiyon davranışını çok iyi tanımlayabildiğini göstermiştir. Yeni bir β -siklodekstrin polimeri kullanılarak kloroksilenolun sudan adsorptif olarak uzaklaştırılmasını %90,8 verimlilikle tespit ederek, su ortamındaki PCMX'in verimli bir şekilde uzaklaştırılması için teorik bir temel sağlayabileceğini bulmuştur. PCMX miktarı sudan ziyade özellikle ev tozunda daha yüksek yoğunluklarda bulunabilmektedir (Zheng vd., 2020).

Bazı parazit, bakteri, mantar ve virüslerin yayılmasını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan ve sentetik bir antiseptik olan PCMX, drenaj yoluyla su ortamlarına çok büyük miktarlarda karışabilmektedir (Au vd., 2023). Hong Kong'daki nehirlerden ve kıyı sularından toplanılan su numunelerini yeni geliştirilen bir yöntem olan, stabil izotop seyreltme ile birleştirilmiş sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi kullanılarak sucul ortamda bulunan PCMX kirliliği belirlenmiştir (Au vd., 2023). Atık sudaki PCMX'in, Hong Kong'da ve dünyadaki diğer mega şehirlerde kullanılan atık su arıtma işlemlerinden biri olan kimyasal olarak geliştirilmiş birincil arıtma tarafından etkili bir şekilde giderilmediği ve birincil arıtma atığı olan su ortamlarındaki PCMX'in sürekli bir kirlilik kaynağı olduğu ortaya konmuştur (Au vd., 2023). PCMX'in su ortamında nispeten kararlı olduğunu ve suda yaşayan organizmalar için risk oluşturabileceğini belirten Au vd. (2023), bu bulgular ışığında, PCMX bazlı dezenfektanların aşırı kullanımından kaynaklanan çevresel sonuçlara

ilişkin kamuoyu bilincini artırmanın önemini ve PCMX'i ortadan kaldırmak için çeşitli atık su arıtma süreçlerini yeniden değerlendirme ihtiyacını vurgulamıştır.

1.7.3. Metilizotiazolinon (MIT) Çalışmaları

MIT ilk olarak Crow ve Leonard (1965) tarafından sentezlenmiştir. Ardından Lewis vd. (1971) ilk yöntemle göre daha kolay hazırlanabilen bir prosedürle MIT sentezlenebildiğini rapor etmiştir. Belli oranlarda uygulanan CMIT/MIT karışımının, ani hücre ölümlerine sebep olması, 3. 6. ve 24. saatler sonunda ölü hücre sayısının aşırı yüksek olması; 6. saat sonunda, oransal olarak fazla miktarda DNA kırığı oluşturmamasından dolayı yüksek toksisiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Anselmi vd., 2002). İnsan dış deri hücreleri belirli oranlarda Kathon CG konsantrasyonlarına 10 dakika maruz bırakıldıktan sonra 3. saatin sonunda incelenmiş, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma, yüksek konsantrasyonunda ise azalmanın arttığı belirtilmiştir. Kaspaz enzim aktivitesi zaman içerisinde konsantrasyona bağlı olarak artış göstererek ve hücrel intiharlar görüldüğünü, yüksek konsantrasyonlarda ise kaspaz enzim aktivasyonu görülmemiş ve nekrotik ölüm gerçekleştiği bildirmiştir (Ettorre vd., 2003). *Xenopus laevis* (Güney Afrika pençeli kurbağası) embriyoları, iribaşlar ve kurbağa yavruları MIT'ya maruz bırakıldığında doğal rejeneratif yeteneklerini kaybettikleri ve omurilik, kas, notokord da dahil olmak üzere dokuların yeniden oluşturulamadığı belirlenmiş ve MIT maruziyeti sonrasında peçeli kurbağalarda yara iyileşmesinin oluşmadığı görülmüştür (Santos vd., 2016). Almanya'da yüzey, yer altı ve içme sularında MIT, CMIT, BIT, OIT ve DCOIT gibi izotiazolinon bileşikler 0,01-0,1 µg L⁻¹ gibi değişen oranlarda bulunmuştur. Bu biyositlere nehir sularında ise rastlanmamış ve bunun sebebi olarakta izotiazolinon bileşiklerinin nehir sularına ve atık sulara karıştıktan sonra ortamdaki hızla uzaklaştığı kanısına varılmıştır. Ayrıca, farklı sıcaklıklarda yüzey, musluk veya yer altı sularından alınan örneklerin ortamdaki yok olma sürelerinde farklılık olduğu belirlenmiştir (Bollmann vd., 2017). İzotiazolinon bileşiklerinden aralarında MIT, BIT, OIT ve DCOIT bileşiklerinde bulunduğu 10 farklı biyositi, su piresi (*Daphnia similis*), tatlı su planaryası (*Dugesia japonica*) ve yeşil neon karidesi (*Neocaridina denticulata*) gibi omurgasız hayvan türlerinde uygulaması sonucu, DCOIT'in, su biti ve tatlı su planaryası üzerinde en yüksek, MIT'ın ise 3 omurgasız üzerinde de düşük toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur (Li, 2019). Türkiye'de 2016-2018 yılları arasında yapılan alerji testi sonuçlarına göre, 324 hastanın %8,9'unun MIT veya Kathon

CG'ye karşı alerjik reaksiyon oluşturduğu belirlenmiştir. Yine Türkiye'de de 1996-2019 yılları arasında toplamda 2310 hasta üzerinde yapılan MIT ve Kathon CG alerji testi sonuçlarına göre temas hassasiyet oranı %3,3 olarak tespit edilmiştir (Salman, 2019). Türkiye'de MIT veya Kathon CG pozitif, 2015 yılında %16,4 ile en yüksek pik değeri görülmüş ve 2019 yılında ise temas hassasiyet oranının en yüksek pik değeri % 6,5 olarak tespit edilmiştir (Özkaya vd., 2020) Türkiye'de 1309 kişi arasından, 2013-2019 yılları arasında yapılan Kathon CG yama testi sonucunda 19 erkekte ve 21 kadında pozitif vaka tespit edilmiştir (Boyvat vd., 2021).

1.7.4. Boraks (BRX) Çalışmaları

Bor, karasal ve su ekosistemlerinde hem asit hem de baz üretme kapasitesiyle hem metalik hem de ametalik özellikler göstermektedir. Doğada eser miktarlarda olmasına rağmen hidrosferde ve litosferde yaygın olarak bulunmakta ve jeolojik ve antropojenik girdiler yoluyla serbest kalmaktadır. Borun doğal kaynakları arasında, borosilikat mineralleri (örn. turmalin), volkanik patlamalar, jeotermal ve yeraltı suyu akıntıları ve deniz suyu bulunur. Küresel ortalama deniz suyu bor konsantrasyonu yaklaşık 4,6 mg Bor L⁻¹'dir ve genellikle deniz evaporitlerinden türetilen tuzlu topraklarda meydana gelir (Degryse, 2017; Gméling vd., 2007; Helvacı ve Palmer, 2017; Pye vd., 2012). Bor içeren atık su üreten başlıca endüstriler, cam veya seramik endüstrisi (%56 ile en yüksek pazar talebi ile) ve metalurjidir (Pye vd., 2012). Ayrıca, bor kaynaklı çevresel kirleticiler arasında atık minerallerden kaynaklanan deşarjlar ve madencilikten kaynaklanan atık sular yer almaktadır. Dünya bor tüketimi yılda 1,5 milyon tonu aşmaktadır (Özdemir ve Kıpçak, 2010). Bunun temel nedeni seramik, ilaç, kozmetik, temizlik deterjanları, bor gübreleri, ısıya dayanıklı ürünler, korozyon önleyici malzemeler, ağır hizmet çeliği, alev sentezinde aktif bir bileşen olan borun geniş uygulama yelpazesine sahip olmasıdır. Nükleer tesislerde geciktirici ajanlar ve nötron emici malzemeler olarak kullanılmaktadır (Hosmane, 2011). Bor atıksu evsel atık sularda birkaç yüz mg L⁻¹'den birkaç mg L⁻¹'ye kadar değişen seviyelerde mevcut olabilmektedir. Bunun temel nedeni deterjan ve temizlik maddelerinde kullanılan ağartıcı ürünlerdeki sodyum boratın zenginliğidir (Remy vd., 2005). Bor, geçmişten beri kimya ve eczacılık alanında kullanılan bir bileşendir (Burgos vd., 2018; Gupta ve Daigle, 2014; Paton, 2017; Soriano-Ursúa vd., 2019).

Boraks'ın hem solunum hem de cilt toksisitesi canlıları aynı anda etkileyebilmektedir (Hadrup vd., 2021). Solunum yoluyla boraksa maruz kalmış çinli işçilerin üreme toksisitesine neden olup olmadığını ele alan araştırmada günde ortalama 31 mg bora maruz kalan 75 işçinin sperm kalitesi araştırılmış ve işçilerin semenlerinin etkilendiği tek özellik, azalmış Y:X kromozom oranı olarak tespit edilmiştir. Ancak bu oran kandaki bor seviyeleriyle ilişkili değildir (Robbins vd., 2008; Scialli vd., 2010). Yine Bandırma'da bulunan borik asit üretim tesisinde çalışan 204 işçide de borun üreme üzerinde olumsuz bir etkisine rastlanmamıştır (Başaran vd., 2012). Borik asitin dermal uygulamasından sonra borun emilmesini konu alan çalışmada, boraks emilim değerleri uygulanan dozun yaklaşık %0,2'si kadar olduğu görülmüştür (Wester vd., 1998). Gebe sıçanlara 6-21. gebelik günlerinde oral yolla günde 5, 10 veya 20 mg borik asit ve yavrulara ise doğumdan itibaren 1 ila 28. günlerde aynı doz uygulanmıştır. Yavruların plazmasında bor doza bağlı olarak yaklaşık $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ 'den en yüksek dozda $11 \mu\text{g L}^{-1}$ 'ye yükselmiştir (Watson vd., 2020). 5 gün boyunca $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ içme suyunda (günde $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ vücut ağırlığı) borik aside maruz bırakılan farelerin vücut ağırlıklarında %28'lik bir azalma, kolesterol ve bazı kan değerlerinde değişiklikler meydana geldi ancak histopatolojik değişiklik gözlenmiştir (Aysan vd., 2011; Aysan vd., 2013). Türkiye'de yüksek bor maruziyetine uğrayan kadınlarla, düşük ve orta derecede bor maruziyetine maruz kalan kadınların lenfositlerinin comet analizi ile yapılan karşılaştırılmasında anlamlı bir fark görülmediği rapor edilmiştir (Başaran vd., 2019a). Bandırma'da, mesleki olarak borik asite maruz kalan 212 erkeğin kan, sperm ve yanak hücrelerindeki DNA hasarının tespitine yönelik yapılan comet analizinde de DNA hasarlarında önemli değişiklikler bulunmamıştır (Başaran vd., 2019b). Çin hamsterine uygulanan bor oksit (B_2O_3) sonucu yumurtalık hücrelerinde hiçbir mikronükleus indüksiyonu gözlemlenmemiştir (Albuz vd., 2019). Erkek ve dişi 50'şer farenin olduğu gruplara 2500 ve 5000 ppm konsantrasyonda borik asitli yemlerin verilmesiyle 2 yıllık bir çalışma sonucunda borik asidin kanserojen olduğuna dair bir veri bulunmamıştır. Ancak erkek farelerde yüksek dozlarda testiküler atrofi ve interstisyel hücre hiperplazisi gözlenmiştir (National Toxicology Program, 1987). Zebra balığı, 1 ila 64 mg^{-1} arasındaki su konsantrasyonlarında borik asit veya boraksa maruz bırakıldığında, her iki bileşik de eritrositlerde artan DNA iplikçik kırılmalarına neden olmaktadır (Gülsoy vd., 2015). Boraksın gökkuşağı alabalığı için toksik olabileceği ve boraksa akut maruz bırakılan balıkların solungaç, böbrek ve kas dokularında histopatolojik hasar oluşabilmektedir (Topal vd., 2016).

1.8. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi

Bu çalışma, antimikrobiyal pestisitlerden boraks (BRX), triklosan (TRC), kloroksilenol (PCMX), metilizotiazolinon (MIT)'un gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerindeki kronik toksik etkilerini, histopatolojik etkilerini (karaciğer, böbrek ve solungaç dokusu), kan DNA hasarını ve gen ekspresyonu etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Ticari olarak temin edilen; triklosan ($C_{12}H_7Cl_3O_2$, Sigma-Aldrich), kloroksilenol (4-Kloro-3,5-dimetilfenol, Merck Millipore), metiloizotiazolinon (2-Metil-4-izotiazolin-3-one, Sigma-Aldrich) ve boraks ($Na_2B_4O_7$, Sigma-Aldrich) kimyasalları uygulanan kronik toksisite testlerinde antibakteriyel maddeler olarak kullanılmıştır.

Triklosan (TRC) ve kloroksilenol'un (PCMX) stok çözeltileri etanol (Merck, ACS reaktifi, mutlak) ile seyreltilerek hazırlanırken, metiloizotiazolinon (MIT) ve boraks (BRX) distile su ile seyreltilerek istenen konsantrasyonlar elde edilmiştir. Deney süresince günlük hazırlanan taze stok çözeltiler kullanılmıştır.

2.2. Deney Balıkları

Bu çalışmadaki tüm deneyler, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylanmıştır. Karadeniz Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri Fakültesi'nden temin edilen gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) ($17,77 \pm 3,92$ g; $12,04 \pm 0,90$ cm; Ort. $\pm$ SD) kullanılmıştır. Deney sonunda balıklar $17,91 \pm 4,06$ g ağırlık ve $12,07 \pm 0,95$ cm boya ulaşmışlardır.

2.3. Deneysel Tasarım

TRC, PCMX, MIT ve BRX için 96 saatlik LC_{50} konsantrasyonu sırasıyla $0,05$ mg L^{-1} , $0,043$ mg L^{-1} , $0,072$ mg L^{-1} ve 1 g L^{-1} olarak kabul edilmiştir (Abdulğanioglu, 2014).

Kronik maruz bırakma denemelerinde antimikrobiyallerin LC_{50} konsantrasyonlarının %1'ine tekabül eden değer kullanılmıştır. Bu nedenle, kronik maruz bırakma denemelerinde kullanılan konsantrasyonlar sırasıyla TRC için $0,48 \pm 0,2$ μg L^{-1} , PCMX için $4,2 \pm 0,9$ μg L^{-1} , MIT için $6,8 \pm 1,1$ μg L^{-1} ve BRX için $8,9 \pm 1,8$ mg L^{-1} 'dir. MIT ve BRX, 50 mL distile suda çözülmüştür. TRC ve PCMX ise 50 mL etanol içinde çözüldükten sonra deney suyuna eklenmiştir.

Denemelerde kullanılacak balıklar deneyler başlamadan önce 30 gün süreyle sürekli akış sistemi ile çalışan 200 litrelik tankta laboratuvar koşullarına adapte edilmiştir. Adaptasyon ve kronik toksisite testleri sırasında, balıklar sabit bir fotoperiyot (12 saat ışık ve 12 saat karanlık) uygulanmıştır. Balıklar günlük olarak ticari alabalık pelet yemleri ile vücut ağırlığının %3'ü oranında beslenmiştir. Balıklar üzerinde toksik etkilerinin değerlendirilecek her bir kimyasal ve kontrol grubu için iki akvaryum (iki tekerrür) olmak üzere toplam 12 adet 40 litrelik akvaryum kullanılmıştır (Şekil 5). Her bir akvaryuma benzer boy ve ağırlıklarda 20'şer adet gökkuşağı alabalığı koyulmuştur. Balıklar akvaryuma koyulduktan 1 gün sonra 40 gün boyunca TRC, PCMX, MIT ve BRX'e kronik olarak maruz bırakılmışlardır (Şekil 6).



Şekil 5. Gökkuşağı alabalıkları ve kimyasallara maruz bırakıldığı akvaryumlar

	Kontrol ^a	Kontrol ^b	TRC	PCMX	MIT	BRX
Tekerrür 1	20 balık 40 l	20 balık 40 l 50mlEtanol	20 balık 40 l 0,48 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 4,2 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 6,8 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 8,9 mg L ⁻¹
Tekerrür 2	20 balık 40 l	20 balık 40 l 50mlEtanol	20 balık 40 l 0,48 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 4,2 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 6,8 µg L ⁻¹	20 balık 40 l 8,9 mg L ⁻¹

^a normal su

^b etanol içeren kontrol grubu

Şekil 6. Deney şeması

İki kontrol gurubundan birinde sadece test suyu bulunurken, diğer kontrol gurubunda test guruplarında kimyasal çözelti hazırlamak için kullanılan etanol miktarı ile aynı miktarda etanol içerecek şekilde hazırlanmış olan su kullanılmıştır. Etanol içeren kontrol gurubu TRC ve PCMX kimyasalları etanol ile çözüldüğü için kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Yarı

statik olarak tasarlanan kronik toksisite denemesinde deneme ve kontrol guruplarının suları günlük olarak %56 oranında yenilenmiş ve sudaki test kimyasalının konsantrasyonu günlük eklemeler yapılarak sabit tutulmuştur (Boran vd., 2010).

Antimikrobiyal kimyasallara kronik maruz bırakma deneyleri sırasında; sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen, nitrit ve amonyak gibi su parametreleri günlük olarak ölçülmüştür (Tablo 2). Ayrıca, deneyin başında ve deney süresince her iki günde bir, sudaki kimyasalların gerçek konsantrasyonlarını belirlemek için su numuneleri alınmıştır. Sudaki TRC (Zhao vd., 2011), PCMX (Gatti vd., 1997), MIT (Baranowska ve Wojciechowska, 2013) ve BRX (EPA, 2013) konsantrasyonları HPLC ile belirlenmiştir.

