

Araştırma Makalesi

Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Kloramin-T Uygulaması Sonucu Solungaçlarda Meydana Gelen Oksidatif Stresin Beyin Dokusundaki *c-Fos* ve *BDNF* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması

Harun ARSLAN^{1*}, Selçuk ÖZDEMİR²

¹Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Erzurum/TÜRKİYE

²Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: harunarslan@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi: 15.11.2018

Düzeltilme Geliş Tarihi: 20.12.2018

Kabul Tarihi: 26.12.2018

Özet

Kloramin-T, balıklarda solungaç hastalıklarını önlemek ve/veya bu hastalıklardan korunmak için kullanılan bir kimyasaldır. Birçok balık türünde solungaçlarda oluşan bakteriyel hastalıklar kloramin-T uygulanarak kontrol altına alınmaktadır. Ancak yanlış kloramin-T uygulaması sucul canlılarda oksidatif strese neden olmaktadır. Bu çalışmada, gökkuşluğu alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*) uygulanan kloramin-T'nin solungaçlarda oluşturacağı oksidatif stres düzeyinin araştırılması ve bu stresin beyindeki nöronal aktiviteyi etkileyip etkilemediğinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç için gökkuşluğu alabalıklarına sub-lethal dozda (2.8 mg/L) 0-1-24-48-72 ve 96 saat kloramin-T uygulaması yapıldı. Daha sonra antioksidant enzimleri kodlayan genlerin (süperoksit dismütaz 1 (*SOD1*), süperoksit dismütaz 2 (*SOD2*), katalaz (*CAT*), glutathion peroksidaz 1 (*GPX1*), glutathion peroksidaz 4 (*GPX4*)) mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR ile ölçüldü. Son olarak beyin dokularında nöronal aktiviteyi ölçmek amacıyla *c-Fos* ve *BDNF* genlerine ait ekspresyon seviyeleri yine qRT-PCR ile belirlendi. Kloramin-T uygulanan balıkların solungaçlarında *SOD1*, *SOD2*, *CAT* ve *GPX1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı gözlemlendi. Ancak *GPX4* geninde önemli bir artış gözlemlenmedi. Aynı balıkların beyin dokuları incelendiğinde *c-fos* ve *BDNF* ekspresyonlarının benzer şekilde kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlendi. Çalışmadan elde edilen bu sonuçlar, aşırı ve/veya yanlış kloramin-T uygulamasının gökkuşluğu alabalıklarının solungaç dokularında oksidatif strese neden olduğunu ve oksidatif strese maruz kalan balıkların beyin dokularında nöronal aktivitenin negatif yönde etkilendiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kloramin-T, oksidatif stres, gökkuşluğu alabalığı, *c-Fos*, *BDNF*.

Investigation of the Effect of Oxidative Stress in Gill Tissue on the Brain Tissue *c-Fos* and *BDNF* Gene Expression after Chloramine-T Application of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract

Chloramine-T is a chemical used to prevent and/or protect gill diseases in fish. In many fish species, bacterial diseases that occur in the gills are controlled by chloramine-T application. However, the wrong application of chloramine-T causes oxidative stress in aquatic organisms. In this study, it is aimed to investigate the oxidative stress level of chloramine-T applied to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in gills and to investigate whether this stress affects neuronal activity in brain. For this purpose, rainbow trout were used sub-lethal dose (2.8 mg / L) 0-1-24-48-72 and 96 hours of chloramine-T. The levels of mRNA transcripts of genes encoding antioxidant enzymes (superoxide dismutase 1 (*SOD1*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*), catalase (*CAT*), glutathione peroxidase 1 (*GPX1*), glutathione peroxidase 4 (*GPX4*)) were measured by qRT-PCR. Finally, expression levels of *c-Fos* and *BDNF* genes were determined by qRT-PCR to measure neuronal activity in brain tissues. It was observed that the expression levels of *SOD1*, *SOD2*, *CAT* and *GPX1* genes increased significantly in

the gills of fish treated with chloramine-T. However, there was no significant increase in GPX4 gene. When the brain tissues of the same fish were examined, it was determined that c-fos and BDNF expressions increased in comparison to the control group. The results of the study show that excessive and/or incorrect chloramine-T application causes oxidative stress in the gill tissues of rainbow trout and negative effects of neuronal activity on brain tissues of fish exposed to oxidative stress.

