

Araştırma Makalesi/Research Article (Original Paper)

Formaldehitin Subletal Konsantrasyonlarının Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) Balığı Üzerindeki Toksik Etkileri

Ertuğrul KANKAYA^{1*}, Burak KAPTANER²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van, Türkiye

*e-posta: ekankaya@yahoo.com; Tel: +90 (432) 444 50 65 / 22716

Özet: Formaldehit (FA) akuakültür ve süs balığı yetiştiriciliğinde antiparazitik bir ajan ve genel bir dezenfektan olarak yaygın olarak kullanılır. Bu çalışma, çok farklı kullanım alanlarına sahip olan FA'nın sazan balığı üzerindeki kronik toksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ortalama ağırlıkları 9.8 ± 3.1 g ve ortalama boyları 7.3 ± 0.7 cm olan sazan (*Cyprinus carpio*) balığı, yarı statik test yöntemi kullanılarak, FA'ya kronik olarak maruz bırakılmıştır. Subletal konsantrasyonlar 0, 20, 30, 40 mg/L olarak uygulanmıştır. Biyodenezy 23 °C'de, 60 gün devam ettirilmiştir. Analiz ve değerlendirmeler için 15, 30 ve 60 günde balık örnekleme yapılmıştır. Disekte edilen balıklardan alınan karaciğer ve solungaç dokusunda histolojik incelemeler yapılmıştır. Redükte glutatyon (GSH) içeriği, glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktivitesi karaciğer ve solungaç dokusunda belirlenmiştir. Dokulardaki morfolojik değişiklikler, solungaç primer lamellerinde yüzey epitel hücrelerinde çoğalma, sekonder lamellada epitel tabakada ayrılma, karaciğerde vakuolizasyon olarak tespit edilmiştir. GST'nin karaciğerde 40 mg/L'de 15 günde önemli olarak genelde azaldığı; SOD'un karaciğerde 20, 30 mg/L'de 15 günde önemli olarak azaldığı; CAT'ın karaciğer ve solungaçta 30 mg/L'de 15 ve 60 günde önemli olarak değiştiği görülmüştür. Bu çalışmayla FA'nın sazan balığında incelenen kriterler için hafif toksik etkiye sahip olduğu düşünülebilir. FA akuakültürde çok yaygın kullanıldığından, kontrolsüz ve gereksiz kullanımından kaçınılması oluşabilecek olumsuz biyolojik etkilerini azaltacaktır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, *Cyprinus carpio*, Formaldehit, Histoloji, Toksikite

Sublethal Toxicity of Formaldehyde in Common Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758)

Abstract: Formaldehyde (FA) is widely used as an antiparasitic agent and a general disinfectant in aquaculture and ornamental fish farming. This study was conducted to determine the chronic toxic effects of FA on carp. *Cyprinus carpio* fish with an average weight of 9.8 ± 3.1 g and an average length of 7.3 ± 0.7 cm was chronically exposed to FA using a semi-static test method. Sublethal concentrations were applied at 0, 20, 30, 40 mgL⁻¹. The bioassay was continued at 23°C for 60 days. Fish samples were taken at 15, 30 and 60 days for analysis and evaluation. The fish were dissected and the liver and gills tissue were removed. Histological examinations were performed on the liver and gills tissue from fish. Glutathione (GSH) content, glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity were also determined in the removed tissues. Morphological changes in the tissues were determined as proliferation in surface epithelial cells in the gill primer lamella, cleavage in the epithelial layer in the lamella of the seconder, and vacuolization in the liver. GST is significantly reduced in the liver at 40 mgL⁻¹ at 15 days; SOD significantly decreased in the liver at 20, 30 mgL⁻¹ in 15 days; CAT was significantly altered in the liver and gill at 30 mgL⁻¹ in 15, and 60 days. With this study, it can be considered that FA has a slight toxic effect for the criteria examined in carp. Because FA is widely used in aquaculture, avoiding uncontrolled and unnecessary use will reduce the adverse biological effects that may occur.

Keywords: Antioxidant, *Cyprinus carpio*, Formaldehyde, Histology, Toxicity

Giriş

Formaldehit (FA), akuakültürde parazitlere karşı kullanımına izin verilen tedavi edici maddelerden birisidir. FA balıkların dış parazitik enfeksiyonlarını kontrol etmede banyo uygulaması şeklinde kullanılır.