Tablo 2. Çalışmalar esnasındaki su kalite parametreleri

Parametre	Su ^a	Kontrol	Kontrol ^b	BRX	MIT	TRC	PCMX
Sıcaklık (°C)	15,1±0,2	15,1±0,1	15,1±0,1	15,1±0,2	15,1±0,2	15,1±0,1	15,1±0,2
pH	8,14±0,21	7,90±0,18	7,82±0,34	8,43±0,11	8,23±0,27	7,92±0,30	7,85±0,25
Çözünmüş oksijen (mg L ⁻¹)	9,4±0,3	9,0±0,2	9,1±0,2	8,9±0,1	8,7±0,3	8,8±0,2	8,4±0,3
Toplam Amonyak (ng L ⁻¹)	1,0±0,02	21,8±3	22,1±0,9	24,5±5,7	24,5±5,7	24,5±5,7	24,5±5,7
Nitrit (ng L ⁻¹)	5,0±1,7	5,0±1,7	8,4±3,3	27±8,9	26±6,5	23±2,3	24±9,1

^a normal su ^b etanol içeren kontrol gurubu

2.4. Histopatoloji

TRC, PCMX, MIT ve BRX'e 40 günlük kronik maruziyetten sonra balıklardan solungaç, böbrek ve karaciğer doku numuneleri alınmıştır. Alınan numuneler hemen nötr tamponlu formalin solüsyona (%10) konularak 48 saat bekletilmiştir. Akabinde organlar alkol serisi yıkamalar ile durulanıp ksilen içinde temizlenmiştir. Temizlenen numuneler Parafin-III içinde sabitlendikten sonra (Tablo 3) mikrotom cihazı (Leica, RM 2125RT) ile 5 µm kalınlığında kesilerek Hematoksilen-Eosin (Tablo 4) ile boyanmıştır (Luna, 1968). Hematoksilen (Biostaine) boyası hazır olarak temin edilip kullanılmıştır. Eozin boyası (Merck) ise 1 g'ı 100 ml saf su içerisinde çözülerek kullanılmıştır. Boyanan preparatlar entellan ile kapatılarak histopatolojik lezyonlar ışık mikroskopunda (Leica DMI 6000 B, Almanya) incelenmiş (Boran vd. 2012) ve elde edilen bulgular Tablo 5'de sunulmuştur.

Tablo 3. Parafine gömme işlem aşamaları

Aşama	Muamele	Tekrar Sayısı	Süre
1	%70'lik alkol	2	Toplam 60 dakika
2	%80'lik alkol	2	Toplam 60 dakika
3	%90'lık alkol	2	Toplam 60 dakika
4	%100'lük alkol	2	Toplam 60 dakika
5	%100'lük alkol + ksilol	1	15 dakika
6	Ksilol-I	1	15 dakika
7	Ksilol-II	1	15 dakika
8	Ksilol + parafin (etüv)	1	15 dakika
9	Parafin-I (etüv)	1	60 dakika
10	Parafin-II (etüv)	1	60 dakika
11	Parafin-III (etüv)	1	60 dakika

Tablo 4. Hematoksilen-Eozin boyama işlem aşamaları

Aşama	Muamele	Süre
1	Ksilol-I	5 dakika
2	Ksilol-II	5 dakika
3	%100'lük alkol	3 dakika
4	%80'lik alkol	3 dakika
5	%70'lik alkol	3 dakika
6	Distile su	5 dakika
7	Hematoksilen	6 dakika
8	Distile su	5 dakika
9	Çeşme suyu	15 dakika
10	Eozin	3 dakika
11	%70'lik alkol	3 dakika
12	%80'lik alkol	3 dakika
13	%100'lük alkol	3 dakika
14	Ksilol-I	5 dakika
15	Ksilol-II	5 dakika

Tablo 5. Histopatolojik lezyon skor tablosu

Durum	Skor	Lezyon Sayısı
Yok	-	0 lezyon
Hafif	+	1-4 lezyon
Orta	++	5-8 lezyon
Şiddetli	+++	≥9 lezyon

2.5. Comet Analizi

Comet analizi Altınok vd. (2012) tarafından kullanılan yöntem uygulanarak yapılmıştır. Kronik toksik deneme sonunda her bir test ve kontrol grubundaki balıklardan 10 tanesinin kaudal venasından 0,5 mL kan örneği alınmıştır. Kan örneklerindeki hücre sayısını 100 hücre/ml oranına seyretlemek için fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) kullanılmıştır. Seyreltilen kan örneklerinden alınan 10 µL hücre süspansiyonu, 75 µL %5'lik düşük erime noktalı agaroz (LMPA) ile karıştırılıp lam üzerine 80 µL hücre/LMPA süspansiyonu aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Agarozun katılaşması için örnekler 4 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Negatif kontrol olarak kontrol grubu balıklarından (test suyu ve etanol'e maruz bırakılan iki grup) elde edilen kan örnekleri kullanılmıştır. Comet analizinde pozitif kontrol olarak kullanılmak için negatif kontrol grubundan elde edilen kan örnekleri 5 dakika hidrojen peroksit maruz bırakılmıştır. Karanlık ortamda 1 saat süreyle 4 °C'de lizis solüsyonuna daldırılan slaytlar 4 °C'de alkalın elektroforez tamponu (pH > 13) içeren elektroforez kabına aktarılmış ve tüm slaytlar karanlıkta 30 dakika süreyle 24 V'da (0,74V cm⁻¹, 300 mA) koşturulmuştur. Bu aşamadan sonra lamalar etidyum bromür (1X) ile 10 dakika boyanıp ardından distile su ile yıkanmıştır. DNA hasarını gözlemlemek için floresan mikroskop kullanılmıştır. Comet puanlaması için Comet Software (v1.3, OpenComet) yazılımı kullanılmıştır. DNA hasarını ölçmek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ Kuyruk DNA} = 100 \times \text{Kuyruk DNA Yoğunluğu} / \text{Hücre DNA Yoğunluğu}$$

Comet analizinde kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- Dimetil Sülfoksit (DMSO)
- Disodyum EDTA (Na_2EDTA)
- Etidyum Bromür (EtBr)
- Fosfat Buffer Saline (PBS; Ca^{++} , Mg^{++} içermeyen)
- Sodyum Klorid (NaCl)
- Sodyum Hidroksit (NaOH)
- Triton X-100
- Trizma Base

Comet Analizi Protokolü:

1. Az rodajlı lamalar normal erime noktalı agaroz (NMP) ile tek tarafı kaplanır. 1,5 NMP 100 mL saf suda kaynatılıp 50-60°C ye soğutularak dikey jar içine dökülür. Temiz lamalar jara batırılarak (batırma esnasında jar içindeki sıvı soğuyabilir, tekrar ısıtılabilir) mümkün olduğunca yatay çekilir. Lamın alt kısmı peçeteyle silinip 1 gün kurumaya bırakılır (I. TABAKA)

2. Kan örneği alınırken kanın pıhtılaşmaması için içinde Na_2EDTA bulunan şırınga kullanılmalıdır (Şırıngaya Na_2EDTA çekilip boşaltılması sonrası şırınga çeperinde kalan miktar, alınan kanın pıhtılaşmaması için yeterlidir). Kan numuneleri balığa hasar vermeden kuyruk sapından alınmalı, taşımada dâhil soğuk ve karanlık ortam olmalıdır.

Hazır Haldeki Lamlara Kan Solüsyonunun Konulması:

➤ 0,5 mL'lik eppendorf tüplere 350 μL 'lik PBS solüsyonu alınır ve üzerine 5-7 μL kan örneği konulur (kan hücrelerine zarar vermemek için pipet ucu kesilmelidir). Sonra bu solüsyon nazikçe karıştırılır (pipetle) ve solüsyondan 10 μL alınarak 180 μL düşük erime ısıly agaroz (LMP) ile karıştırılır. 0,5 mL'lik eppendorf tüpler içinde 3-5 defa kesik uçlu pipet ile pipetlenir veya nazikçe karıştırılır (LMP önceden eritilip 37°C'de muhafaza edilmeli).

➤ Bir gün önce kurumaya bırakılan lamalar alınarak bu hazırlanan solüsyonda lamaların 2 farklı yerine toplam 75 μL damlatılarak lamel ile dikkatli bir şekilde kapatılıp +4°C'de 1 saat beklemeye alınır (II. TABAKA)

➤ Daha önceden hazırlanmış ve buzdolabında saklanmış Lysis buffer 50 mL alınıp iyice karıştırıldıktan sonra dikey jara konulur. Üzerine 500 μL Triton-X ve 5 mL DMSO eklenip iyice karıştırılır. Lamaların üzerindeki lameller alınarak bu solüsyona koyulur.

+4°C’de 1 saat beklemeye alınır. Çalışmalar mümkün mertebe florasana ışıktan uzak ve karanlık ortamda olmalıdır (III. TABAKA)

3. Pozitif kontrol için H₂O₂ (50µl %30’luk H₂O₂ + 50 ml PBS) kullanılır. Bu işlem +4°C de 10 dakika uygulanır. Bu süre sonunda PBS ile iyice yıkanır.

4. Bekleyen örnekler daha önce hazırlanıp bekletilen elektroforez buffer tanka dökülür. Miktarı tankın kapasitesine ve 25V 300 mA olacak şekilde ayarlanır. Örneğin (500 mL buffer hazırlanacaksa 2,5 µL (200 mM) EDTA ve 15 mL (10 M) NaOH 482,5 mL safsuyla karıştırılarak hazırlanır. Ancak tanklarda kullanılacak miktar tankın kapasitesine ve 25 V 300 mA’i sağlamasına bağlıdır.

5. Tanka dökülen buffer içine yerleştirilen lamalar sıcaklık dengelenmesi için 20 dakika buzdolabında karanlık ortamda bekletilir (Buffer önceden buzdolabında olursa daha kolay dengelenir). (Lamların tanklara yerleştirilmesi (-) kutup (siyah renk) (+) kutuba (kırmızı renk) doğru olmalı (Rodajlı kısım (-) tarafa doğru olmalı)

6. Tankta 20 dakika bekletilen lamalar daha sonra 25 V 300mA’de 20 dakika yürütülür. (25 V’a ayarlı güç kaynağı 300 mA olması için daha önce boş tankta buffer miktarına göre ayarlanır. Cihaz 300 mA’i gösterdiğinde lamalar tanka yerleştirilir, 20 dakika çalıştırılmadan bekletilir ve daha sonra 25V 300 mA’de yürütülür.)

7. Örnekler daha sonra içerisinde 50mL nötralizasyon buffer bulunan dikey jara alınır (içinde 50 mL solüsyon olan dikey jara daha önceden buzdolabında bulundurulmalı) ve buzdolabında 10 dk bekletilir. Daha sonra nötralizasyon buffer dökülür ve yine daha önce buzdolabında bekletilen safsu jarı içine dökülerek 10 dk saf suda bekletilir (Ortam karanlık).

8. Saf su ile yıkama işleminden sonra örnekler 1 gün süreyle kurumaya bırakılır.

9. Boyama işlemi için 1 µL etidiyum bromür 1000 µL ultra saf su içerisine konularak hazırlanır ve lamların farklı kısımlarına 50 µL olacak şekilde 2 damla damlatıldıktan sonra eldivenli olmak üzere lamların üzeri lamelle (**etidiyum bromür kanserojen) kapatılır. (Eppendorf tüp alüminyum folyo ile kapatılmalı)

10. Comet oluşumunun gözlemi için florasan mikroskop altında 20x büyütmede incelenir. Fotoğraflanır ve Comet Software (v1.3, OpenComet) yazılımında analiz edilir. Herbir örnekte (lamda) 100 örnek analizi yapılır.

2.6. Gen Ekspresyonu (Gen İfadesi)

2.6.1. RNA İzolasyonu

Kronik toksisite denemesinden önce (başlangıç kontrolü) 10 balıktan 0,5 g karaciğer ve böbrek numuneleri alınarak gen ekspresyon çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Kronik toksisite denemesinden sonra ise, her bir deneme gurubundaki 8 balıktan 0,5 g karaciğer ve böbrek numuneleri alınarak numuneler RNA izolasyonu için -80°C'de saklanmıştır. Toplam RNA'yı izole etmek için Trizol yöntemi (Thermo Fisher) kullanılmıştır. Karaciğer (30 mg) ve böbrekten (30 mg) alınan toplam 60 mg doku, her biri 1 mL Trizol solüsyonu ve 4 adet boncuk içeren Eppendorf tüplere konulmuş ve numuneler 4 dakika boyunca bilyalı homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Daha sonra örnekler üzerine 250 µl kloroform eklenerek 15 saniye kuvvetlice çalkalanmış ve 14.000 x G'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisinde oluşan fazlardan üst faz alınarak yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine izopropanol ilave edilmiş ve RNA çöktürülmesi elde edilmiştir. RNA izolasyonunun son aşamasında ortamdaki muhtemel DNA kontaminasyonunu engellemek için örnekler DNase enzimi ile muamele edilmiştir. Akabinde örneklerdeki RNA konsantrasyonu nanodrop cihazında 260 nm'de ölçülmüştür. RNA örneklerinin bütünlüğü %1 agaroz jel ile doğrulanmıştır.

2.6.2. Revers (Ters) Transkripsiyon

DNase ile muamele edilmiş RNA'dan yüksek Kapasiteli cDNA revers transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Her bir RNA numunesi (1 µg), revers transkriptaz ile karıştırılıp, 2x revers transkripsiyon ana karışımı hazırlandıktan sonra, 1x karışımı oluşturmak için 2x RT master karışımına RNA eklenmiştir. Numuneler sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve ardından 85°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Amplifikasyondan sonra, ters transkripsiyon reaksiyon ürünleri (cDNA) doğrudan RT-PZR'da analiz için hazır hale getirilmiş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.6.3. Primerler

Gökkuşluğu alabalıkları TRC, PCMX, MIT ve BRX'e maruz bırakıldıktan sonra Cu/Zn-süperoksit dismutaz (*SOD*), glutatyon peroksidaz 1 (*GPX1*), glutatyon peroksidaz tip 2 (*GPX2*), glutatyon S-transferaz A (*GSTA*), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform b (*HSP90BB*), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform a (*HSP90BA*), ısı şoku 70 kDa protein 8 izoform a (*HSC70A*) ve katalaz (*CAT*) genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılacak primerler, NCBI'de bulunan Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 6). Primerlerin düzgün çalışıp çalışmadığının kontrolü amacıyla cDNA örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanarak PZR ile çoğaltılmış ve jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Boran, 2012).

Tablo 6. Gökkuşluğu alabalığından elde edilen; Cu/Zn-süperoksit dismutaz (*SOD*), glutatyon peroksidaz 1 (*GPX1*), glutatyon peroksidaz tip 2 (*GPX2*), glutatyon S-transferaz A (*GSTA*), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform b (*HSP90BB*), ısı şoku 90 kDa protein 1 beta izoform a (*HSP90BA*), ısı şoku 70 kDa protein 8 izoform a (*HSC70A*), katalaz (*CAT*) ve Uzama faktörü 1 alfa (*EF1*) genleri için spesifik primer çiftleri.

Gen	NCBI Numarası	Erişim	Primer dizilimleri (5'→3')	Ürün boyu (bp)	Erime Sıcaklığı (°C)
SOD	AF469663.1		F-GTTGACTCTCACTGGACCCG R- TCCTCGTTGCCTCCTTTTCC	90	59,96
GPX1	NM001124525.1		F-TGGAGAGCCATTCAAGCGTT R- CTCCCCACCATTTGCTTCTGT	126	59,96
GPX2	AY622862.1		F-TGGAGAGCCATTCAAGCGTT R- CTCCCCACCATTTGCTTCTGT	126	59,96
GSTA	NM001160559.1		F-GAGGTGGGTTCTTACCTGGC R- TAGACAGCCCCAAAGCGGAAG	94	60,04
HSP90BB	AB196458.1		F-TGAAGAAATGCGCCAAGAGGA R- TCCGTCAGACTTTTCGTAGCG	174	59,83
HSP90BA	AB196457.1		F-AGCCTCACGTTTTCGAATCG R- AGATGCGTTGCCACCATTAA	157	60,03
HSC70A	AB196460.1		F-TGTCTAAGGGACCAGCAGTC R- CGTAGCTTGGAGTGGTCCTG	123	60,11
CAT	FJ226382.1		F-CAAGGCCAAGGTGTTTGAGC R- GTAAGGTCCCAGTTGCCCTC	153	59,97
EF1 Alpha	AF498320.1		F-ATGCCCCTGTACTGGATTGC R- TGGGGGCATCCTCAAGTTTC	105	60,01

2.6.4. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)

Kantitatif RT-PZR analizleri, Exicycler 96'da (gerçek zamanlı kantitatif termal blok, Kore) kullanılarak yapılmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu sonucu elde edilen cDNA örnekleri 1:10 oranında seyreltilmiş ve 3 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Enzim aktivitesinde değişiklik gösteren hedef genlerin amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri Tablo 6'da sunulmuştur. Primerlerin kendi kendine tutunma, tamamlayıcı ve ikincil yapı gibi özellikleri OligoCalc (Northwestern Üniversitesi, ABD) ile kontrol edilmiştir. Her numune için qRT-PZR'de çift örnek hazırlanmıştır. Her PZR reaksiyon karışımı (toplam 25 µl), 12,5 µL Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, BioLab), 1 µl cDNA, her primerden 10 pmol, 1 µL 20X EvaGreen (Biotium, Hayward, CA, ABD) ve 9,5 µl dH₂O içermektedir. Örnekler, 95°C'de 1 dakikalık ön inkübasyondan sonra, sırasıyla 95°C'de 20 sn, 58°C'de 20 sn, 68°C'de 45 sn inkübe edildi ve tarama sonrasında bu döngü 35 kez tekrarlanmıştır. Reaksiyonun sonunda, reaksiyonun özgüllüğünü kontrol etmek için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Her reaksiyonda, kontaminasyonu kontrol etmek için negatif kontrol analizlere dahil edilmiş, hedef ve referans genlerin primer çiftlerinin etkinliğini belirlemek için seyreltme serileri yapılmıştır. Fragment boyutunu kontrol etmek için qPCR ürünleri %1,5'lik agaroz jel üzerinde de yürütülmüştür. cDNA'nın on kat seri dilüsyonları ile hedef genler ve referans gen (Uzatma faktörü 1 alfa (*EF1*) geni ve beta aktin geni) için standart eğriler oluşturulmuştur

Her numune üç tekerrür olarak çalışılmış ve $\Delta\Delta C_T$ 'yi hesaplamak için elde edilen değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

EF1 alfa geni, hedef gen transkriptlerinin normalleştirilmesi için referans gen olarak kullanılmıştır. Hedef ve referans genlerin amplifikasyon etkinlikleri benzer olduğundan dolayı bağıl (relative) gen ekspresyonunu hesaplamak için Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır.