Key words: Chloramine-T, oxidative stress, rainbow trout, c-Fos, BDNF.

Giriş

Kloramin-T (Chl-T), N-sodyum-N-kloro-p-toluen sülfonamid, özellikle içme suyu arıtımında kloraminasyon için kullanılan bir bileşiktir ve klor, klor dioksit, kloramin, ozon ve potasyum permanganat ile birlikte birincil dezenfektanlardan biridir. Bunun yanında mutfaklar, laboratuvarlar ve hastaneler gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Kujala ve ark., 1995; Stief, 2003).

Chl-T fungusit, bakterisit ve virüs olarak kullanılması yanında tüberküloz, ayak-ağız hastalığı ve kuş gribi gibi mikobakterilere karşı da etkilidir (Russell, 1998). Bu özelliklerin yanında, Chl-T, tatlı su balıklarında solungaç hastalıklarını önlemek veya bu hastalıklarda korunmak için de kullanılmaktadır (Thorburn ve Moccia, 1993). Birçok balık türünde solungaçlarda oluşan bakteriyel hastalıklar Chl-T uygulanarak kontrol altına alınmaktadır (Bullock ve ark., 1991). Chl-T bir solüsyon içerisinde parçalandığında nükleofilik özelliğe sahip olması nedeniyle ortama hipoklorit iyonu (OCI) ve para-tolüensülfonamid (pTSA) salmaktadır. Hipoklorit salınımının hem terapötik etkinin (Booth ve McDonald, 1988) hem de toksisitenin (Powell ve Perry, 1996) temel mekanizmasında rol oynadığına inanılmaktadır. Hipoklorit balıklarda akut toksisiteye neden olmaktadır (Brooks ve Bartos, 1984).

Ülkemizde Gökkuşluğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği son yıllarda oldukça gelişmiş ve istenilen olumlu sonuçlar alınmıştır. Şu anda ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan tatlı su balığı gökkuşluğu alabalığıdır (TÜİK, 2018). Gökkuşluğu alabalığının fazlaca ürettiği dönemlerde kalite kaybına uğramadan ya da en az kayıpla tüketiciye ulaştırılması önemli bir konudur (Dönmez ve Tatar, 2001). Bu bağlamda kayıpların en aza indirgenmesi ekonomik kayıpları da azaltacaktır.

Son yıllarda yapılan bir çalışma Chl-T uygulamasının oksidatif stresi tetiklediğini ortaya koymuştur (Tongul ve ark., 2018). Ancak balıklarda Chl-T uygulaması sonucu solungaçlarda oluşacak oksidatif stresin beyindeki nöronal aktivite ve fonksiyon üzerine ne gibi etkilerinin olacağı ile ilişkili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, gökkuşluğu alabalıklarına uygulanan Chl-T'nin solungaçlarda oluşturacağı oksidatif stresin düzeyinin araştırılması ve bu stresin

beyindeki nöronal aktiviteyi etkileyip etkilemediğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Deneme dizaynı

Çalışma, Atatürk Üniversite İç Su Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen yaklaşık 150 gramlık gökkuşluğu alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*) 350 litrelik sürekli akışlı tanklarda sub-lethal dozda (2.8 mg/L), 0-1-24-48-72 ve 96 saat kloramin-T uygulaması yapılarak tamamlanmıştır. Sonrasında dokular diseksiyonun ardından trizol reagent eklenerek zaman kaybetmeden -80 de muhafaza edilmiştir.

Total RNA izolasyonu

Balıkların solungaç ve beyin dokularından Trizol kiti kullanılarak ve kitin prosedürüne uygun olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonunda sonra RNA konsantrasyonu NanoDrop ile ölçüldü. Total RNA kalitesini kontrol etmek amacıyla RNA'lar %1.5'lik agaroz jel de 1XTBE solusyonu içerisinde 80 voltta bir saat yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek RNA kalitesi belirlendi.