FA solungaç, deri ve yüzgeçlerdeki parazitleri etkili olarak öldürür (Meinelt ve ark. 2005; Nouh ve Selim 2013). FA sterilize edici olarak medikal uygulamalarda, gıda, kozmetik ve evde kullanılan temizleme ajanları gibi tüketici ürünlerinde koruyucu olarak bulunur (Anonim 1999).

Çevresel kirleticiler ve mutajenlerin düşük konsantrasyonlarına tepkileri ve toksik maddelerin biyolojik birikiminin değerlendirilmesi ve kirliliğin izlenmesinde, geniş bir yayılım alanına sahip olan akuatik omurgalılarından balık yaygın olarak kullanılır (Klobucar ve ark. 2010).

FA'nın akuatik canlılar üzerine toksisitesi ile ilgili yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. *Scenedesmus quadricauda*, *Oncorhynchus mykiss* (Tisler ve Zagorc-Koncan 1997); *Daphnia magna* (Martins ve ark. 2007); *Danio rerio* (IPCS 1989); *Lepidocephalichthys guntea* (Sanoli ve Kanabur 2001); gökkuşacağı alabalığı yavruları (Özgür ve ark. 2011) üzerine FA'nın toksisitesini araştırmışlardır.

Farklı balık türlerinde dış parazitlere karşı tedavi edici olarak FA uygulamalarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Çipura yavrularında *Trichodina spp.* tedavisinde (Tokşen 2004); gökkuşacağı alabalığında *Costiasis* tedavisinde FA uygulamanın etkin olduğunu (Balta ve ark. 2009) bildirmişlerdir.

Balıklarda solungaçlar su kaynaklı kirleticilere maruz kalan ilk organlardır. Solungaçların temel fonksiyonu gaz değişimi ve osmoregülasyondur. Kirleticilere kronik subletal maruziyetler, solunum üzerine çözümlü çok zor etkilere sahip olabilir (Schlenk ve ark. 2008).

Fiziksel kondisyon indeksleri balık sağlığındaki değişiklikleri izlemede basit bir yöntem olarak akuakültürde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kirleticiler metabolik oranda, enerji alımında bir azalmaya veya yağ metabolizmasında yükselmeye sebep olur. Muhtemelen kondisyon faktörü (KF) de azalır. Metabolik oranda yükselme kirleticili maddeye maruziyette yaygın bir tepkidir. Pek çok kirleticili hem beslenme davranışını değiştirerek hem de sindirim sisteminde emilim üzerine toksik etkilerinden dolayı enerji alımında bir azalmaya neden olur. Hepatosomatik indeks (HSI), karaciğer kütlesi ile vücut kütlesi arasındaki ilişkiyi ölçer. HSI, kirleticili maruziyetinin hedef organı üzerine direkt olarak toksik etkileriyle ilişkilendirilebilir (Schlenk ve ark. 2008).

Çevresel kimyasallara subletal maruz kalma, hücrelerin histolojik yapılarındaki değişimler ile doku ve organların fonksiyonlarını önemli ölçüde değiştirebilen patolojik oluşumlarla sonuçlanabilir. Histopatoloji, her bir organizmanın doku ve organlarında maruziyetin hem akut hem de kronik ters etkilerinin belirlenmesini sağlar (Schlenk ve ark. 2008).

FA'nın balıklardaki etkileri, fizyolojik işlev bozukluğu dahil biyolojik organizasyonun çeşitli seviyelerinde, organ ve dokulardaki yapısal değişikliklerde, büyüme ve üremenin bozulmasına yol açacak davranış değişikliklerinde gösterilebilir (Santos ve ark. 2012). FA'ya maruz bırakılan gökkuşacağı alabalığı (Bulut 2010); *Clarias gariepinus* (Adeyemo ve ark. 2012)'un bazı dokularında histolojik değişiklikler gösterilmiştir.

Toksistenin indikatörleri olarak biyokimyasal veya fizyolojik ölçümlerin kullanımı sürekli gelişim göstermekte ve bu ölçümler hastalıkların çıkmasından önce etkilerin sınırlarını belirleme avantajına sahiptir (Kurutaş ve ark. 2009). Biyokimyasal savunma sistemlerinin değişimi bir ksenobiyotik tarafından herhangi bir toksik hasarda tipik olarak ilk tepkidir. Dolayısıyla bu sistemlerin ölçümü, değiştirilmiş hücre fonksiyonlarının son derece hassas göstergelerine dönüşebilir (Schlenk ve ark. 2008). Yonar ve ark. (2014), gökkuşacağı alabalığını FA'ya maruz bırakmış ve malondialdehid (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), redükte glutatyon (GSH) ölçümleri yapmışlardır.