Referans gen (*EF1*) ile ilgilenilen gen arasındaki C_T değeri şu şekilde normalleştirildi:

$$\Delta C_T (\text{muamele edilmiş örnek}) = C_T (\text{muamele edilmiş örnekteki ilgilenilen gen}) - C_T (\text{muamele edilmiş örnekteki EF1})$$

$$\Delta C_T (\text{muamele edilmemiş kontrol}) = C_T (\text{muamele edilmemiş kontrolde ilgilenilen gen}) - C_T (\text{muamele edilmemiş kontrolde EF1})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muamele edilmiş numune}) - \Delta C_T (\text{muamele edilmemiş kontrol})$$

Normalleştirilmiş ifade oranı $2^{-\Delta\Delta C_T}$ olarak hesaplandı

2.7. İstatiksel Analiz

Deneysel veriler, her deney için ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler için IBM SPSS V22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Verilerde varyansın normalliği ve homojenliği için sırasıyla Kolmogorov-Smirnov ve Bartlett testleri kullanılmıştır. Tek yönlü genel lineer model varyans analizi ve post-hoc Tukey testi, sırasıyla kat değişimini ve çoklu karşılaştırmaları analiz etmek için kullanılmıştır. Sonuçların istatistiksel önemliliğinde olasılık değeri $P \leq 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

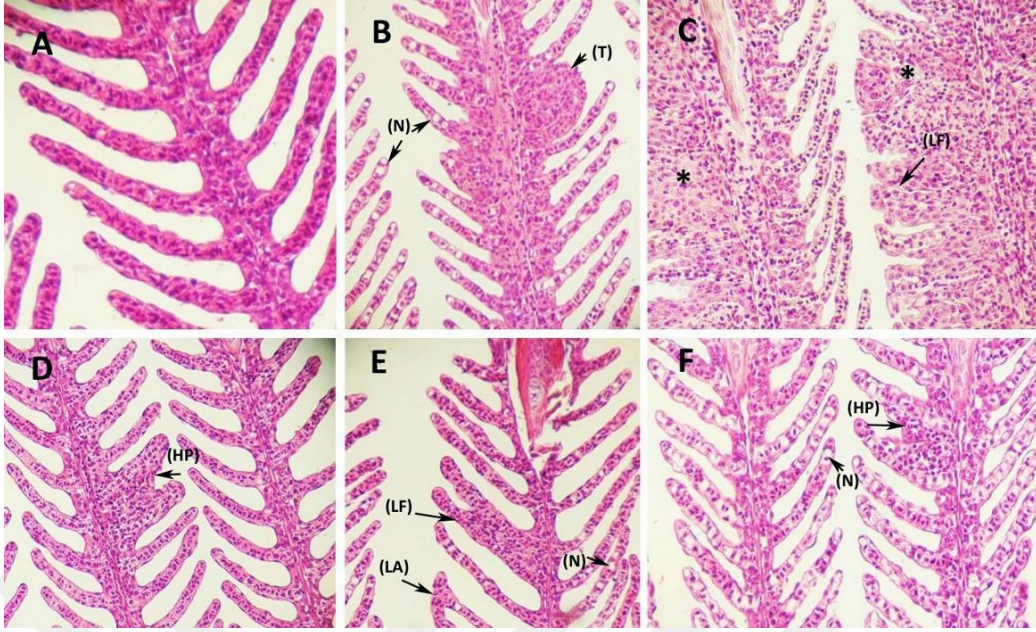
Çalışma süresince su kalitesi günlük olarak ölçülmüştür. 40 gün boyunca TRC, PCMX, MIT ve BRX'e maruz bırakılan balıklardan sekiz adedi gen ekspresyon analizi için örneklenmiştir. Genetik hasar tespiti için kan, karaciğer, böbrek; doku bozukluğu için ise karaciğer, böbrek, dalak ve solungaç örnekleri kullanılmıştır. Kimyasal maddelere maruz bırakma uygulaması sırasında balıklarda, yem almada azalma dışında anormal bir davranış gözlemlenmemiştir.

3.1. Histopatolojik İnceleme

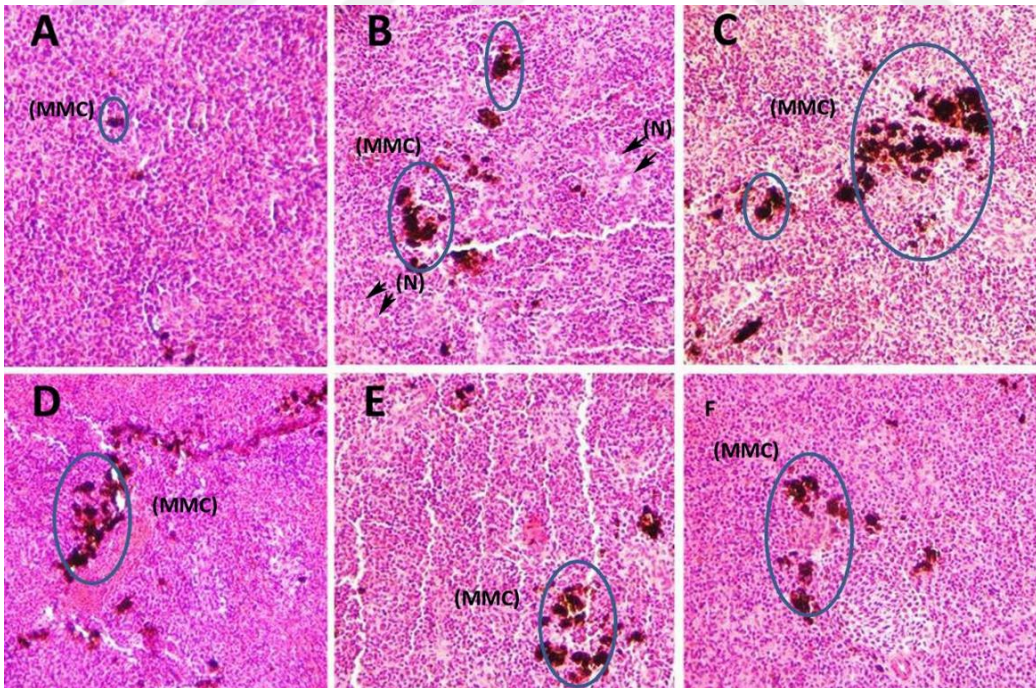
Histopatolojik inceleme için TRC, PCMX, MIT ve BRX'e kronik olarak maruz bırakılan balıkların solungaç, dalak, karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri deney bitiminden hemen sonra alınmıştır (Tablo 7). Alkol içeren kontrol gruplarında bazı lezyonlar düşük seviyede gözlenirken, normal kontrol gruplarında histopatolojik olarak herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Kimyasal maddelere maruz bırakılan balıkların solungaçlarında lamellar füzyon, hiperplazi ve epitelyal nekroz gözlenmiştir (Şekil 7). Dalak kesitlerinde melanomakrofaj merkezleri ve dalak nekrozu gözlenmiştir (Şekil 8). Karaciğerde ise farklı derecelerde piknotik çekirdek, hepatik hücre çekirdekleri ile yağ vakuollerinde degradasyon ve nekrotik hepatositler tespit edilmiştir (Şekil 9). Böbrek dokusu solungaç, dalak ve karaciğer dokusuna göre toksik maddelerden en fazla etkilenen organ olduğu belirlenmiştir. Tübüllerde bulut benzeri şişlik, renal tübül epitel hücrelerinin dejenerasyonu, glomerüler kapiller dilatasyonu, hematopoietik dokuda piknotik çekirdekler ve glomerulus dejenerasyonu böbrek dokusunda yoğun olarak saptanan semptomlar oluşmuştur (Şekil 10). Deney gruplarında tespit edilen bu semptomların tümü, alkol içeren kontrol gurubunda da düşük şiddette de gözlemlenmiştir.

Tablo 7. Gökkuşuğu alabalığının 40 gün boyunca farklı antibakteriyel ajanlara maruz kaldıktan sonra tespit edilen histopatolojik bulgular. Gözlenen lezyonlar şiddetlerine göre skorlanmıştır (-: yok,+: hafif, ++: orta, +++: şiddetli).

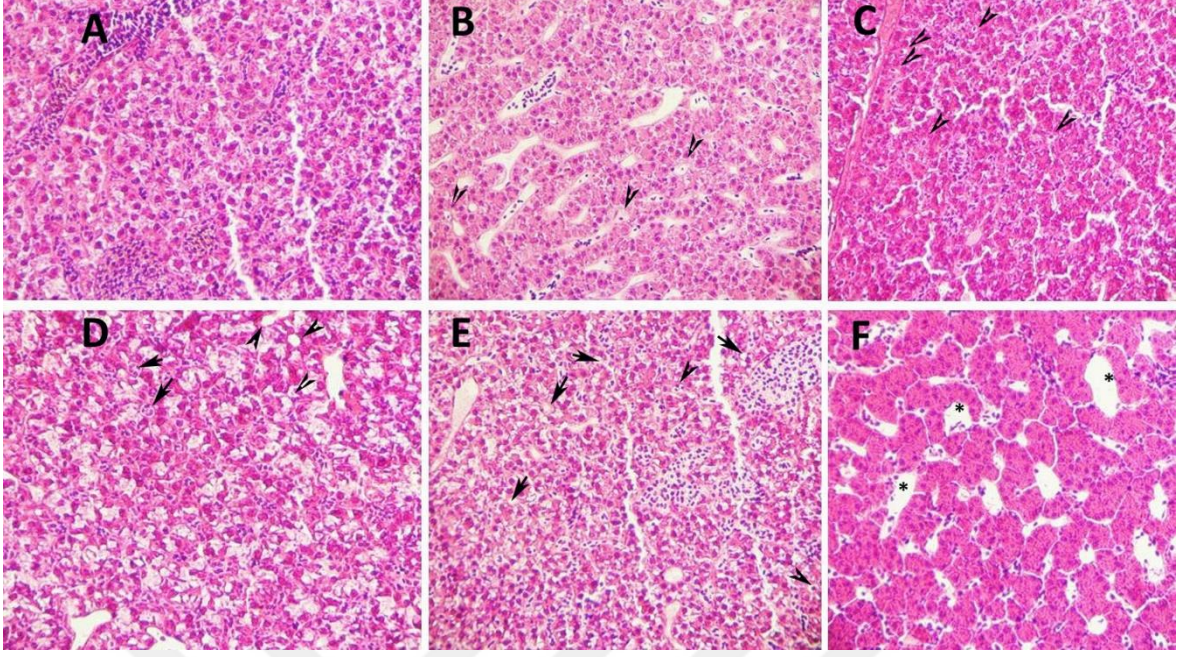
Histopatolojik etkiler	Kontrol	Kontrol (Alkol)	BRX	PCMX	MIT	TRC
Solungaç						
Lamellar Füzyon	-	+	++	-	+	+
Hiperplazi	-	+	+++	+	+	+
Epitelyal Nekroz	-	+	+	+	++	+++
Hipertrofi	-	-	+	-	+	+
Epitelyal Lifting	-	-	-	+	-	+
Ödem	-	-	-	+	-	-
Dalak						
Melanomakrofaj Merkezleri	-	+++	+++	+++	+++	+++
Dalak Nekrozu	-	-	++	-	-	-
Karaciğer						
Piknotik Çekirdek	-	-	++	-	+	-
Hepatik Hücre Çekirdeklerinde Bozulma	-	-	-	++	-	-
Yağ Vakuolleri	-	-	-	+++	+++	-
Nekrotik Hepatositler	-	-	-	-	-	+++
Böbrek						
Melanin ve Melanomakrofaj Merkezleri	-	+	++	+	++	+++
Tübüllerde Bulutsu Şişlik	-	+	+++	+++	+	+++
Renal Tübül Epitel Hücrelerinin Dejenerasyonu	-	+	+++	+++	++	+++
Glomerüler Kapiller Dilatasyon	-	+	++	++	++	+++
Hematopoiyetik Dokudaki Piknotik Çekirdekler	-	+	++	+++	++	+++
Glomerulus Dejenerasyonu	-	+	++	+++	++	+++



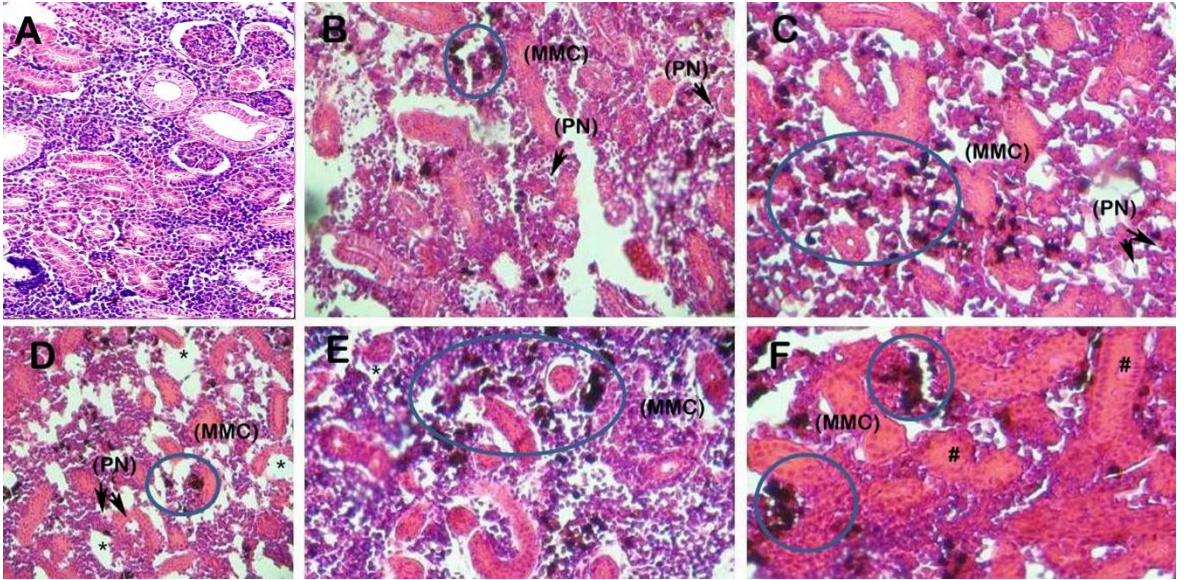
Şekil 7. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşağı alabalığı solungaçlarının histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar nekroz (N), tromboz (T), lamel füzyon (LF), geniş hiperplazik alan (*), hiperplazi (HP) ve lamel apozisyon (LA).



Şekil 8. (A) Su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşağı alabalığı dalağının histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar, nekroz (N) ve melanomakrofaj merkezi (MMC) oluşumu.



Şekil 9. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PMCX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşağı alabalığı karaciğerinin histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar piknotik nükleus (ok başı), hepatik hücre çekirdeklerinde degradasyon (ok), yağ vakuelleri (*).



Şekil 10. (A) su (kontrol), (B) alkol, (C) BRX, (D) PCMX, (E) MIT ve (F) TRC'ye maruz kaldıktan 40 gün sonra H&E ile boyanmış gökkuşağı alabalığı böbreğinin histopatolojisi. Histopatolojik lezyonlar, melanomakrofaj merkezi (MMC), piknotik çekirdek (PN), glomerulus dejenerasyonu (*) ve şişkin tübüller (#).

3.2. Comet Analizi

Her bir deneme gurubundan 1.500 kırmızı kan hücresi comet varlığı bakımından incelendiğinde (Cometin kuyruk yoğunluğu ve momenti, kuyruk göçü ve kuyruk uzunluğu) TRC, PCMX, MIT ve BRX maddelerinin balığın kırmızı kan hücrelerinde önemli DNA hasarına neden olduğu görülmüştür. Normal su içeren negatif kontrol ve su+alkol içeren negatif kontrol için DNA hasarı (% kuyruk DNA) sırasıyla 39,72 ve 127,01 iken (Tablo 8), pozitif kontrol gurubunda 313,56 olarak tespit edilmiştir. Etkileri değerlendirilen kimyasallar arasında balıkların kırmızı kan hücrelerinde en çok DNA hasarına sebep olan kimyasal MIT (DNA hasarı skoru 544,45) olarak belirlenmiştir. TRC ve PCMX kırmızı kan hücrelerinin DNA'sında benzer genotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ve oluşturdukları DNA hasarları sırasıyla 397,83 ve 421,88 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasallar arasında en az DNA hasarı oluşturan BRX (254,81) olmuştur. Comet analizi sonuçları, özellikle MIT, TRC ve PCMX konsantrasyonlarının kronik maruz bırakma denemelerinde BRX'a göre çok düşük değerlerde kullanılmasına rağmen balıkların kan DNA'sı üzerinde mutajenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Tablo 8. 40 gün süreyle kimyasala maruz bırakılan balıkların kırmızı kan hücresindeki comet assay skoru. DNA hasarı skorları (ortalama $\pm$ SD).