DNaz I uygulaması ve cDNA çevrimi

İzole edilen RNA örneklerinde DNA kontaminasyonuna karşı DNaz I (Thermo Scientific) kullanıldı. Dnaz I uygulaması kitte verilen protokole uygun olarak yapıldı. Daha sonra bu RNA'lardan 2-5 µg alındı ve miScript Reverse Transcription Kiti (Qiagen) verilen protokole uygun şekilde kullanılarak cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrede yapılan 260-280 nm absobans ölçümleri ile belirlendi ve cDNA'lar aynı oranlarda sulandırıldı. Daha sonra Real Time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edildi.

Real time PCR

Süperoksit dismütaz 1 (SOD1), süperoksit dismütaz 2 (SOD2), katalaz (CAT), glutathion peroksidaz 1 (GPX1), glutathion peroksidaz 4 (GPX4), c-fos ve BDNF genlerinin mRNA transkript seviyelerini ölçmek amacıyla CFX96 BioRad marka cihaz kullanılarak qRT-PCR yapıldı. İnternal kontrol olarak GAPDH geni kullanıldı. Real time PCR deneylerinde oluşturulan master mix içeriği; Syber

Green 2X Rox Dye Master mix (Qiagen), genler için tasarlanmış forward ve reverse primerler, template olarak cDNA'lar ve nükleaz free su. Master mixler hazırlandıktan sonra örnekler Real Time cihazında analiz edildi ve elde edilen Ct değerleri 2-

DeltaDeltaCt metoduna uygun olarak hesaplanarak ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001). Primer bilgileri Çizelge 1'de verildi.

Çizelge 1. Primer sekansları

Gen adı	Erişim no	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')	Kaynak
<i>SOD1</i>	AF469663.1	TGGTCCTGTGAAGCTGATTG	TTGTCAGCTCCTGCAGTCAC	
<i>SOD2</i>	CA352127.1	TCCCTGACCTGACCTACGAC	GGCCTCCTCCATTAAACCTC	
<i>CAT</i>	BX087110.3	TGATGTCACACAGGTGCGTA	GTGGGCTCAGTGTGTTGAG	Fontagné-Dicharry ve ark., 2018
<i>GPX1a</i>	HE687021	AATGTGGCGTCACTCTGAGG	CAATTCTCTGATGGCCAAA	
<i>GPX4b</i>	CA344428.1	TTGGAGGTCAGGAGCCAGGT	ACCCCTTCCCTGGGCTGTT	
<i>β-actin</i>	NM001124235.1	AGCCCTCCTTCTCGGTAT	AGAGGTGATCTCCTTGTGCATC	Johansen ve ark., 2012
<i>BDNF</i>	GU108576.1	GACCAAGGATGTCGACCTGT	GCTGTCACCCACTGGCTAAT	
<i>c-Fos</i>	NC_035101.1	CGACTTCCCTCCATCTCT	ACAGGGAGCTGGTCAGATCGAC	Matsuoka ve ark., 1998.

İstatistiksel Analiz

İlgili genlere ait mRNA transkript değerleri için IBM SPSS (20.0) programı kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. mRNA transkript değerleri One Way ANOVA testi kullanılarak analiz edildi. Ayrıca genlere ait ekspresyon seviyeleri GrapPad 7.2 (California, USA) programı kullanılarak analiz edildi. $P < 0.05$, $P < 0.01$ ve $P < 0.001$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular ve Tartışma

Kloramin-T uygulanan balıkların solungaçlarında *SOD1*, *SOD2*, *CAT* ve *GPX1* genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı gözlemlendi. Ancak *GPX4* geninde önemli bir artış gözlemlenmedi. (Şekil 1 ve Şekil 2). Aynı balıkların beyin dokuları incelendiğinde *c-fos* ve *BDNF* ekspresyonlarının benzer şekilde kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlendi (Şekil 3).