Uygulama	DNA Hasarı Skorları		
	Baş Yoğunluğu	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk DNA %
Negatif kontrol (dH ₂ O)	71,57 $\pm$ 11,38	28,43 $\pm$ 9,89	39,72
Negatif kontrol (dH ₂ O+ alkol)	44,05 $\pm$ 8,37	55,95 $\pm$ 7,75	127,01
Pozitif kontrol (H ₂ O ₂ , %30)	24,18 $\pm$ 6,7	75,82 $\pm$ 11,1	313,56
TRC (Alkolde Çözünmüş)	20,09 $\pm$ 7,44	79,91 $\pm$ 7,80	397,83
MIT	15,52 $\pm$ 6,66	84,48 $\pm$ 7,41	544,45
PCMX (Alkolde Çözünmüş)	19,16 $\pm$ 9,89	80,84 $\pm$ 8,71	421,88
BRX	28,17 $\pm$ 11,43	71,78 $\pm$ 12,01	254,81

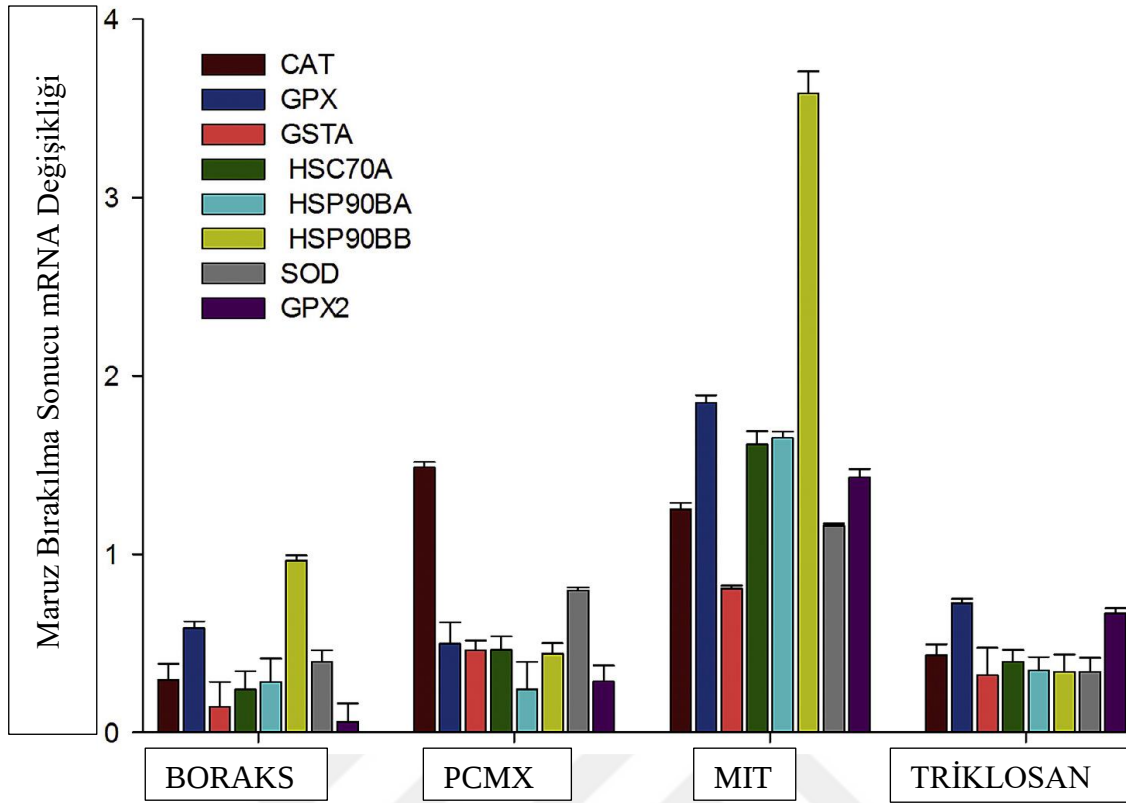
3.3. Gen Ekspresyonu

Her bir reaksiyonun etkinliği %97 ile %102 arasında değişmiştir. Agaroz jel üzerinde qPCR ürünleri yürütüldükten sonra spesifik olmayan PZR ürünü veya birden fazla fragment

gözlenmemiştir. *SOD1*, *GPX1*, *GPX2*, *GSTA*, *HSP90BB*, *HSP90BA* ve *HSC70A* genlerinin ekspresyonlarındaki kat değişimi, referans gen ve kontrol gurupları ile normalize edildikten sonra değerlendirilmiştir (Tablo 9). Normalizasyondan sonra, PCMX'e maruz kalan *GSTA* geni dışında TRC, PCMX, MIT ve BRX'e maruz kalmanın sonucu olarak *SOD*, *GPX1*, *GPX2*, *GSTA*, *HSP90BB*, *HSP90BA*, *CAT* ve *HSC70A* genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır. Balıklar PCMX'e maruz bıraktıktan sonra, *SOD*, *GPX2*, *HSP90BB* ve *HSC70A* genleri aşağı yönlü regüle (düşük düzeyde ekspresyon) olmuştur. Ayrıca BRX, PCMX ve TRC'ye maruz kalan balık *CAT* geni aşağı yönlü regüle edilirken, *GSTA* geninin ekspresyonu PCMX'ten etkilenmemiştir (Şekil 11). *GPX1* ve *HSP90BA* dışındaki tüm genler, PCMX'e maruz kaldıktan sonra aşağı yönlü regüle olmuştur. En aşağı regüle edilmiş gen, PCMX'e maruz kalan *GPX2* geni olarak tespit edilmiştir. Diğer genlerinin ise ekspresyonu artış göstermiştir. BRX'e maruz kalan balıklarda *HSP90BA* geni 2.129,69 kat ile en fazla ekspres olan gen olmuştur. En çok etkilenen diğer genler ise; PCMX için *GPX2* (0,01 kat) ve *GPX1* (593,79 kat), BRX için *CAT* (0,96 kat) ve *HSP90BA* (2.129,69 kat), MIT ve TRC için *GPX2* olarak tespit edilmiştir (sırasıyla 664,21 kat ve 786,10 kat) (Tablo 9).

Tablo 9. 40 gün süreyle triclosan (TRC), chloroxylenol (PCMX), methylisothiazolinone (MIT) ve borax'a (BRX) maruz kalan gökkuşağı alabalığının karaciğer ve böbreğindeki farklı genlerin bağıl gen ekspresyonu (kat).

Genler	Kimyasallar			
	PCMX	BRX	MIT	TRC
CAT	0,22±0,03	0,96±0,14	1,27±0,19	0,56±0,08
GPX1	593,79±89,07	957,08±143,56	209,72±31,46	626,47±93,97
GSTA	1,04±0,16	200,10±30,02	121,81±18,27	360,79±54,12
HSC70A	0,09±0,01	134,64±20,20	41,09±6,16	172,58±25,89
HSP90BA	19,83±2,98	2.129,69±319,45	316,88±47,53	640,62±96,09
HSP90BB	0,08±0,01	219,98±33,00	84,45±12,67	262,19±39,33
SOD	0,19±0,03	8,32±1,25	17,45±2,62	14,20±2,13
GPX2	0,01±0,00	629,72±94,46	664,21±99,63	786,10±117,92



Şekil 11. TRC, PCMX, MIT ve BRX maruz bırakılan Gökkuşığı alabalıklarında Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 1 (GPX1), glutathione peroxidase type 2 (GPX2), glutathione S-transferase A (GSTA), heat shock 90 kDa protein 1 beta isoform b (HSP90BB), heat shock 90 kDa protein 1 beta isoform a (HSP90BA), heat shock 70 kDa protein 8 isoform a (HSC70A) ve katalaz (CAT) genlerinde mRNA ekoresyonun kat değişiklikleri. Kat değişiklikleri, maruz kalmayan kontrol grubuyla karşılaştırılarak elde edildi. Veriler ortalama $\pm$ SEM'i temsil eder.

4. TARTIŞMA

Antimikrobiyaller, yanlış kullanımları, aşırı dozları ve zayıf emilimlerinin yanı sıra suda yüksek çözünürlükleri ve bozunmaya karşı dirençleri nedeniyle çevrede yaygın olarak bulunmaktadır (Sarmah vd., 2006; Limbu vd., 2018). Tüketici sağlığına zarar verme potansiyeli bulunan birçok antimikrobiyal ürün bulunsada bu antimikrobiyal maddelerinin çoğunun toksisitesi veya toksik mekanizmaları hakkında yeterli veri bulunmamaktadır (Yost vd., 2016). Canlılar günlük yaşamda çok çeşitli kimyasallara maruz kalmaktadır. Günümüzün önemli sorunlardan birtanesi hormon sentezinin, metabolizmanın, taşınımın ve dağıtımın değiştirilmesi yoluyla endokrin sisteme müdahale edebilen kimyasal maddelerdir (Milanović vd., 2016; Gao vd., 2021; La Merrill vd., 2020). Endokrin bozucu kimyasallar endokrin sisteminin fonksiyonlarını değiştiren ve sonuç olarak sağlam bir organizmada veya popülasyonlarında olumsuz sağlık etkilerine neden olan ekzojen bir madde veya karışım olarak tanımlanır (European Commission, 2020). Antimikrobiyal kimyasallarla ilgili çalışmaların çoğu triklosan ve triklosanın insan sağlığı üzerindeki etkilerine odaklanmaktadır. Triklosan (TRC), (5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi) fenol), ağız gargaralarında, diş macunlarında, sabunlarda, dezenfektanlarda, deodorantlarda, giyim tekstillerinde, mobilyalarda bir bileşen olarak bulunabilen sentetik, çok amaçlı bir antimikrobiyal maddedir (Dhillon vd., 2015). Ticari ürünlerdeki TRC aynı zamanda ırgasan olarak da adlandırılabilir (Lee vd., 2019). Dünya çapında yılda 1500 ton TRC üretildiği ve yılda 132 milyon litre TRC içeren ürünün yalnızca ABD'de kullanıldığı tahmin edilmektedir (Alfhili ve Lee, 2019). Muhtemelen, yüksek dezenfeksiyon nedeniyle 2019 koronavirüs hastalığının (COVID-19) patlak vermesinden bu yana üretim oranları değişmiş olabileceği düşünülmektedir (Chu vd., 2020; Ejtahed vd., 2020); Usman vd., 2020). Triklosan ve diğer kimyasalların insanlarda hormon döngülerini bozabileceğine ve kas güçsüzlüğüne neden olabileceğine dair kanıtlarda mevcuttur (Halden, 2014). TCS yavru ve yetişkin zebra balıklarının karaciğerinde MAPK ve p53 düzeyini arttırdığı görülmüştür (Liu vd., 2019). Ek olarak, iyileşme döneminde de TCS stresi azaldığında tüm türlerde AST ve ALT aktivitesinde düşüş gözlemlendiği, diğer taraftan antimikrobiyal bileşik karışımlarında suçlu canlı hücrelerinin protein yapılarında değişiklik ve *CAT*, *GST*, *SOD* ve *GPX* gibi antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunda artış meydana getirmiştir (Trombini vd., 2021) Bu nedenlerden dolayı, antibakteriyel sabunlarda kullanılan triklosan dâhil 19 kimyasal,

ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yasaklanmıştır. Antibakteriyel ürünler üreten birçok şirket, triklosan yerine benzethonium klorür, triklokarban veya kloroksilenol (PCMX) gibi kimyasalları kullanmaya başlamıştır. TRC içeren kişisel bakım ürünleri, atık sudaki TRC'nin birincil kaynağı olarak kabul edilmektedir. Atık su arıtma tesislerinin TRC üretim tesislerinde bulunmaması nedeniyle arıtılamadığından, atık sular yoluyla yüzey suyuna, yeraltı suyuna, toprağa ve nihayetinde içme suyuna ulaştığı varsayılmaktadır (Huang vd., 2014a). Atık sudan TRC'nin uzaklaştırılması büyük ölçüde kimyasalın fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (Lee 2015). TRC'nin lipofilik karakteri yüksek emilme potansiyeli ile ilgilidir. TRC çoğunlukla biyolojik bozunma veya adsorpsiyon yoluyla arıtılır. Su arıtma tesislerindeki arıtım verimliliği %99'a kadar çıkabildiği bilinmektedir (Olaniyan vd., 2016). TRC'nin biyolojik arıtımında aktif çamur prosesi, damlatmalı filtreler, oksidasyon hendekleri ve dönen biyolojik kontaktörler gibi yaygın yöntemler kullanılmaktadır. (Jagini vd., 2019). Triklosan suda bulunabilir ve konsantrasyonu göllerde $0,0118 \mu\text{g L}^{-1}$ ve atık suda $4,3 \mu\text{g L}^{-1}$ civarında bulunabilir (MDH, 2014). Triklosan özellikle yeşil algler için zehirli olmakla birlikte 1 mg L^{-1} 'in altındaki konsantrasyonlarda bile suda yaşayan hayvanlar için toksik etkili gösterebilmektedir. Bakteriler, balıklar ve kabukluların triklosan toksisitesine karşı hassasiyetleri benzer iken mikroalglerin triklosan toksisitesine hassasiyetleri daha yüksek bulunmuştur (Tatarazako vd., 2004). Ekotoksikolojik çalışmalar, LC_{50} değerlerinin balıklar için $0,26$ ile $0,54 \text{ mg L}^{-1}$ arasında ve EC_{50} değerlerinin ise kabuklular ve algler için sırasıyla $0,13$ - $0,39 \text{ mg L}^{-1}$ ve $1,4$ - $19 \mu\text{g L}^{-1}$ aralıklarında değiştiğini göstermektedir (Orvos vd., 2002; Reiss vd., 2002). TRC ile ilgili çevresel ve toksikolojik veriler, suda yaşayan organizmalara yönelik akut toksisiteye, genotoksisiteye, endokrin sistemin bozulmasına, antimikrobiyal direncin tetiklenmesine ve potansiyel insan kanserojenliğine sebep olabileceğini göstermektedir (Huang vd., 2014a; Li 2021). Ancak, TRC kullanımı ve maruz kalma limitlerine ilişkin yeterli düzenleyici değerlendirme hâlâ tamamlanmamıştır (Milanović vd., 2023). 2003 yılında şiddetli akut solunum sendromu (SARS) salgını sırasında, TRC'nin yalnızca 30 saniyelik temas süresinde virüslerin azalmasını sağladığı belirlendi (Dellanno vd., 2009). COVID-19 salgını sırasında antibakteriyel sabun ve dezenfektan kullanımının artması, TRC'ye maruz kalmanın artmasına yol açtığı rapor edilmiştir (Ejtahed vd., 2020; Usman vd., 2020). TRC'nin *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin antibiyotiklere karşı direncini tetiklemesinin yanı sıra, TRC'ye tekrar tekrar maruz kalmak aynı zamanda cilt ve bağırsak mikrobiyomunda değişikliklere ve kronik hastalıklara neden olabilir (Ejtahed vd., 2020; Subramanya vd.,

2021). Tek hücreli tatlı su alg türü olan *Euglena gracilis*'in TRC mazuriyeti sonrasında ozmotik basıncın artmasıyla hücrelerin şerit yerine daha küresel olması, morfolojik dezenformasyonların (hücre yırtılması ve bozulması) olması ve vakuol sayısında artış gibi sonuçlar ortaya çıkarmıştır (Azizullah vd., 2011; Mao vd., 2018; Xin vd., 2019; Kim vd., 2021). TRC, sucul canlılarda teratojenositeye, sitogenotoksisiteye, detoksifikasyona, metabolik enzimlerde değişikliklere ve bakterilerde direnç neden olmaktadır (Dar vd., 2022). Farklı TRC konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıklardaki çeşitli fiziksel ve nükleer değişikliklerin yüzdelik oranı, denemenin 10. gününde kontrol gruplarına göre önemli ölçüde yüksektir (Akram vd., 2022). Tilapya (*Oreochromis mossambicus*) balıklarında TRC nin etkilerinin araştırılması sonucunda da balıklar için ölümcül olabildiği ve balıkları biyokimyasal ve genetik olarak etkileme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir (Seenivasan vd., 2023). Çalışmalarda; TRC'nin etkilerine bakıldığında tek hücreli, bitkisel, hayvansal organizmalar ve hatta insanlar üzerinde çok çeşitli şekillerde etki oluşturduğu ve hatta ölümcül olabileceği görülmüştür. Bu çalışmada balıklar, 40 gün boyunca $0,48 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ miktarlarda TRC'ye maruz bırakılmıştır. Kırmızı kan hücreleri üzerinde mutajenik etkilere; böbrek, karaciğer, dalak ve solungaçlar üzerinde ise histopatolojik etkilere neden olan TRC, gen ekspresyonunu *CAT* geni için 0,56 kat ile *GPX2* geni için 786,10 kat arasında artış gözlenmiştir. Bu nedenle, suda bulunan düşük konsantrasyondaki TRC bile suda yaşayan organizmalar için çok tehlikeli olabilmektedir.

Su ortamında bulunan kişisel bakım ürünleri; kalıntı, biyolojik birikim, sucul yaşam ve dolaylı olarak insan yaşamını etkileyen toksikolojik olaylara neden olabilmektedir (Daughton ve Ternes 1999; Ebele vd., 2017). Kişisel bakım ürünlerinin başlıcaları antiseptikler, biyositler, kozmetikler, modifiye edilmiş hormonlar, steroidler, parfümler, şampuanlar ve UV filtreleridir (Gogoi vd., 2018; Nassar ve Younis 2019).

Kozmetik ve dezenfektan ürünlerinde kullanılan birçok etken madde bulunmaktadır. PCMX bu maddeler arasında en sık kullanılanlar arasında yer almaktadır (Nassar ve Younis 2019; El-Badawy ve El-Desoky 2018). PCMX, antiseptik ve dezenfektan özelliklere sahip bir fenolik türevidir (Ghanem vd., 2012; Zhou vd., 2019). PCMX ile ilgili daha önce yapılan araştırmalar bize PCMX'in tatlı suyu nasıl etkilediği, atık su arıtma tesislerinden salındıktan sonra tatlı suda yaşayan organizmaların ve nasıl etkilendiği hakkında bilgi vermektedir. PCMX atık su arıtma sisteminden uzaklaştırılabilir ancak kloroksilenol'ün atıksu arıtma tesislerinin bir parçası olan faydalı biyokütle üzerinde herhangi bir etkisi rapor edilmemiştir (Ma vd., 2021). Kloroksilenol'ün suda çözünürlüğü ve uçuculuğu çok düşüktür (EPA, 1994).

Ancak ortamdaki kalıcılığı sınırlıdır ve biyolojik bozunma ile 6 günde tamamen ortamdan uzaklaştırılabilir (ACI, 2014). Sıvı sabunlarda, kozmetiklerde, topikal ilaçlarda ve antiseptiklerde aktif bir bileşen olarak kullanılan PCMX ile yapılan in vitro ve in vivo toksikolojik çalışmalar, PCMX'in genotoksik etkilerinin olmadığını göstermektedir (Yost vd., 2016). Ayrıca, daha kısa süreli oral yoldan maruz bırakma çalışmalarında, bu kimyasalın herhangi bir genetik etkisi görülmemiştir (EPA, 2009). Kronik dermal maruziyetten sonra genotoksik ve karsinojenik etki göstermez (Momma vd., 1988). PCMX gibi halojenli fenollü bileşikler, özellikle kedilerde ve bazı hayvanlarda tamamen sindirilmedikleri için toksik etki gösterebilir (Yost vd., 2016; URL-9). PCMX'e maruz bırakılan sıçanlarda, testis dokularında histopatolojik değişiklikler ile testosteron ve östradiol seviyelerinde anlamlı azalmalar görülmüştür (El Naggar vd., 2022). PCMX'in, nehir ağzı rotiferi olan *Brachionus koreanus*'ta hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu başlattığı ve in vivo olarak çeşitli olumsuz etkiler meydana getirdiği ve yaşam parametreleri, yüzme davranışı ve üreme için gerekli moleküler tepkiler üzerinde zararlı etkiler yarattığı görülmüştür (Won vd., 2022). PCMX'in ortamdan uzaklaştırması ve daha az toksit metabolitlere dönüştürülmesi konusunda *Cunninghamella elegans* ve *Trametes versicolor* mantarlarının çevresel biyolojik iyileştirme için potansiyel araçlar olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Nowak vd., 2021). PCMX'in arıtma üzerine yapılan çalışmada, biyolojik arıtmanın PCMX'i evsel atık sudan uzaklaştırmada çok etkili olduğu görülmüştür (Au vd., 2023).