Antioksidatif sistemler serbest radikal atılımında ve buna bağlı olarak hücrelerin çeşitli toksik maddelere maruz kalmaları durumunda oksidatif stres yollarında önemli roller oynadığı bilinmektedir (Finkel ve Holbrook, 2000). Kloraminler güçlü oksitleyici dezenfektanlardır ve özellikle içme suyu arıtma olarak kullanılırlar (Bullock ve ark., 1991). Bu çalışmada, *Chl-T*'ye maruz kalan gökkuşuğu alabalıklarında iki ana antioksidatif enzim olan *CAT* ve *SOD*, glutatyon ile ilişkili enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon

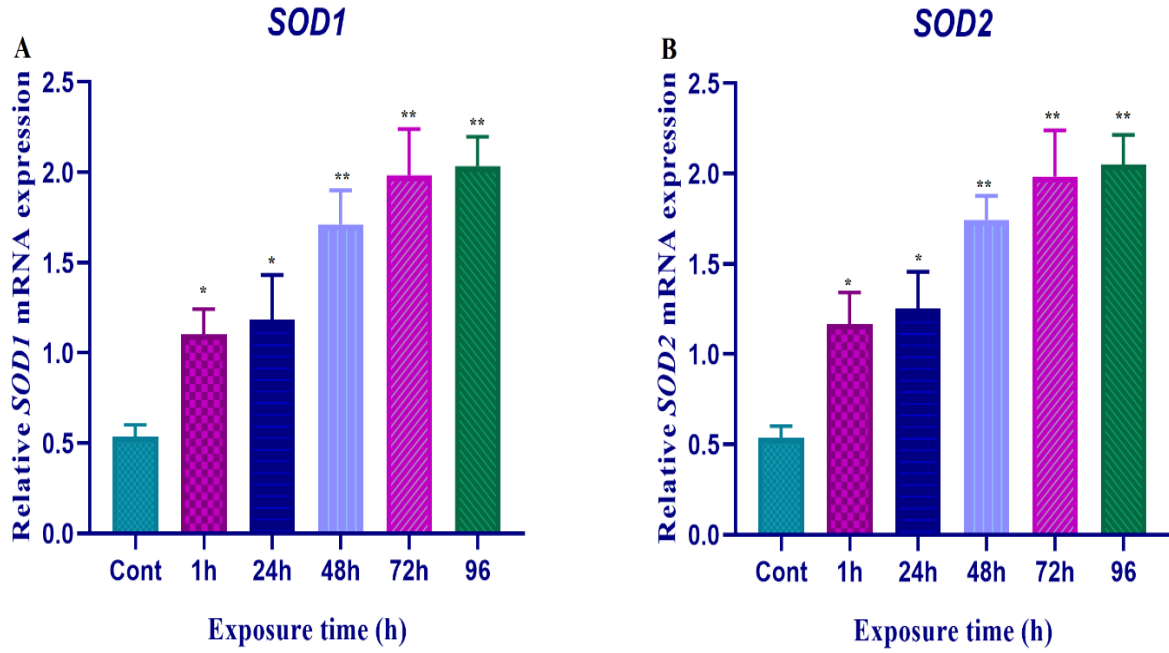
seviyeleri ve bunun yanı sıra *BDNF* ve *c-Fos* genlerine ait ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

SOD, oksijene maruz kalan tüm canlı hücrelerde önemli antioksidatif enzimlerden biridir (Halliwell, 2006). *SOD*, O_2 'nin değişimini katalize eder ve bunu ya O_2 ya da H_2O_2 'ye dönüştürür. Bu çalışmada, *Chl-T*'ye maruz kalan balıkların solungaç dokularında *SOD1* ve *SOD2* enzimlerine ait genlerin ekspresyon seviyelerinin maruz kalma süresiyle doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç *Chl-T* maruziyetinin *SOD* enzim aktivitesini arttırdığını dolayısıyla solungaç dokularında oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Farklı sucul canlılar üzerine yapılmış benzer çalışmalarda bu çalışmada elde edilen verilere paralel sonuçlar elde edilmiştir (Boran ve Altınok, 2014; Tongul ve ark., 2018).