Öte yandan, bu çalışmada elde edilen sonuçlar PCMX'in gökkuşağı alabalığının kırmızı kan hücreleri üzerinde mutajenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca 40 gün boyunca $4,2 \pm 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ PCMX'e maruz bırakılan balıklarda, *CAT*, *HSC70A*, *HSP90BB*, *SOD*, *GPX2* gen ekspresyonları aşağı yönlü regüle edilirken, *GPX1* ve *HSP90BA* genleri yukarı yönlü regüle edilmiş, *GSTA* geni ise regüle olmamıştır. Solungaçlarda lezyon ve ödem; karaciğerde hepatik hücre çekirdeklerinde ve yağ vakuollerinde bozulma; tübüllerde bulut benzeri şişlik, renal tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon, glomerüler kapillerlerde genişleme, hematopoietik dokuda piknotik çekirdekler ve böbrekte glomerulus dejenerasyonu gibi histopatolojik etkiler gözlenmiştir. Böylece PCMX, gen regülasyonunu ve dokunun yapısını etkiler ve kırmızı kan hücrelerinde genotoksisiteye neden olabilmektedir.

Metilizotiazolinon (MIT) ve metilkloroizothiazolinon (CMIT) çeşitli ürünlerde koruyucu olarak sıklıkla birlikte kullanılmaktadır (Yazar vd., 2011). MIT'in çok düşük konsantrasyonları bile alerjik tepkilere neden olabilir (Castanedo-Tardana ve Zug, 2013). Bu

bileşenlere kronik maruz kalınması durumlarında doz düşüklüğü her zaman zararsızlık anlamına gelmemektedir (Boyapati vd., 2013). Mevcut çalışmalar, kozmetik ürünlerde 100 ppm MIT'in tüketici için güvenli olmadığını göstermektedir (SCCS, 2014). MIT'in memeli doku kültürlerindeki nöronların in vitro testlerinde nörotoksik olduğu ve ayrıca özellikle balıklar için bilinen bir çevresel toksin olduğu gösterilmiştir (Yazar vd., 2011). Önemli bir yem besin kaynağı olan bezelye bitkisine (*Pisum sativum spp.*) uygulanmış olan MIT, bazı biyokimyasal parametrelerde değişiklikler oluşturmuştur (Yuksel vd., 2022). Sıçanlarda yapılan gelişimsel ve kronik beslenme/karsinojenisite çalışmalarında kaydadeğer bir etki ile karşılaşılmamıştır (EPA, 1998). Farelerde, CMIT ve MIT karışımı, solunum yolları ile akciğerlere ulaşarak akciğer hasarına neden olmuştur (Song vd. 2022). Güney Kore'de 1994'ten 2011'e kadar toplam 41 ev tipi nemlendirici dezenfektanın, akciğer hasarı ve ölümcül sağlık etkileri geliştirmesi nedeniyle yasaklandığı bildirilmiştir. Nemlendirici dezenfektanlardan olan CMIT ve MIT karışımının, nemlendirici dezenfektanla ilişkili akciğer hasarı olarak adlandırılan, yaygın akciğer fibrozu hastalığına neden olduğu klinik olarak doğrulanmıştır (Kim vd., 2022). Su piresinin CMIT ve MIT'e, düşük konsantrasyonlarda maruziyetinde bile ciddi üreme toksisitesine neden olduğu ve aynı zamanda bu antimikrobiyallerin su pirelerinde (*Daphnia magna*); proteomik değişiklik, DNA hasarı ve DNA metilasyonu dahil olmak üzere çok yönlü olumsuz etkileri görülmüştür (Kim ve Choi, 2023). Yine üreticilerce yaygın olarak kullanılan iki formülasyon olan CMIT/MIT (3:1) ve MIT'nin *Daphnia pulex*'e (Cladocera) yönelik akut toksisitesi değerlendirilerek, LC₅₀ değerleri CMIT/MIT karışımı için 0,10 ila 1,84 mg L⁻¹ arasında ve MIT için 0,68 ila 2,84 mg L⁻¹ arasında bulunmuştur (Wagner-Deyries vd., 2023). Ancak, çalışmamızda kullanılan kimyasallar arasında balıklarda en fazla genotoksik etkiye sebep olanının, düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına rağmen, MIT olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda MIT'a maruz bırakılan balıklarda incelenen tüm genler yukarı yönlü regüle edilmiş ve en çok etkilenen gen, ekspresyonu 629,72 kat artan *GPX2* olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından yasaklanan triklosan gibi antimikrobiyal maddelerin yerine, MIT gibi daha az zararlı olarak algılanan alternatif kimyasalların gıda endüstrisinde kullanılması öngörülmektedir (Nowak-Lange vd., 2022) Ayrıca, Avrupa Komisyonu tarafından yapılan düzenlemelerde, piyasadaki vücut ürünlerinde MCI ve MIT karışımı kullanılması da yasaklanmıştır (Sherry vd., 2016). Atık su arıtma tesislerindeki atık suyun, antimikrobiyallerin tam olarak uzaklaştırılmadan deşarj edilmesi, alıcı ortamda kalıntı birikmesine yol açmaktadır (Nowak-Lange vd., 2022). MIT'in mikroorganizmalar

tarafından biyolojik olarak parçalanması hakkında, bu antimikrobiyal maddenin biyotransformasyonunun yalnızca başlangıç aşamaları bilinmektedir. MIT'i metabolize etme yeteneği sergileyen az sayıdaki mikroorganizma esas olarak çeşitli filamentli mantar türlerini içermektedir (Nowak vd. 2020; Gomes vd., 2018).

Bor, besin zincirine öncelikle bitkiler vasıtasıyla alınır ve buna bağlı olarak bitkilerdeki biyoyararlanımı borun insanlardaki ve hayvanlardaki toksisitesi açısından belirleyici olur (Brdar-Jokanović, 2020). Bitkilerin bora aşırı maruziyeti sonucunda ise toksisite oluşabilir (Christensen, 1934; Eaton, 1944). Şimdiye kadar BRX'in akut toksisitesinin düşük olduğu ve herhangi bir genotoksik veya karsinojenik etki potansiyelinin olmadığı biliniyordu. Yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu içme sularında bile borun insanlardaki toksisitesi nadirdir (Sayli vd., 2003). Yüksek dozların akut alımı ise ishale, dermatite ve uyuşukluğa neden olabilmektedir (Linden vd, 1986). İnsanlarda kronik bor toksisitesi ise nörolojik etkiler, böbrek hasarı, iştah azalması, vücut ağırlığında azalma ve testiste kalıcı olmayan histolojik etkiler ile üreme aktivitesinde düşüklük şeklinde ortaya çıkmaktadır (HERA, 2005; Uluisik vd., 2018). Öte yandan, son yıllarda yapılan çalışmalar BRX'in konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sucul yaşam üzerinde genotoksik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Gülsoy vd., 2015). BRX'in farklı aktivasyon ortamlarında 3mM konsantrasyonda kullanılması Gökkuşacağı Alabalığı ve Anadolu Alabalığı (*Salmo rizeensis*) ve Çoruh Alabalığında (*Salmo coruhensis*), sperm hareketliliğinin, doğurganlığının ve, kuluçka oranlarının yüksek olmasını sağladı. Ancak BRX konsantrasyonunun 3mM dan daha fazla olduğu durumlarda sperm hareketliliğinde önemli derecede azalma görülmüş ve bu duruma sebep te BRX'in toksik etkisi olabilmektedir (Kocabaş ve Kutluyer., 2017; Kutluyer ve Kocabaş., 2017). Zebra balığı (*Danio rerio*) farklı süre ve konsantrasyonlarda BRX'a maruz bırakıldığında, kırmızı kan hücrelerinin kuyruk yüzdesindeki maksimum artış 96 saat sürede ve 64 mg L⁻¹ konsantrasyonda görülmüştür (Gülsoy vd., 2015). Gülsoy vd., (2015)'nin sonuçlarına benzer şekilde, bizim çalışmamızda da 40 gün boyunca 8,9±1,8 mg L⁻¹ BRX'a maruz bırakılan balıkların kırmızı kan hücrelerinde DNA hasarı tespit edilmiştir.

Yüzey sularındaki boraks konsantrasyonları, farklı ülkelerde <0,001 ila 7 mg L⁻¹ aralığında olup ortalama değeri 0,6 mg L⁻¹'in altındadır (WHO, 1998). Topal vd., (2016) BRX'in gökkuşacağı alabalığı için toksik olabileceğini ve BRX'e akut maruz bırakılan balıkların solungaç, böbrek ve kas dokularında histopatolojik hasar oluşabileceğini göstermiştir.

Balık eritrositinden yapılan comet analizi, atık sulardan etkilenen su ortamlarını izlemek için kullanılabilir (SanJuan-Reyes vd., 2015). Bu analiz mutajenik hasarları belirlemeye özgü bir analiz yöntemi değildir, bu nedenle kirleticilerin genotoksisitesini yerinde test ederken yanlış pozitif sonuçlar elde etmek mümkündür (Bagdonas, 2007). Eritrosit bazlı comet testi, elektrikli balık (*Apteronotus bonapartii*) üzerinde benzenin genotoksisitesini ve varsayılan mutajenik etkilerini belirlemek için de kullanılabilir (Bucker vd., 2012). Sana vd., (2016), pestisit *Cirrhinus mrigala*'nın kan eritrositleri üzerindeki genotoksik etkisini belirlemiştir. Demir vd. (2015), gökkuşağı alabalığının periferik kan hücrelerinde besin kirliliği kaynaklı genotoksisiteyi comet analizi kullanarak test etmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasının sonuçları, antibakteriyel kimyasalların balık eritrositlerindeki DNA hasarı düzeyi üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturmuştur. Comet analizi sonuçlarına göre BRX'in, çalışmada kullanılan diğer kimyasallara göre daha az zararlı olduğu tespit edilmiştir. Aktif karbon, atık su ve yeraltı suyu kaynaklarında bor gibi kirleticilerin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Melliti vd., 2020; Goren vd., 2022). Aktif karbonun sitrik veya tartarik asit ile doyurulması borun tutunma kapasitesini arttırmıştır (Kluczka vd., 2007a; 2007b). Atık sularda da bor'u çöktürmek için kullanılan organik ve inorganik kimyasallar bor seviyelerini $<400 \text{ mg L}^{-1}$ 'ye düşürebilmektedir (Remy vd., 2005).

Antimikrobiyaller hem su hem de insan üzerinde antibakteriyel direnç yönünden incelenmiştir (Rodriguez vd., 2020). Bununla birlikte, antimikrobiyallerin sucul organizmalar (omurgalılar, omurgasızlar, siyanobakteriler ve mikroalgler) üzerindeki etkilerine dair çok az bilgi mevcuttur (Hampel vd., 2016; Trombini vd., 2021)

5. SONUÇLAR

2000 ile 2015 yılları arasında antimikrobiyal tüketiminde %65'lik bir artış olmuştur (Bortone vd., 2021). Son zamanlarda, COVID-19 nedeniyle yaşanan pandemide de dezenfektanların ve dolayısıyla antimikrobiyallerin kullanımında artış meydana gelmiştir. Bu nedenle antimikrobiyal ilaçların izlenmesi için gerekli klavuzların geliştirilmesi gerekmektedir (Nippes vd., 2021). İspanya'da bir hastanede, COVID-19 salgını sonucunda mantar enfeksiyonlarının arttığı ve buna bağlı olarak yoğun bakım ünitelerinde antifungal tüketiminin 2020 yılında bir önceki yıla göre %75 arttığı belirtilmiştir. İnsan ilaçlarında antiviral ve antiparaziterlerin tüketimi ve buna bağlı olarak etkileri analiz edilmemiştir ve ülkelerde bunların tüketimine ilişkin bilgiler yeterli düzeyde değildir (Adriaenssens vd., 2011; Nannou vd., 2020). Antimikrobiyallerin yüksek tüketimi ve bunların insanlar ve hayvanlar tarafından düşük emilimi bunların sürekli olarak veya doğrudan yüzey sularına deşarj edilmesine neden olmaktadır (Li vd., 2020; Felis vd., 2019). Atık su arıtma tesislerinde uygulanan geleneksel arıtmalar, bu antimikrobiyal bileşiklerin çoğunun giderilmesinde etkisizdir (Avila vd., 2021). Antimikrobiyallerin çeşitleri ve tespit edilen seviyeleri, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, Atık su arıtma tesislerinde düşük oranlarda uzaklaştırılan antimikrobiyal maddeler, çeşit ve miktar açısından verimli uzaklaştıramadığının göstergesidir. Bu maddelerin fazlalığında birçok etmen rol almaktadır. Yine Covid-19 salgını sebebiyle artan dezenfektan kullanımı da sucul çevredeki antimikrobiyal madde konsantrasyonlarında artışa sebep olabilir.

Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi antimikrobiyal maddeler genotoksisite, canlılarda hareketlilik, büyüme inhibisyonu, embriyotoksisite, nörotoksisite, kuluçkada anormallik, endokrin bozucu etkiler ve yaşam süresi gibi özellikleri olumsuz yönde etkilemektedir. TRC, PCMX, MIT'in doğaya ve canlılara etkilerinden dolayı bazı ülkelerde yasaklanmış veya kullanımında kısıtlamaya gidilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen verilere göre TRC, PCMX, MIT'in balıklar için toksik olabileceği ve balıklar üzerinde genotoksik etkiye neden olabileceği söylenebilir. BRX'in de kronik maruz bırakılma durumunda balıklarda çalışılan diğer kimyasallar ile aynı etkiyi gösterebileceği görülmektedir. Bu nedenle bu bileşiklerin sucul ortamdaki genotoksik, mutajenik ve diğer potansiyel etkileri değerlendirilmelidir. Bu kimyasalların alıcı su ortamlarındaki kalıntılarının izlenmesi çevreye olan etkilerinin azaltılması açısından oldukça önemlidir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma, gökkuşağı alabalıklarına uygulanan TRC, PCMX, MIT ve BRX'in kronik toksik etkisinin yüksek olduğunu göstermektedir. Kimyasalların kullanımı ve alıcı su ortamlarına salınımı azaltılmalıdır. Ayrıca bu kimyasalları temizlik amacıyla kullanan kişilerin sucul ortamı korumak için daha dikkatli olmaları gerekir. Diğer bir yandan antimikrobiyal bileşiklerin su ekosistemlerine sürekli girişi, gelecek açısında büyük sorunlara yol açabilecek küresel bir sorundur. Ülkeler, antimikrobiyallerin tüketimi üzerinde daha fazla kontrole sahip olmalıdırlar. Kişisel bakım ürünlerinin pazardaki gelişimi, yaygın kullanımı ve sürekli piyasaya sürülmesi nedeniyle, çevresel verilerinin ve mikrobiyal biyolojik bozunma mekanizmalarının ayrıntılı şekilde bilinmesi gerekir. Antimikrobiyallerin, kullanıldığı ticari ürünlerdeki etiket bilgilerinin daha anlaşılır şekilde olması ve bununla kamu otoritesi tarafından denetlenmesi, tüketicilerin doğru ürünleri seçmesine yardımcı olacaktır.

Bu maddelerin doğaya zararsız hale getirilmesi veya tamamen ortadan kaldırması için atık su arıtma tesislerinde bu bileşiklerin su ekosistemlerine girişini engelleyecek hem ekonomik hemde etkili yeni teknolojilerin uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Abdulğanioğlu, S. (2014). Antimikrobiyal Kimyasal Maddelerin Gökkuşığı Alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) Akut Toksisitelerinin Belirlenmesi. *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.*
- ACI, 2014. American Cleaning Institute. FDA Consumer Antiseptics Rule: FDA Request for Data on Safety and Efficacy of Chloroxylenol. <http://www.cleaninginstitute.org>.
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., & Sturve, J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46(9-10), 1485-1489.
- Adriaenssens, N., Coenen, S., Versporten, A., Muller, A., Vankerckhoven, V., & Goossens, H. (2011). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): quality appraisal of antibiotic use in Europe. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(suppl_6), vi71-vi77.
- Aerts, O., Goossens, A., Lambert, J., & Lepoittevin, J. P. (2017). Contact allergy caused by isothiazolinone derivatives: an overview of non-cosmetic and unusual cosmetic sources. *European Journal of Dermatology*, 27, 115-122.
- Aiello, A. E., Marshall, B., Levy, S. B., Della-Latta, P., & Larson, E. (2004). Relationship between triclosan and susceptibilities of bacteria isolated from hands in the community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(8), 2973-2979.
- Aiello, A. E., Marshall, B., Levy, S. B., Della-Latta, P., Lin, S. X., & Larson, E. (2005). Antibacterial cleaning products and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1565.
- Akan, T. (2012). Organofosforlu pestisitlerin arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) ve zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki in vitro genotoksik etkilerinin comet testi ile araştırılması (Doctoral dissertation, Marmara Üniversitesi (Turkey)).
- Akbulut, B., Şahin, T., Erteken, A., Aksungur, M., & Gündoğan, N. (1999). Deniz kafeslerinde yetiştirilen alabalıklarda ekonomik başlangıç ağırlığının tespiti projesi. TAGEM/IY/96/127004.
- Akça, A., Kocabaş, M., & Kutluyer, F. (2021). Glyphosate disrupts sperm quality and induced DNA damage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 39(4), 413-422.
- Akram, R., Ghaffar, A., Hussain, R., Khan, I., de Assis Santana, V. L., Mehmood, K., ... & Zhu, H. (2022). Hematological, serum biochemistry, histopathological and mutagenic impacts of triclosan on fish (bighead carp). *Agrobiological records*, 7, 18-28.