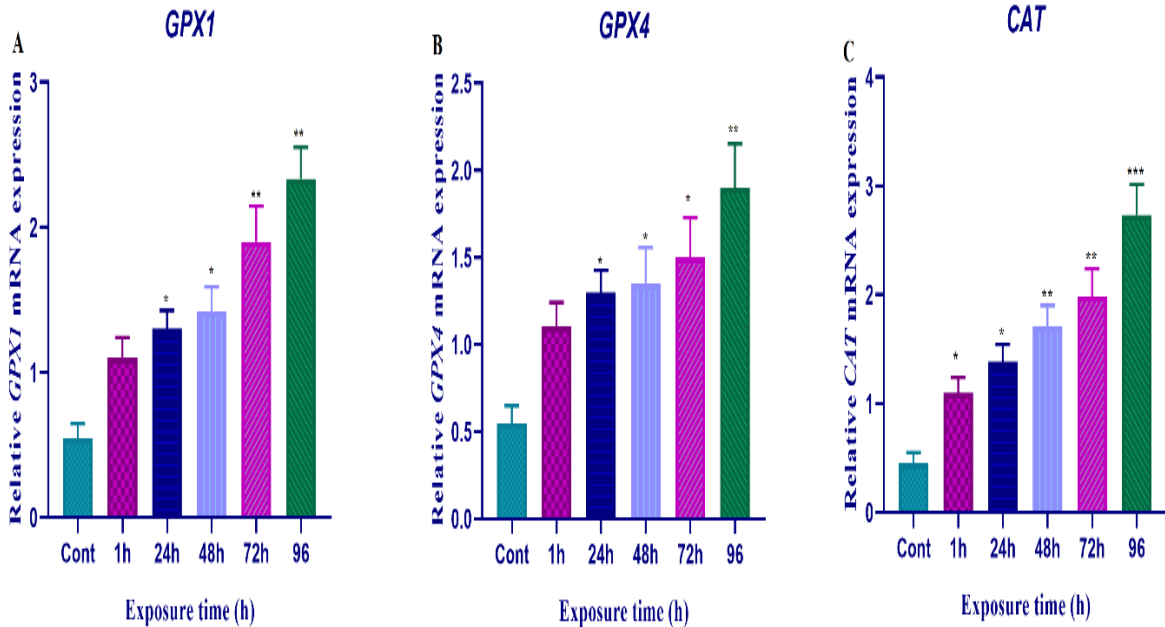
CAT, hidrojen peroksidin su ve oksijene ayrışmasını katalize ederek, ROS bazlı oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında çok önemli bir enzimdir (Halliwell, 2006). *GSH-Px*, *GSH* sistemini kullanarak H_2O_2 'yi temizlemekten sorumlu olan *GSH* sistemindeki önemli bir enzimdir (Fang ve ark., 2002). Bu çalışmada, *CAT*, *GPX1* ve *GPX4* genlerine ait ekspresyon seviyelerinin *Chl-T*'ye maruz kalan solungaç dokularında kontrol grubuna göre arttığı gösterildi. Ancak *GPX4*'ün diğer genlere göre daha az arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, *Chl-T* maruziyetinin zamana bağımlı olarak solungaç dokularında oksidatif strese neden olduğunu ortaya koymaktadır. Aynı balık türü üzerinde yapılan benzer çalışmada, bu çalışmadan elde edilen

verilere paralel sonuçlar elde edilmiştir (Boran ve Altınok 2014). Farklı balık türü üzerinde yapılan bir

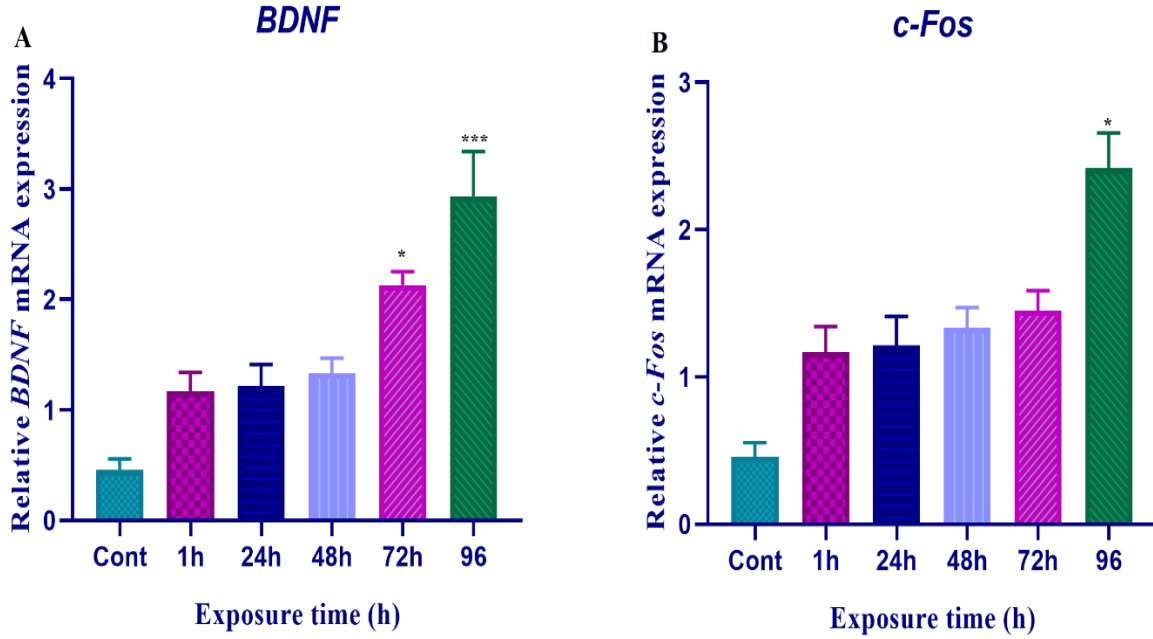
diğer çalışmada benzer bulgulara rastlanılmıştır (Tongul ve ark., 2018).



Şekil 1. Gökkuşáđı Alabalıklarına ait solungaç dokularında *SOD1* ve *SOD2* genlerine ait mRNA transkript seviyeleri. Değerler 3 bağımsız örneklemin ortalama \pm SD' sini temsil eder; Hata çubukları standart sapmayı gösterir. İstatistiksel anlamlılık (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$) Tek Yönlü ANOVA ile analiz edildi. A) *SOD1* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder. B) *SOD2* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder.



Şekil 2. Gökkuşáđı Alabalıklarına ait solungaç dokularında *GPX1*, *GPX2* ve *CAT* genlerine ait mRNA transkript seviyeleri. Değerler 3 bağımsız örneklemin ortalama \pm SD' sini temsil eder; Hata çubukları standart sapmayı gösterir. İstatistiksel anlamlılık (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$) Tek Yönlü ANOVA ile analiz edildi. A) *GPX1* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder. B) *GPX4* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder. C) *CAT* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder.



Şekil 3. Gökkuşluğu Alabalıklarına ait beyin dokularında *BDNF* ve *c-Fos* genlerine ait mRNA transkript seviyeleri. Değerler 3 bağımsız örneklemin ortalama \pm SD' sini temsil eder; Hata çubukları standart sapmayı gösterir. İstatistiksel anlamlılık (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$) Tek Yönlü ANOVA ile analiz edildi. A) *BDNF* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder. B) *c-Fos* geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder.

Beyin türevi nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin ailesine ait bir proteindir (Chao, 2003). BDNF, nöronal sağkalım (survival), büyüme, farklılaşma ve sinaptik esneklik (Huang ve Reichardt, 2001), nöronal göç (Carter ve ark., 2003), miyelinsasyon (Cosgaya ve ark., 2002) ve nöronal apoptozda önemli rol oynamaktadır. *c-fos* bir protoonkojendir ve bir nörotransmitterin uyarılmasıyla (Greenberg ve ark., 1986) aktive edilebilir, dolayısıyla erken cevap geni olarak adlandırılır. *c-Fos*, zararlı uyarı ve doku hasarından sonra nöronal aktivasyon için belirteç olarak kullanılabilir (Gao ve Ji, 2009). Bu çalışmada, Chl-T'ye maruz kalan balık beyinlerinde *BDNF* ve *c-Fos* gen ekspresyon seviyeleri özellikle 96. saatte önemli derecede arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlarla ile diğer antioksidant genlere ait sonuçlar karşılaştırıldığında oksidatif stresin artması beyinde nöronal aktivitenin artmasına ve beyin hücrelerinin kanserleşmeye doğru gidebileceğini görüşü ortaya konabilir.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmadan elde edilen bu sonuçlar, aşırı ve/veya yanlış kloramin-T uygulamasının gökkuşluğu alabalıklarının solungaç dokularında oksidatif strese neden olduğunu ve oksidatif strese maruz kalan balıkların beyin dokularında nöronal aktivitenin negatif yönde etkilendiğini göstermektedir.