- Albay, A. El Antiseptiklerinde Cilt Koruyucu Maddeler: Katkıları Nelerdir? Antiseptik Etkinliğinde Değişiklik Yapar mı? El Antiseptiklerinde Kombinasyonlar: Farkları Nelerdir? (2005) 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi: 41-58.
- Albuz, Ö., Dülger, D., Tunali, B. Ç., Aydın, F., Yalcin, S., & Türk, M. (2019). Effects of B₂O₃ (boron trioxide) on colon cancer cells: our first-step experience and in vitro results. *Turkish Journal of Biology*, 43(3), 209-223.
- Alfhili, M. A., & Lee, M. H. (2019). Triclosan: an update on biochemical and molecular mechanisms. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. Altinok, I., 2004. Toxicity and Therapeutic Effects of Chloramin-T for Treating Flavobacterium columnare Infection of Goldfish, *Aquaculture*, 239, 47-56.
- Altinok, I. (2004). Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating Flavobacterium columnare infection of goldfish. *Aquaculture*, 239(1-4), 47-56.
- Altinok, I., Capkin, E., & 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.
- Altinok, I., Capkin, E., & Boran, H. (2012). Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 102(1), 61-67.
- Aly, R., & Malbach, H. I. (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), 173-177.
- Anselmi, C., Ettorre, A., Andreassi, M., Centini, M., Neri, P., & Di Stefano, A. (2002). In vitro induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1, 2-pentanediol. *Biochemical pharmacology*, 63(3), 437-453.
- Arnold, H., Pluta, H. J., & 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(1-2), 39-52.
- Atamanalp, M., 2004. Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Yayınlanmamış.
- Au, C. K., Chan, K. J., Chan, W., & Zhang, X. (2023). Occurrence and stability of PCMX in water environments and its removal by municipal wastewater treatment processes. *Journal of Hazardous Materials*, 445, 130550.
- Avila, C., García-Galán, M. J., Borrego, C. M., Rodríguez-Mozaz, S., García, J., & Barceló, D. (2021). New insights on the combined removal of antibiotics and ARGs in urban wastewater through the use of two configurations of vertical subsurface flow constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 755, 142554.

- Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Yalvac, M. E., Emre, S. H., Karaca, C., & Muslumanoglu, M. (2011). Body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Medical Sciences*, 8(8), 653.
- Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Erdem, M., Muslumanoglu, M., Yardımcı, E., & Bektasoglu, H. (2013). Mechanism of body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Endocrinology*, 2013.
- Azizullah, A., Richter, P., & Häder, D. P. (2011). Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, 20, 1442-1454.
- Bagdonas, E., & Lazutka, J. R. (2007). Evaluation of DNA damage by means of the comet assay and micronucleus test in erythrocytes of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) infected with ulcerative disease. *Biologija*, 53(3).
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2004). Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science & technology*, 38(2), 390-395.
- Baranowska, I., & Wojciechowska, I. (2013). The Determination of Preservatives in Cosmetics and Environmental Waters by HPLC. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(6).
- Başaran, N., Duydu, Y., & Bolt, H. M. (2012). Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandırma, Turkey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), 165-167.
- Başaran, N., Duydu, Y., Üstündağ, A., Taner, G., Aydin, S., Anlar, H. G., ... & Meyer, S. (2019a). Evaluation of the DNA damage in lymphocytes, sperm and buccal cells of workers under environmental and occupational boron exposure conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 33-39.
- Başaran, N., Duydu, Y., Üstündağ, A., Taner, G., Dilsiz, S. A., Anlar, H. G., ... & Bolt, H. M. (2019b). Environmental boron exposure does not induce DNA damage in lymphocytes and buccal cells of females: DNA damage in lymphocytes and buccal cells of boron exposed females. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 53, 150-153.
- BBC News. 2003. Fears over antibacterial ingredient. Published 4-15-03, BBC MMIV. <http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2/hi/health/2950867.stm> > (Accessed 04/18/23).
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., & Le Bot, B. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1044-1065.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., & Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water. *Environmental science & technology*, 43(3), 597-603.

- Bhargava, H. N., & Leonard, P. A. (1996). Triclosan: applications and safety. *American journal of infection control*, 24(3), 209-218.
- Bilgehan, H. (1989). Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi, Barış Yayınları.
- Bilgehan, H., (2002) Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 213-219.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., & Provini, A. (2009). In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 91(3), 238-244.
- Bohmont, B. L. (1990). *The standard pesticide user's guide*. Regents/Prentice Hall.
- Bollmann, U. E., Fernández-Calviño, D., Brandt, K. K., Storgaard, M. S., Sanderson, H., & Bester, K. (2017). Biocide runoff from building facades: Degradation kinetics in soil. *Environmental science & technology*, 51(7), 3694-3702.
- Boran, H., Altinok, I., & Capkin, E. (2010). Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue and Cell*, 42(3), 158-164.
- Boran, H. (2012). Nanopartiküllerin zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları üzerine olan etkilerinin gen ekspresyon yöntemiyle belirlenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Boran, H., Capkin, E., Altinok, I., & Terzi, E. (2012). Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(3), 175-179.
- Bortone, B., Jackson, C., Hsia, Y., Bielicki, J., Magrini, N., & Sharland, M. (2021). High global consumption of potentially inappropriate fixed dose combination antibiotics: Analysis of data from 75 countries. *PLoS One*, 16(1), e0241899.
- Boyapati, A., Tam, M., Tate, B., Lee, A., Palmer, A., & Nixon, R. (2013). Allergic contact dermatitis to methylisothiazolinone: exposure from baby wipes causing hand dermatitis. *Australasian Journal of Dermatology*, 54(4), 264-267.
- Boyvat, A., & Kalay Yildizhan, I. (2021). Patch test results of the European baseline series among 1309 patients in Turkey between 2013 and 2019. *Contact Dermatitis*, 84(1), 15-23.
- Brady, L. M., Thomson, M., Palmer, M. A., & Harkness, J. L. (1990). Successful control of endemic MRSA in a cardiothoracic surgical unit. *Medical journal of Australia*, 152(5), 240-245. 152, 5, 5-240.
- Brausch, J. M., & Rand, G. M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532.

- Brdar-Jokanović, M. (2020). Boron toxicity and deficiency in agricultural plants. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1424.
- Bruch, M. K. (1996). Chloroxylenol: an old-new antimicrobial. *Handbook of disinfectants and antiseptics*, 265-294.
- Brunk, C. F., Li, J., & Avaniss-Aghajani, E. (2002). Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction. *Current Issues in Molecular Biology*, 4(1), 13-18.
- Bucker, A., Carvalho, M., Conceição, M., & Alves-Gomes, J. (2012). Micronucleus test and comet assay in erythrocytes of the Amazonian electric fish *Apteronotus bonapartii* exposed to benzene. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 7(1).
- Burcham, P. C. (2013). *An introduction to toxicology*. Springer Science & Business Media.
- Burgos, R. M., Biagi, M. J., Rodvold, K. A., & Danziger, L. H. (2018). Pharmacokinetic evaluation of meropenem and vaborbactam for the treatment of urinary tract infection. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(10), 1007-1021.
- Caracciolo, A. B., Topp, E., & Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 106, 25-36.
- Carey, D. E., & McNamara, P. J. (2015). The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Frontiers in microbiology*, 5, 780.
- Castanedo-Tardana, M. P., & Zug, K. A. (2013). Methylisothiazolinone. *Dermatitis*, 24(1), 2-6.
- Chang, M. W., & Nakrani, R. (2014). Six children with allergic contact dermatitis to methylisothiazolinone in wet wipes (baby wipes). *Pediatrics*, 133(2), e434-e438.
- Chen, X., Xu, B., Han, X., Mao, Z., Chen, M., Du, G., ... & Xia, Y. (2015). The effects of triclosan on pluripotency factors and development of mouse embryonic stem cells and zebrafish. *Archives of toxicology*, 89, 635-646.
- Chu, W., Fang, C., Deng, Y., & Xu, Z. (2020). Intensified disinfection amid COVID-19 pandemic poses potential risks to water quality and safety. *Environmental science & technology*, 55(7), 4084-4086.
- Christensen, J. J. (1934). Non-parasitic leaf spots of barley. *Phytopathology*, 24, 726-742.
- Ciniglia, C., Cascone, C., Giudice, R. L., Pinto, G., & Pollio, A. (2005). Application of methods for assessing the geno-and cytotoxicity of triclosan to *C. ehrenbergii*. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 227-232.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01551.x>. PMID 2292521.

- Coogan, M. A. (2007). *Bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a north Texas wastewater treatment plant receiving stream and effects of triclosan on algal lipid synthesis*. University of North Texas.
- Cotelle, S. & Ferard, JF. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- Crow, W. D., & Leonard, N. J. (1965). 3-Isothiazolone-cis-3-Thiocynoacrylamide Equilibria1, 2. *The Journal of Organic Chemistry*, 30(8), 2660-2665.
- Çelikkale, M.S., Atay D., Büyükhatipoğlu, Ş. (1982). Konuklar Beşgöz Gölünde Ağ Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliğinde Farklı Stok Oranlarının Gelişme ve Yem Değerlendirme Üzerine Etkisi. *Doğa Bilim Dergisi*, 5, 147-157.
- Dar, O. I., Aslam, R., Pan, D., Sharma, S., Andotra, M., Kaur, A., ... & Faggio, C. (2022). Source, bioaccumulation, degradability and toxicity of triclosan in aquatic environments: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102122.
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental health perspectives*, 107(suppl 6), 907-938.
- De Groot, A., & Herxheimer, A. (1989). Isothiazolinone preservative: cause of a continuing epidemic of cosmetic dermatitis. *The Lancet*, 333(8633), 314-316.
- Degryse, F. (2017). Boron fertilizers: use, challenges and the benefit of slow-release sources—a review. *Journal of Boron*, 2(3), 111-122.
- Dellanno, C., Vega, Q., & Boesenberg, D. (2009). The antiviral action of common household disinfectants and antiseptics against murine hepatitis virus, a potential surrogate for SARS coronavirus. *American Journal of Infection Control*, 37(8), 649-652.
- Demir, E., Turna, F., Aksakal, S., Emre, Y., Emre, N., Yağcı, A., & Kaya, B. (2015). The comet assay using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for the detection of nutrient pollution generated from overfed fish farms in the esen stream. *Fresenius Environ. Bull*, 24(11), 3665-3671.
- Denyer, S., Hodges, N., & Gorman, S. (2004). Introduction to pharmaceutical microbiology. *Hugo and Russell's*, 3.
- Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(2): 219-31.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S. K., Cledón, M., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2015). Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *International journal of environmental research and public health*, 12(5), 5657-5684. <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>
- Dougherty, J. A., Swarzenski, P. W., Dinicola, R. S., & Reinhard, M. (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and

- groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of environmental quality*, 39(4), 1173-1180.
- Du, S., McLaughlin, B., Pal, S., & Aizenman, E. (2002). In vitro neurotoxicity of methylisothiazolinone, a commonly used industrial and household biocide, proceeds via a zinc and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7408-7416.
- Eaton, F. M. (1944). Deficiency, Toxicity, And Accumulation Of. *Journal of Agricultural Research*, 69, 237.
- Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging contaminants*, 3(1), 1-16.
- Echobichon, D. J. (1996). Toxic effects of pesticides. *Cassarett and Doull's Toxicology*.
- EFSA Scientific Committee. (2012). Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA journal*, 10(3), 2579.
- El-Badawy, F. M., & El-Desoky, H. S. (2018). Quantification of chloroxylenol, a potent antimicrobial agent in various formulations and water samples: environmental friendly electrochemical sensor based on microwave synthesis of graphene. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(14), B694.
- El-Naggar, D. A., El-Zalabany, L. M. A., Shahin, D. A., Attia, A. M., & El-Mosallamy, S. A. (2022). Testicular Toxicity of Chloroxylenol in Rats: Biochemical, Pathological and Flow Cytometric Study. *Journal of Experimental Pharmacology*, 213-220.
- Ejtahed, H. S., Hasani-Ranjbar, S., Siadat, S. D., & Larijani, B. (2020). The most important challenges ahead of microbiome pattern in the post era of the COVID-19 pandemic. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19, 2031-2033.
- Emre, Y., Kürüm, V. (1998). Havuz ve kafeslerde alabalık yetiştiriciliği teknikleri. *Minpa Matbaa. Tic Ltd Şti*, Ankara, 232.
- 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, (1994). Prevention, Pesticides and Toxic Substances. *United States Environmental Protection Agency* EPA-738-F-94e028.
- EPA, (1998). Methylisothiazolinone. *Environmental Protection Agency*. EPA-738-F-98e008.
- EPA, (2003). Pesticides, and Toxic Substances. 2003. Chapter 2: What is a pesticide? *Office of Preventions, Label Review Manual*. 3rd ed. Washington, DC. (Accessed October 18, 2004)

- EPA, (2009). Summary of Human Health Effects Data for the Chloroxylenol Registration Review Decision Document. EPA 738-R-94e032 EPA-HQ-OPP-2009- 0010-001.
- EPA, (2013). Protection of Environment Parts 790 to 999 (Revised as of July 1), *Environmental Protection Agency. Title 40* pp. 330e333.
- EPA, (2016). Antimicrobial pesticide registration. *Environmental Protection Agency* www.epa.gov/pesticide-registration/antimicrobial-pesticide-registration.
- Eşrefoğlu, M. (2016). Genel Histoloji. 2. Baskı, *İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul*.
- Etter, A., Neri, P., Di Stefano, A., Andreassi, M., Anselmi, C., & Andreassi, L. (2003). Involvement of oxidative stress in apoptosis induced by a mixture of isothiazolinones in normal human keratinocytes. *Journal of investigative dermatology*, 121(2), 328-336.
- European Commission, (2009). Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Consumer Products Opinion on Triclosan.
- European Commission (2020) Fitness check on endocrine disruptors. Commission Staff Working document. SWD (2020) 251 final. https://ec.europa.eu/environment/pdf/chemicals/2020/10/SWD_on_Endocrines_disruptors.pdf. Accessed 10 Jan 2021
- Everaarts, J. M., Den Besten, P. J., Hillebrand, M. T. J., Halbrook, R. S., & Shugart, L. R. (1998). DNA strand breaks, cytochrome P-450-dependent monooxygenase system activity and levels of chlorinated biphenyl congeners in the pyloric caeca of the seastar (*Asterias rubens*) from the North Sea. *Ecotoxicology*, 7, 69-79.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59.
- Fan, F., Yan, K., Wallis, N. G., Reed, S., Moore, T. D., Rittenhouse, S. F., ... & Payne, D. J. (2002). Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11), 3343-3347.
- Fang, J. L., Stingley, R. L., Beland, F. A., Harrouk, W., Lumpkins, D. L., & Howard, P. (2010). Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 28(3), 147-171.
- FAO. (1987). Manual of Methods in Aquatic Environment, *Part 10, Shortterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247*, Roma.
- Felder, D. P., D'surney, S. J., Rodgers, J. H., & Deardorff, T. L. (1998). A comprehensive environmental assessment of a receiving aquatic system near an unbleached kraft mill. *Ecotoxicology*, 7, 313-324.
- Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment-occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813.

- Firidin, Ş. (2004). Histolojik çalışmalar için doku örnekleri alma ve işleme projesi. *Aquaculture Studies*, 2004(1).
- Fleck, T., Moidl, R., Blacky, A., Fleck, M., Wolner, E., Grabenwoger, M., & Wisser, W. (2007). Triclosan-coated sutures for the reduction of sternal wound infections: economic considerations. *The Annals of thoracic surgery*, 84(1), 232-236.
- Foran, C. M., Bennett, E. R., & Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine environmental research*, 50(1-5), 153-156.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, (1), 10-3.
- Gameiro, A., Coutinho, I., Ramos, L., & Gonçalo, M. (2014). Methylisothiazolinone: second 'epidemic' of isothiazolinone sensitization. *Contact Dermatitis*, 70(4), 242-243.
- Gao CJ, Jia LL, Guo Y (2018) Triclosan in over the counter medicines of South China. *Environ Monit Assess* 190(12):728. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7111-7>
- Gardner, K. H., Davis, M. D., Richardson, D. M., & Pittelkow, M. R. (2010). The hazards of moist toilet paper: allergy to the preservative methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone. *Archives of dermatology*, 146(8), 886-890.
- Gatti, R., Roveri, P., Bonazzi, D., & Cavrini, V. (1997). HPLC-fluorescence determination of chlorocresol and chloroxylenol in pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 16(3), 405-412.
- Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., & Collins, A. R. (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International journal of radiation biology*, 62(3), 313-320.
- Geier, J., & Lessmann, H. (2020). Contact allergy to metalworking fluids. In *Contact Dermatitis* (pp. 1067-1082). Cham: Springer International Publishing.
- Ghanem, K. M., Al-Fassi, F. A., & Al-Hazmi, N. M. (2012). Optimization of chloroxylenol degradation by *Aspergillus niger* using Plackett-Burman design and response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 11(84), 15040-15048. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1953>
- Gméling, K., Németh, K., Martin, U., Eby, N., & Varga, Z. (2007). Boron concentrations of volcanic fields in different geotectonic settings. *Journal of volcanology and geothermal research*, 159(1-3), 70-84.
- Glaser, A. (2004). The ubiquitous triclosan. *A common antibacterial agent exposed. Pesticides and You*, 24, 12-17.
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Chaminda, G. T., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>

- Gomes, E., Boscolo, M., Da Silva, R., & Rodrigues, A. (2018). Fungal Biodegradation of the Biocide 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-One. *Austin J Microbiol*, 4, 3-8.
- Goodier, M. C., Siegel, P. D., Zang, L. Y., & Warshaw, E. M. (2018). Isothiazolinone in residential interior wall paint: a high-performance liquid chromatographic–mass spectrometry analysis. *Dermatitis*, 29(6), 332-338.
- Goren, A. Y., Recepoglu, Y. K., Karagunduz, A., Khataee, A., & Yoon, Y. (2022). A review of boron removal from aqueous solution using carbon-based materials: an assessment of health risks. *Chemosphere*, 293, 133587. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133587>.
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. ve Clesceri, L.S., (1985). Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition.
- Guess, W. L., & Bruch, M. (1986). A review of available toxicity data on the topical antimicrobial, chloroxylenol. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology*, 5(4), 233-262.
- Gupta, A. K., & Daigle, D. (2014). Tavaborole (AN-2690) for the treatment of onychomycosis of the toenail in adults. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(7), 735-742.
- Gut, M., Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Pedersen, N. C., & Lutz, H. (1999). One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*, 77(1), 37-46.
- Gülsoy, N., Yavas, C., & Mutlu, Ö. (2015). Genotoxic effects of boric acid and borax in zebrafish, *Danio rerio* using alkaline comet assay. *EXCLI journal*, 14, 890.
- Güner, U. (2014). Toksikoloji. *Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi*, 2, 186-189.
- Güner, U., & MURANLI, F. D. G. (2013). Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3(9), 103-114.
- Hadrup, N., Frederiksen, M., & Sharma, A. K. (2021). Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 121, 104873.
- Halden, R. U. (2014). On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States.
- Helvacı, C., & Palmer, M. R. (2017). Origin and distribution of evaporite borates: the primary economic sources of boron. *Elements: An International Magazine of Mineralogy, Geochemistry, and Petrology*, 13(4), 249-254.
- Hampel, M., Blasco, J., & Díaz, M. M. (2016). Biomarkers and effects. In *Marine Ecotoxicology* (pp. 121-165). Academic Press.
- Hanna, S. E., Connor, C. J., & Wang, H. H. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food*

- Science*, 70(3), R49-R53. HERA, (2005). Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Cleaning Products. Boric Acid. *Guidance Document 1 Edition*.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030.
- Hildebrand, G. H., 1982. "Borax Pioneer: Francis Marion Smith." San Diego: Howell-North Books, 267, ISBN 0-8310-7148-6
- Honkisz, E., Zieba-Przybylska, D., & Wojtowicz, A. K. (2012). The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Reproductive Toxicology*, 34(3), 385-392.
- Hora, P. I., Pati, S. G., McNamara, P. J., & Arnold, W. A. (2020). Increased use of quaternary ammonium compounds during the SARS-CoV-2 pandemic and beyond: consideration of environmental implications. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(9), 622-631.
- Hosmane, N. S. (Ed.). (2011). *Boron science: new technologies and applications*. CRC press.
- Huang CL, Ma HW, Yu CP (2014a) Substance flow analysis and assessment of environmental exposure potential for triclosan in mainland China. *Sci Total Environ* 499:265–275. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.032>
- Ijaz, M. K., Whitehead, K., Srinivasan, V., McKinney, J., Rubino, J. R., Ripley, M., ... & Charlesworth, B. (2020). Microbicidal actives with virucidal efficacy against SARS-CoV-2. *American Journal of Infection Control*, 48(8), 972.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., ... & Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic toxicology*, 67(2), 167-179.
- Jagini S, Konda S, Bhagawan D, Himabindu V (2019) Emerging contaminant (triclosan) identification and its treatment: a review. *SN Appl Sci* 1:640. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0634-x>
- Jirasripongpun, K., Wongarethornkul, T., & Mulliganavin, S. (2008). Risk assessment of triclosan using animal cell lines. *Agriculture and Natural Resources*, 42(2), 353-359.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (1983). *Biologia celular e molecular*. Ed.
- Kanra G. ve Ceyhun M., (1985). Hastane İnfeksiyonlarının Önlenmesinde Temel İlkeler Katkı, 6, 6, 421-432.

- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre O., Gedikoğlu, S., Göral G., Helvacı, S. (1996) Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, *Bursa Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri*, 117-138.
- Kim, H., Wang, H., & Ki, J. S. (2021). Chloroacetanilides inhibit photosynthesis and disrupt the thylakoid membranes of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* as revealed with metazachlor treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111928.
- Kim, J., Park, S., Zoh, K. E., Park, J., Choi, S., Hwang, S. H., ... & Park, D. U. (2022). Review of inhalation health risks involving chloromethylisothiazolinone (CMIT) and methylisothiazolinone (MIT) used as disinfectants in household humidifiers. *Journal of Korean Medical Science*, 37(13).
- Kim, J., & Choi, J. (2023). Trans-and Multigenerational Effects of Isothiazolinone Biocide CMIT/MIT on Genotoxicity and Epigenotoxicity in *Daphnia magna*. *Toxics*, 11(4), 388.
- Kim, J. Y., Yi, B. R., Go, R. E., Hwang, K. A., Nam, K. H., & Choi, K. C. (2014). Methoxychlor and triclosan stimulates ovarian cancer growth by regulating cell cycle-and apoptosis-related genes via an estrogen receptor-dependent pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 1264-1274.
- 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*.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8(6), 257-260.
- Kluczka, J., Ciba, J., Trojanowska, J., Zolotajkin, M., Turek, M., & Dydo, P. (2007a). Removal of boron dissolved in water. *Environmental progress*, 26(1), 71-77.
- Kluczka, J., Trojanowska, J., Zolotajkin, M., Ciba, J., Turek, M., & Dydo, P. (2007b). Boron removal from wastewater using adsorbents. *Environmental technology*, 28(1), 105-113.
- Kocabaş, F. K., Kocabaş, M., Aksu, Ö., & Çakır Sahilli, Y. (2022). Ascorbic acid ameliorated the sperm quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against arsenic toxicity: Impact on oxidative stress, fertility ability and embryo development. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 40(2), 119-132.
- Kocabaş, F. K., Kocabaş, M., Aksu, Ö., & Sahilli, Y. Ç. (2022). The evaluation of oxidative stress and quality of spermatozoa in Padanian barbel *Barbus plebejus* and chub *Squalius orientalis*. *Sustainable Aquatic Research*, 1(1).
- Kocabaş, M., Kocabaş, F. K., Aksu, Ö., Benzer, F., Erişir, M., & Sahilli, Y. Ç. (2022). Aroclor 1254 impairs sperm quality, fertilization ability, and embryo development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(56), 84581-84589.

- Kocabaş, M., & Kutluyer, F. (2017). Dose dependent treatment with boric acid induces more changes in the sperm cells of endangered trout *Salmo coruhensis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J SciEngin Res*, 4(9), 475-481.
- Kocabaş, M., Kutluyer, F., Çakir Sahilli, Y., & Aksu, Ö. (2021). Cellular responses of spiralin *Alburnoides bipunctatus* spermatozoa exposed to Bisphenol A: Biochemical response and sperm quality alterations evaluation. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 27(2), 368-377.
- Kutluyer, F., & Kocabaş, M. (2017). Dose dependent treatment with boric acid induces more changes in the sperm cells of endangered Anatolian trout *Salmo rizeensis*. *International journal of aquaculture and fishery sciences*, 3(2), 042-045.
- Kutluyer, F., Kocabaş, M., Erişir, M., & Benzer, F. (2018). Comparison of oxidant and antioxidant status of Çoruh trout (*Salmo coruhensis*), Anatolian trout (*Salmo rizeensis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(1), 13-18.
- Kutluyer, F., Kocabaş, M., Erişir, M., & Benzer, F. (2018). Cypermethrin-induced in vitro alterations on oxidative stress and quality of *Salmo coruhensis* spermatozoa. *Indian J. Pharm. Educ. Res*, 52(4), 71-76.
- La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, Guyton KZ, Kortenkamp A, Cogliano VJ, Woodruff TJ, Rieswijk L, Sone H, Korach KS, Gore AC, Zeise L, Zoeller RT (2020) Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16(1):45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Larson, E., & Talbot, G. H. (1986). An approach for selection of health care personnel handwashing agents. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 7(8), 419-424.
- Larson, E. (1988). Guideline for use of topical antimicrobial agents. *American journal of infection control*, 16(6), 253-266.
- Latch, D. E., Packer, J. L., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2003). Photochemical conversion of triclosan to 2, 8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 158(1), 63-66.
- Laufer, B., & Nation, P. (1999). A vocabulary-size test of controlled productive ability. *Language testing*, 16(1), 33-51.
- Leblond, V. S., Bisson, M., & Hontela, A. (2001). Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *General and comparative endocrinology*, 121(1), 48-56.
- Lee, D. G. (2015). Removal of a synthetic broad-spectrum antimicrobial agent, triclosan, in wastewater treatment systems: A short review. *Environmental Engineering Research*, 20(2), 111-120.

- Lee, H. R., Hwang, K. A., Nam, K. H., Kim, H. C., & Choi, K. C. (2014). Progression of breast cancer cells was enhanced by endocrine-disrupting chemicals, triclosan and octylphenol, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway in cellular and mouse xenograft models. *Chemical research in toxicology*, 27(5), 834-842.
- Lee JD, Lee JY, Kwack SJ, Shin CY, Jang HJ, Kim HY, Kim MK, Seo DW, Lee BM, Kim KB (2019) Risk assessment of triclosan, a cosmetic preservative. *Toxicol Res* 35(2):137–154. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.2.137>
- Le Hoa, T. H., Tran Ngoc Hung, V., Do Trang, T., Nguyen Hung Thu, T., & Le, D. C. (2019). Development and validation of an HPLC method for simultaneous assay of MCI and MI in shampoos containing plant extracts. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2019.
- Levy, C. W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P. J., Stuitje, A. R., Slabas, A. R., ... & Rafferty, J. B. (1999). Molecular basis of triclosan activity. *Nature*, 398(6726), 383-384.
- Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 25-30.
- Lewis, S. N., Miller, G. A., Hausman, M., & Szamborski, E. C. (1971). Isothiazoles I: 4-isothiazolin-3-ones. A general synthesis from 3, 3'-dithiodipropionamides. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 8(4), 571-580.
- Li, M. H. (2019). Comparative toxicities of 10 widely used biocides in three freshwater invertebrate species. *Chemistry and Ecology*, 35(5), 472-482.
- Li, L (2021) Toxicity evaluation and by-products identification of triclosan ozonation and chlorination. *Chemosphere* 263:128223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128223>
- Li, W., Guo, H., Wang, C., Zhang, Y., Cheng, X., Wang, J., ... & Du, E. (2020). ROS reevaluation for degradation of 4-chloro-3, 5-dimethylphenol (PCMX) by UV and UV/persulfate processes in the water: Kinetics, mechanism, DFT studies and toxicity evolution. *Chemical Engineering Journal*, 390, 124610.
- Li, Z., Li, M., Zhang, Z., Li, P., Zang, Y., & Liu, X. (2020). Antibiotics in aquatic environments of China: A review and meta-analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 199, 110668.
- Limbu, S. M., Zhou, L., Sun, S. X., Zhang, M. L., & Du, Z. Y. (2018). Chronic exposure to low environmental concentrations and legal aquaculture doses of antibiotics cause systemic adverse effects in Nile tilapia and provoke differential human health risk. *Environment international*, 115, 205-219.
- Lin, D., Xie, X., Zhou, Q., & Liu, Y. (2012). Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environmental toxicology*, 27(7), 385-392.

- Lin, Q. B., Wang, T. J., Song, H., & Li, B. (2010). Analysis of isothiazolinone biocides in paper for food packaging by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(12), 1775-1781.
- Linden, C. H., Hall, A. H., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. (1986). Acute ingestions of boric acid. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 24(4), 269-279.
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2002). Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental science & technology*, 36(11), 2322-2329.
- Litovitz, T.L., Kleinschwartz, W., Oderda, G.M., Schmitz, B.F., (1988). Clinical manifestations of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions. *Am J Emerg Med*, 6, 209-213.
- Liu, B., Wang, Y., Fillgrove, K. L., & Anderson, V. E. (2002). Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 49, 187-193.
- Liu, M., Ai, W., Sun, L., Fang, F., Wang, X., Chen, S., & Wang, H. (2019). Triclosan-induced liver injury in zebrafish (*Danio rerio*) via regulating MAPK/p53 signaling pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 222, 108-117.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Loewengart, G. (2001). Toxicity of boron to rainbow trout: A weight-of-the-evidence assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(4), 796-803.
- Loomis, T.A., (1978). *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (pp. xii-258).
- Ma, K., Zhou, L., Bai, Y., Xin, Y., Chen, M., Li, H., ... & Zhou, Y. (2021). Degradation and mechanism analysis of chloroxylenol in aqueous solution by gas–liquid discharge plasma combined with ozonation. *RSC advances*, 11(21), 12907-12914. <https://doi.org/10.1039/D1RA01886H>.
- Mao, Y., Ai, H., Chen, Y., Zhang, Z., Zeng, P., Kang, L., ... & Li, H. (2018). Phytoplankton response to polystyrene microplastics: perspective from an entire growth period. *Chemosphere*, 208, 59-68.
- Marone, P. A., Heimbach, J. T., Nemzer, B., & Hunter, J. M. (2016). Subchronic and genetic safety evaluation of a calcium fructoborate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.021>.

- Mavri, A., Kurinčič, M., & Možina, S. S. (2012). The Prevalence of Antibiotic and Biocide Resistance Among *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from Different Sources. *Food Technology & Biotechnology*, 50(3).
- McGinnis, D. (2008). Toxicological Profile of Triclosan in the Aquatic Environment. *Department of Marine and Environmental Systems Florida Institute of Technology Melbourne*.
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.
- McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394(6693), 531-532.
- MDH, (2014). Triclosan and Drinking Water. *Environmental Health Division*. www.health.state.mn.us/eh,ed.
- Melliti, A., Kheriji, J., Bessaies, H., & Hamrouni, B. (2020). Boron removal from water by adsorption onto activated carbon prepared from palm bark: kinetic, isotherms, optimisation and breakthrough curves modeling. *Water Science and Technology*, 81(2), 321-332. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.107>.
- Menne T., Hospital G., (1999) An Update of The Risk Assessment For Methylchloroisothiazolinone/Methylisothiamlinone (MCI/MI) with Focus on Rinse-off Products, *Contact Dermatitis*, 41, 1-13.
- Milanović, M., Milošević, N., Sudji, J., Stojanoski, S., Krstonošić, M. A., Bjelica, A., ... & Stojanoska, M. M. (2020). Can environmental pollutant bisphenol A increase metabolic risk in polycystic ovary syndrome? *Clinica Chimica Acta*, 507, 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.009>
- Milanović, M., Đurić, L., Milošević, N., & Milić, N. (2023). Comprehensive insight into triclosan—from widespread occurrence to health outcomes. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(10), 25119-25140.
- Ming, X., Rothenburger, S., & Nichols, M. M. (2008). In vivo and in vitro antibacterial efficacy of PDS plus (polidioxanone with triclosan) suture. *Surgical infections*, 9(4), 451-457.
- Mitchelmore, C. L., & Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(2), 135-147.
- Momma, J., Takada, K., Aida, Y., Yoshimoto, H., Naito, K., Suzuki, Y., ... & Tobe, M. (1988). Combined long-term toxicity and carcinogenicity test of p-chloro-m-xylenol (PCMX) applied to female mouse skin. *Eisei Shikenjo hokoku. Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, (106), 39-47.

- Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., & Lambropoulou, D. (2020). Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: a review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity. *Science of the Total Environment*, 699, 134322.
- Nassar, H. N., & Younis, S. A. (2019). From Priority Contaminants to Emerged Threat: Risk and Occurrence-Based Analysis for Better Water Management Strategies in Present and Future. *Nano and Bio-Based Technologies for Wastewater Treatment: Prediction and Control Tools for the Dispersion of Pollutants in the Environment*, 41-103.
- National Toxicology Program. (1987). NTP toxicology and carcinogenesis studies of boric acid (CAS No. 10043-35-3) in B6C3F1 mice (feed studies). *National Toxicology Program technical report series*, 324, 1-126.
- Neerukonda, S. N., & Katneni, U. (2020). A review on SARS-CoV-2 virology, pathophysiology, animal models, and anti-viral interventions. *Pathogens*, 9(6), 426.
- Niedz, R. P. (1998). Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *HortTechnology*, 8(4), 598-601.
- Nippes, R. P., Macruz, P. D., da Silva, G. N., & Scaliante, M. H. N. O. (2021). A critical review on environmental presence of pharmaceutical drugs tested for the covid-19 treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 152, 568-582.
- Nowak, B. (1992). Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic toxicology*, 23(1), 65-83.
- Nowak, M., Zawadzka, K., & Lisowska, K. (2020). Occurrence of methylisothiazolinone in water and soil samples in Poland and its biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 254, 126723.
- Nowak, M., Zawadzka, K., Szemraj, J., Góralczyk-Bińkowska, A., & Lisowska, K. (2021). Biodegradation of chloroxylenol by *Cunninghamella elegans* IM 1785/21GP and *Trametes versicolor* IM 373: Insight into Ecotoxicity and Metabolic Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4360.
- Nowak-Lange, M., Niedziałkowska, K., Bernat, P., & Lisowska, K. (2022). In vitro study of the ecotoxicological risk of methylisothiazolinone and chloroxylenol towards soil bacteria. *Scientific Reports*, 12(1), 19068.
- Olaniyan, L. W. B., Mkwetshana, N., & Okoh, A. I. (2016). Triclosan in water, implications for human and environmental health. *Springerplus*, 5(1), 1-17. [https:// doi. org/ 10. 1186/ s40064- 016- 3287-x](https://doi.org/10.1186/s40064-016-3287-x)
- Olive, P. L., Banáth, J. P., & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the " comet" assay. *Radiation research*, 122(1), 86-94.
- Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., & Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(7), 1338-1349.

- Özdemir, M., & Kıpçak, İ. (2010). Recovery of boron from borax sludge of boron industry. *Minerals Engineering*, 23(9), 685-690.
- Özkaya, E., Kılıç Sayar, S., Babuna Kobaner, G., & Pehlivan, G. (2021). Methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone and methylisothiazolinone contact allergy: a 24-year, single-center, retrospective cohort study from Turkey. *Contact Dermatitis*, 84(1), 24-33.
- Özyurt, B., & Erkekoğlu, P. (2016). Organoklorlu Pestisitler, Poliklorlu Bifeniller ve Kahve Tüketimi ile Pankreas Kanseri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 69-88.
- Park, S. K., & Kwon, J. H. (2016). The fate of two isothiazolinone biocides, 5-chloro-2-methylisothiazol-3 (2H)-one (CMI) and 2-methylisothiazol-3 (2H)-one (MI), in liquid air fresheners and assessment of inhalation exposure. *Chemosphere*, 144, 2270-2276.
- Pascoe, D., & Edwards, R. W. (1989). Aquatic Eco.: Fundamental Concepts and Methodologies. Volume II. *CRC Press, Inc., Boca Raton Florida*, 203, 93-126.
- Paton, D. M. (2017). Crisaborole: Phosphodiesterase inhibitor for treatment of atopic dermatitis. *Drugs Today*, 53(4), 239-245.
- Pauli O. ve Franke G., (1983). *Proc Int Biodeteriation Symp 2nd*. 52-60 (1971) (2) Paulus W, Genth H; Biodeteriation 5, 701-712.
- Penland, J. G. (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 7), 65-72.
- Perencevich, E. N., Wong, M. T., & Harris, A. D. (2001). National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *American journal of infection control*, 29(5), 281-283.
- Pirard, C., Sagot, C., Deville, M., Dubois, N., & Charlier, C. (2012). Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environment international*, 48, 78-83.
- Pleus, R. C., Bruce, G., Klintworth, H., Sullivan, D., Johnson, W., Rajendran, N., & Keenan, J. (2018). Repeated dose inhalation developmental toxicity study in rats exposed to cellulose insulation with boric acid additive. *Inhalation Toxicology*, 30(13-14), 542-552. <https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1576806>.
- Pye, L. D., Fréchette, V. D., & Kreidl, N. J. (2012). *Borate glasses: structure, properties, applications* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.
- Rafoth, A., Gabriel, S., Sacher, F., & Brauch, H. J. (2007). Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1164(1-2), 74-81.
- Rand, G. M. (Ed.). (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press.

- Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., & Griffin, J. (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(11), 2483-2492.
- Remy, P., Muhr, H., Plasari, E., & Ouerdiane, I. (2005). Removal of boron from wastewater by precipitation of a sparingly soluble salt. *Environmental progress*, 24(1), 105-110.
- Robbins, W. A., Wei, F., Elashoff, D. A., Wu, G., Xun, L., & Jia, J. (2008). Y: X sperm ratio in boron-exposed men. *Journal of andrology*, 29(1), 115-121.
- Rodricks, J. V., Swenberg, J. A., Borzelleca, J. F., Maronpot, R. R., & Shipp, A. M. (2010). Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical reviews in toxicology*, 40(5), 422-484.
- Rodriguez, F., Elias, R., Bolívar-Anillo, H., Hoyos Turcios, C., Carrillo Garcia, L., Serrano Hernandez, M., & Abdellah, E. (2020). Antibiotic resistance: the role of man, animals and the environment. *Revista Salud Uninorte*, 36(1), 298-324.
- Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 225-254.
- Ruszkiewicz, J. A., Li, S., Rodriguez, M. B., & Aschner, M. (2017). Is Triclosan a neurotoxic agent?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(2), 104-117.
- Saarikoski, J., & Viluksela, M. (1982). Relation between physicochemical properties of phenols and their toxicity and accumulation in fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 6(6), 501-512.
- Saleh, S., Haddadin, R.N.S., Baillie, S., Collier, P.J., (2011). Triclosan an update. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 87e95.
- Salman A., (2019). methylisothiazolinone contact allergy: a retrospective cohort study from a tertiary dermatology clinic in Turkey. *Contact Dermatitis*, 80(3), 193-194. Methylchloroisothiazolinone and Methylisothiazolinone Contact Allergy: A Retrospective Cohort Study From A Tertiary Dermatology Clinic in Turkey, *Contact Dermatitis*, 80(3), 193-194.
- Sana, U., Maryam, B., Saeed, A., & Kuldeep, D. (2016). Genotoxic effect of endosulfan at sublethal concentrations in Mori (*Cirrhinus mrigala*) fish using single cell gel electrophoresis (comet) assay. *International Journal of Pharmacology*, 12(3), 169-176.
- Sandle, T. (2020). Disinfectant standards: what you need to know.
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E. D., ... & Jiménez-Vargas, J. M. (2015). NSAID-manufacturing plant effluent induces geno-and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 530, 1-10.

- Santos, N. D., Azmat, S., Cuenca, Y., Drenth, J., Lauper, J., & Tseng, A. S. (2016). Effects of the biocide methylisothiazolinone on *Xenopus laevis* wound healing and tail regeneration. *Aquatic Toxicology*, 181, 37-45.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759.
- Sayli, B. S., C  l, M., Elhan, A. H., & Gen  , Y. (2003). Assessment Of Fertility And Infertility In Boron-Exposed Turkish Subpopulations 6: Relevant Data From All Centers. *Journal of Ankara Medical School*, 25(4). https://doi.org/10.1501/Jms_00000000065.
- Saygı,   ., 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.
- SCCS, (2014). European Commission Scientific Committee on Consumer Safety Opinion on Methylisothiazolinone (P94) *Submission II (Sensitization Only)* SCCS/1521/13, Revision of 27 March 2014.
- Schoderboeck, L., M  hle  ger, S., Losert, A., Gausterer, C., & Hornek, R. (2011). Effects assessment: Boron compounds in the aquatic environment. *Chemosphere*, 82(3), 483-487.
- Schwensen, J. F., Uter, W., Bruze, M., Svedman, C., Goossens, A., Wilkinson, M., ... & European Environmental Contact Dermatitis Research Group. (2017). The epidemic of methylisothiazolinone: a European prospective study. *Contact Dermatitis*, 76(5), 272-279.
- Schwensen, J. F., & Johansen, J. D. (2020). Isothiazolinones. *Kanerva's Occupational Dermatology*, 507-520.
- Scialli, A. R., Bonde, J. P., Br  ske-Hohlfeld, I., Culver, B. D., Li, Y., & Sullivan, F. M. (2010). An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reproductive Toxicology*, 29(1), 10-24.
- Seenivasan, D., Pandurengan, P., Srinivasan, A., Gopalrajan, S. ve Paulraj, J. (2023). Antimikrobiyal ajan triklosanın *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852)   zerindeki kısa vadeli etkileri: Biyokimyasal ve genetik değişiklikler. *Hindistan Hayvan Araştırmaları Dergisi*, 57 (6), 788-794.
- Sherry, H. Y., Sood, A., & Taylor, J. S. (2016). Patch testing for methylisothiazolinone and methylchloroisothiazolinone-methylisothiazolinone contact allergy. *JAMA dermatology*, 152(1), 67-72.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.

- Song, M. K., Park, J. E., Ryu, S. H., Baek, Y. W., Kim, Y. H., Im Kim, D., ... & Lee, K. (2022). Biodistribution and respiratory toxicity of chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolinone following intranasal and intratracheal administration. *Environment International*, 170, 107643.
- Soriano-Ursúa, M. A., Farfán-García, E. D., López-Cabrera, Y., Querejeta, E., & Trujillo-Ferrara, J. G. (2014). Boron-containing acids: preliminary evaluation of acute toxicity and access to the brain determined by Raman scattering spectroscopy. *Neurotoxicology*, 40, 8-15.
- Sreevidya, V. S., Lenz, K. A., Svoboda, K. R., & Ma, H. (2018). Benzalkonium chloride, benzethonium chloride, and chloroxylenol-Three replacement antimicrobials are more toxic than triclosan and triclocarban in two model organisms. *Environmental pollution*, 235, 814-824.
- Staff. (2008). "Creating Flame Colors". The Science Company. Retrieved November, 30.
- Storch, M. L., Rothenburger, S. J., & Jacinto, G. (2004). Experimental efficacy study of coated VICRYL plus antibacterial suture in guinea pigs challenged with *Staphylococcus aureus*. *Surgical infections*, 5(3), 281-288.
- Subramanya SH, Czyż DM, Acharya KP, Humphreys H (2021) The potential impact of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance and antibiotic stewardship. *Virus Dis* 32(2):330–337. <https://doi.org/10.1007/s13337-021-00695-2>
- Sun, Y., Zhao, J., Zhang, B. T., Li, J., Shi, Y., & Zhang, Y. (2019). Oxidative degradation of chloroxylenol in aqueous solution by thermally activated persulfate: kinetics, mechanisms and toxicities. *Chemical Engineering Journal*, 368, 553-563.
- Şenel U, Ertan Bolelli T, Bolelli K, Yıldız İ. (2016) Enoil-açıl taşıyıcı protein (ACP) redüktaz enzim inhibitörleri üzerinde yapılan doking çalışmaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*; 40 (1): 25-35.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., & Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 11(2), 133-140.
- Theodorakis, C. W., & Shugart, L. R. (1998). Genetic ecotoxicology III: the relationship between DNA strand breaks and genotype in mosquito fish exposed to radiation. *Ecotoxicology*, 7, 227-235.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Toder, V., Carp, H., Fein, A., & Torchinsky, A. (2002). The role of pro-and anti-apoptotic molecular interactions in embryonic maldevelopment. *American journal of reproductive immunology*, 48(4), 235-244.

- Topal, A., Oruç, E., Altun, S., Ceyhun, S. B., & Atamanalp, M. (2016). The effects of acute boric acid treatment on gill, kidney and muscle tissues in juvenile rainbow trout. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 297-302.
- Töreci, K., (1990). Dezenfeksiyon Yöntemleri ve Seçimi, *Ankem Dergi* 4, 3, 364 – 371.
- Trombini, C., Kazakova, J., Montilla-López, A., Fernández-Cisnal, R., Hampel, M., Fernández-Torres, R., ... & Blasco, J. (2021). Assessment of pharmaceutical mixture (ibuprofen, ciprofloxacin and flumequine) effects to the crayfish *Procambarus clarkii*: A multilevel analysis (biochemical, transcriptional and proteomic approaches). *Environmental Research*, 200, 111396.
- Türkez, H., Geyikoğlu, F., Tatar, A., Keleş, S., & Özkan, A. (2007). Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 889-896.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C., & Korkmaz, M. (2005). Mikrobiyoloji. *Asya Tıp Kitabevi, İzmir*.
- Ulusik, I., Karakaya, H. C., & Koc, A. (2018). The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45, 156-162.
- URL-1. (2023, Temmuz 15) Pestisitler: <https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/akuleyin/126247/pestisitler%205.ppt> adresinden alınmıştır.
- URL-2. (2023, Mart 15) Pestisitler: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/112370/mod_resource/content/0/PESTISITLER-1-9.%20hafta_%202018.pdf adresinden alınmıştır.
- URL-3. (2023, Nisan 19) Dezenfektan Nedir?: <https://www.florence.com.tr/dezenfektan> adresinden alınmıştır.
- URL-4. (2023, Ağustos 27) Cleaning and Disinfection: <https://www.nea.gov.sg/our-services/public-cleanliness/environmental-cleaning-guidelines/guidelines/interim-list-of-household-products-and-active-ingredients-for-disinfection-of-covid-19> (27.10.2021) adresinden alınmıştır.
- URL-5. (2023, Haziran 25) PCMX (Para Chloro Meta Xylenol): https://www.atamanchemicals.com/pcmx-para-chloro-meta-xylenol_u23841/?lang=TR adresinden alınmıştır.
- URL-6. (2023, Mayıs 21) Antifungal Agent: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do;jsessionid=11FA34AAE6AF2729BB9D3915388F4634?chebiId=35718> adresinden alınmıştır.
- URL-7. (2023, Temmuz 11) Caviar Preservative Borax: <http://www.caviarfactory.ro/en/caviar-preservative-borax/> adresinden alınmıştır.
- URL-8. (2023, Haziran 17) Triclosan ROTICHROM® HPLC: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-1KNA-MT-EN.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNzc0Nzh8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oZGUvaDQ2LzkwMzA4NjYxNDEyMTQu>

cGRmfDY0MTVkJjZGNhNDc5MjlkNGMwMDQwZmFkZGE2ZWE3YmRhNDIyNzkyOTeyOGE2MWRjYTA0NzM4OWRlNjBiNDU adresinden alınmıştır.

- URL-9. (2023, Ağustos 17) Chloroxilenol: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chloroxilenol> adresinden alınmıştır.
- Urwin, R., & Wilkinson, M. (2013). Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone contact allergy: a new 'epidemic'. *Contact Dermatitis*, 68(4), 253-255.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (1994). Reregistration eligibility decision: Chloroxilenol (EPA 738-R-94-032).
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (1998) Reregistration Eligibility Decision (RED) Methylisothiazolinone.
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (2019a). Estimation programs interface (EPI) Suite™ for Microsoft Windows® (Version 4.11) [Computer software].
- USEPA (US Environmental Protection Agency). (2019b, February 14). EPA's per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) action plan, EPA 823R18004. *Washington, DC: Author.*
- Usman M, Farooq M, Hanna K (2020) Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Sci Total Environ* 745:141053. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141053>
- Uter, W., Yazar, K., Kratz, E. M., Mildau, G., & Lidén, C. (2014). Coupled exposure to ingredients of cosmetic products: II. Preservatives. *Contact Dermatitis*, 70(4), 219-226.
- Ünsal, M., (1998). Kirlilik Deneyleri: Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, *Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, No. 11, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bodrum.*
- Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., & Van Dongen, J. J. M. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6), 1013-1034.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment. *Marine Environmental Research*, 53(1), 1-16.
- Vural, N., (1996). Toksikoloji, *A.Ü.Ecz.F. Yayınları No: 73, Ankara, A.Ü. Basımevi*, 1-20.
- Vural, N. T. (2005). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. *Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.*
- Wagner-Deyriès, M., Varignier, L., Revel, M., Delhay, T., Rondeau, D., Coutellec, M. A., & McCairns, R. S. (2023). Variation of Tolerance to Isothiazolinones Among *Daphnia pulex* Clones. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(4), 805-814.

- Wang, Q., Cao, J., & Jiang, M. (2020). Self-healing coating to reduce isothiazolinone (MCI/MI) leaching from preservative-treated bamboo. *BioResources*, 15(1), 1904-1914.
- Watson, A. T., Sutherland, V. L., Cunny, H., Miller-Pinsler, L., Furr, J., Hebert, C., ... & McIntyre, B. S. (2020). Postnatal effects of gestational and lactational gavage exposure to boric acid in the developing Sprague Dawley rat. *Toxicological Sciences*, 176(1), 65-73.
- Wester, R. C., Hui, X., Maibach, H. I., Bell, K., Schell, M. J., Northington, D. J., ... & Culver, B. D. (1998). In vivo percutaneous absorption of boron as boric acid, borax, and disodium octaborate tetrahydrate in humans: a summary. *Biological trace element research*, 66, 101-109.
- WHO. (1998) Environmental Health Criteria 204: Boron; International Programme on Chemical Safety, *World Health Organization: Geneva, Switzerland*,
- Wilson, B. A., Smith, V. H., deNoyelles, F., & Larive, C. K. (2003). Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. *Environmental science & technology*, 37(9), 1713-1719.
- Won, E. J., Byeon, E., Lee, Y. H., Jeong, H., Lee, Y., Kim, M. S., ... & Shin, K. H. (2022). Molecular evidence for suppression of swimming behavior and reproduction in the estuarine rotifer *Brachionus koreanus* in response to COVID-19 disinfectants. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113396.
- Wu, Y. C., Chen, C. S., & Chan, Y. J. (2020). The outbreak of COVID-19: An overview. *Journal of the Chinese medical association*, 83(3), 217.
- Xin, X., Huang, G., An, C., & Feng, R. (2019). Interactive toxicity of triclosan and nano-TiO₂ to green alga *Eremosphaera viridis* in Lake Erie: A new perspective based on Fourier transform infrared spectromicroscopy and synchrotron-based X-ray fluorescence imaging. *Environmental science & technology*, 53(16), 9884-9894.
- Xu, L., Zheng, G. J., Lam, P. K., & Richardson, B. J. (1999). Relationship between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA adducts in green-lipped mussels (*Perna viridis*). *Ecotoxicology*, 8, 73-82.
- Yazar, K., Johnsson, S., Lind, M. L., Boman, A., & Liden, C. (2011). Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermatitis*, 64(5), 265-272.
- Yost, L. J., Rodricks, J. D., Turnbull, D., DeLeo, P. C., Nash, J. F., Quinones-Rivera, A., & Carlson, P. A. (2016). Human health risk assessment of chloroxylenol in liquid hand soap and dishwashing soap used by consumers and health-care professionals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, 116-124.
- Yuksel, B., Aydın, D., & Aksoy, O. (2022). The impact of Vermicompost on *Pisum sativum* spp. Arvence L exposed to methylisothiazolinone. *Biologia*, 77(4), 1109-1119.

- Zhao, R. S., Wang, X., Sun, J., Hu, C., & Wang, X. K. (2011). Determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC-ESI-MS/MS. *Microchimica Acta*, 174, 145-151.
- Zheng, G., Filippelli, G. M., & Salamova, A. (2020). Increased indoor exposure to commonly used disinfectants during the COVID-19 pandemic. *Environmental science & technology letters*, 7(10), 760-765.
- Zhou, Y., Cheng, G., Chen, K., Lu, J., Lei, J., & Pu, S. (2019). Adsorptive removal of bisphenol A, chloroxylenol, and carbamazepine from water using a novel β -cyclodextrin polymer. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 278-285.



ÖZGEÇMİŞ

Tuna ÖZCELEP, İlk orta ve lise öğrenimi Trabzon'da tamamladı. 2000-2004 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde lisans eğitimi aldı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2009 yılında tamamladı. 2007 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı Trabzon İl Müdürlüğünde Mühendis olarak göreve başladı. Kasım 2013 tarihinde Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde çalışmaya başladı ve halen buradaki görevine devam etmektedir. Orta derecede ingilizce bilen Özcelep evli ve iki çocuk babasıdır.

Yayınlar

- Kayis, S., **Ozcelep, T.**, Capkin, E., & Altinok, I. (2009). Protozoan and metazoan parasites of cultured fish in Turkey and their applied treatments.
- Capkin, E., **Ozcelep, T.**, Kayis, S., & Altinok, I. (2017). Antimicrobial agents, triclosan, chloroxylenol, methylisothiazolinone and borax, used in cleaning had genotoxic and histopathologic effects on rainbow trout. *Chemosphere*, 182, 720-729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.093>
- Türe, M., **Ozcelep, T.**, Akbulut, B., & Kutlu, I. (2018). Disease of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) caused by *Aeromonas* sp. *Genetics of Aquatic Organisms*, 2(2), 43-47. https://doi.org/10.4194/2459-1831-v2_2_03
- Gürbüz, S., Baydan, E., Türe, M., Taçbaş, E., Akbulut, B., & **Özcelep, T.** (2021). The effect of cooking and cold storage processes on florfenicol residues in muscle tissues of sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) reared in black sea. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*.
- Türe, M., Cebeci, A., & **Özcelep, T.** (2022, September). The first outbreak of citrobacteriosis caused by *Citrobacter gillenii* in reared Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Türkiye. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 13, No. 3, p. 323). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Yazıcı, İ. S., Berber, S., & **Özcelep, T.** (2023). Effects of different carbon sources on growth and some innate immune responses of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in biofloc systems. *Marine Science and Technology Bulletin*, 12(2), 162-171.
- Özcelep, T.**, Yazıcı İ. S., Akbulut, B., Parlak, R., Ergün, H. (2022). First Siberian Sturgeon Production in Turkey and the Effect of Different Feeds on Growth Performance and Survival Rates of Siberian Sturgeon Larvae /*International Symposium on Fisheries and Aquatic Science October 25-27,2022/ Trabzon, Türkiye, SOFAS-2022/* <https://www.sofas.gov.tr/sofas-2022/> SOFAS 2022 | Book of Proceedings-23/99

- E Tacbas, E Baydan, FG Aydın, E Gokbulut, M Ture, B Akbulut, **T. Ozcelep** (2019). Determination of Florfenicol Pharmacokinetics in *Acipenser gueldenstaedtii* Grown in the Black Se Water/*Conference Proceedings, Bangkok Thailand, Part IX*, 875-878
- T Ozcelep**, B Akbulut, I Aydın, E Küçük, H Selen, H Ergün.(2014) Determination of potantial cage farming area in the coastal area of Black Sea in Artvin Provincial of Turkey/ *FABA 2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences*