Bu sonuçların da gösterdiği gibi aşırı ve/veya yanlış kimyasal kullanımının dozu ne kadar düşük olursa olsun etki ettiği mekanizma çok dikkatli irdelenmelidir. Dolayısıyla bu kimyasalların kullanılması, satışı gibi konularda muhataplar çok iyi bilgilendirilmeli ve gerekirse kamu spotu hazırlanmalıdır.

Kaynaklar

- Booth, N.H., McDonald L.E. 1988. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th edn. pp. 774–777. Iowa State University Press, Ames.
- Boran, H., Altınok, I. 2014. Impacts of chloramine-T treatment on antioxidant enzyme activities and genotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, (37): 431-441.
- Brooks, A.S., Bartos, J.M. 1984. Effects of free and combined chlorine and duration on rainbow trout, channel catfish and emerald shiners. *Transactions of the American Fisheries Society*, (113): 786-793.
- Bullock, G.L., Herman, R.L., Waggy, C. 1991. Hatchery efficacy trials with chloramine-T for control of bacterial gill disease. *Journal Aquatic Animal Health*, 3(1): 48-50.
- Carter, A.R., Berry, E.M., Segal, R.A. 2003. Regional expression of p75NTR contributes to neurotrophin regulation of cerebellar

- patterning. *Molecular Cell Neuroscience*, 22: 1-13.
- Chao, M.V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *National Review Neuroscience*, (4): 299-309.
- Cosgaya, J.M., Chan, J.R., Shooter, E.M. 2002. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*, (298): 1245-1248.
- Dönmez, M., Tatar, O. 2001. Fleto ve Bütün Olarak Dondurulmuş Gökkuşluğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss* W.) Muhafazası Süresince Yağ Asitleri Bileşimlerindeki Değişmelerin Araştırılması. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 18(1-2): 125-134.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-879.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809): 239-247.
- Fontagné-Dicharry, S., Larroquet, L., Dias, K., Cluzeaud, M., Heraud, C., Corlay, D. 2018. Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunology*, 74: 43-51.
- Gao, Y.J., Ji, R.R. 2009. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury?. *Open Pain Journal*, (2):11-17.
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A. 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, (234): 80-83.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2): 312-22.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev. Neuroscience*, (24): 677-736.
- Johansen, I.B., Sørensen, C., Sandvik, G.K., Nilsson, G.E., Höglund, E., Bakken, M., Overli, O. 2012. Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comparative Biochemical Physiology Part D Genomics Proteomics*, 7(2): 161-71.
- Kujala, V.M., Reijula, K.E., Ruotsalainen, E.M., Heikkinen, K. 1995. Occupational asthma due to chloramine-T solution. *Respiratory Medicine*, 89(10): 693-695.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-8.
- Matsuoka, I., Fuyuki, K., Shoji, T., Kurihara, K. 1998. Identification of c-Fos related genes and their induction by neural activation in rainbow trout brain. *Biochim Biophys Acta.*, 21; 1395(2): 220-7.
- Powell, M.D., Perry, S.F. 1996. Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood during exposure to chloramine-T, paratoluene sulphonamide and hypochlorite. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science*, (53): 701-708.
- Russell, A. 1998. Microbial Susceptibility and Resistance to Chemical and Physical Agents. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. John Wiley & Sons, Inc.
- Stief, T.W. 2003. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses*, 60(4): 567-572.
- Thorburn, M. A., Moccia, R.D. 1993. Use of Chemotherapeutics on Trout Farms in Ontario *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(2): 85-91.
- Tongul, B., Kavakcıoğlu, B., Tarhan, L. 2018. Chloramine T induced oxidative stress and the response of antioxidant system in *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol (Praha)*, 63(3): 325-333.
- TÜİK, 2018. (<http://www.tuik.gov.tr>), (Erişim tarihi: 05.11.2018).