Akuatik ortamlara karışan pekçok kimyasal, doğrudan suda yaşayan canlıları tehdit etmekte, dolaylı olarak insan olmak üzere diğer canlıları da olumsuz etkilemektedir. Bu etkileri ortaya koymak, değerlendirmek için toksisite testleri yapılmaktadır. Bu çalışma, akuakültürde pekçok hastalığa ve parazitlere karşı kullanımına izin verilen tedavi edici maddelerden birisi olarak yaygın kullanıma sahip olan FA'nın sazan balığı üzerindeki kronik toksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Balık temini ve biyodene ortamı

Sazan (*Cyprinus carpio*) balığı, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretme ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü'nden canlı olarak temin edilmiştir. Biyodene su akışı ve havalandırmanın olduğu 400 litre kapasiteli fiberglas tanklarda gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kloru giderilmiş, dinlendirilmiş, havalandırılmış şebeke suyu kullanılmıştır. Kullanılan suyun kalite kriterleri ve değişimi Çizelge 1'de verilmiştir. Bütün işlemler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Dene Yeri Yerel Etik Kurulu Kararı (karar no: 25/05/2017 tarih 2017/05 sayı) ile onaylanmıştır.

Çizelge 1. Biyodenede kullanılan suyun kalite kriterleri ve değişimi

Su Kalite Kriteri	Değer
Sıcaklık (°C)	23.3
pH	8.53
Çözünmüş oksijen (mg/L)	6.4
Oksijen saturasyon (% L)	89
İletkenlik (µS/cm)	855
Tuzluluk (‰)	0.4
Toplam sertlik (CaCO ₃ mg/L)	348
Toplam alkalinite (CaCO ₃ mg/L)	537

Kimyasallar

FA Sigma-Aldrich (USA)'ten satın alınmıştır. Test konsantrasyonları FA stok solüsyonundan direkt alınan kimyasalın ilavesiyle hazırlanmıştır. SOD enzim kiti Randox Laboratories Ltd. temin edilmiştir. 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB); indirgenmiş glutatyon (GSH); 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve bu çalışmada kullanılan diğer kimyasalların tamamı analitik kalitede Sigma-Aldrich (USA)'ten sağlanmıştır.

Yöntem

Biyodene

Bu çalışmada, ortalama ağırlıkları 9.8±3.1 g ve ortalama çatal boyları 7.3±0.7 cm olan sazan (*Cyprinus carpio*) balığı kullanılmıştır. Balıklar test ortamına uyum sağlamaları ve yem alma alışkanlığının sağlanması için 15 gün alıştırmaya sürecine tabi tutulmuşlardır. Biyodene yarı statik test yöntemi kullanılarak yapılmıştır. FA balığın bulunduğu su ortamına ilave edilerek uygulanmıştır. Balıklar formaldehite kronik olarak maruz bırakılmıştır. İçerisinde 250 litre su bulunan her bir tanka 30 adet balık konmuştur. Deneme üç tekerrürlü uygulanmıştır (Ünsal 1998; Çetinkaya 2005; Parlak ve ark. 2009). Subletal konsantrasyonlar daha önce sazan balığı üzerine yapılmış akut toksisite çalışmaları (Chinabut ve ark. 1988; Yang ve ark. 2005) dikkate alınarak 0, 20, 30, 40 mg/L olarak belirlenmiştir. Biyodene 60 gün devam ettirilmiştir. Analiz ve değerlendirmeler için 15, 30 ve 60 günde, her seferinde 10 adet balık örnekleme yapılmıştır. Deneme ortamı termostatlı ısıtıcılar ile 23±1 °C'de tutulmuştur. Test solüsyonu, 24 saatte bir, balıkları mümkün olduğunca strese sokmadan, tamamına yakını boşaltılarak sıcaklığı ve konsantrasyonu ayarlanmış taze stoktan ilave edilerek yenilenmiştir. Deneme ortamının aktüel FA konsantrasyonunu belirlemek için, periyotlarla alınan su örneklerinde MBTH metodu (HACH 1999) kullanılarak analiz yapılmıştır. Balıklar doğal fotoperiyotta tutulmuş ve 2 mm ticari alabalık pelet yemle beslenmiştir.

Deneme başlamadan önce suyun pH, çözünmüş oksijen, sıcaklık, toplam sertlik, toplam alkalinite ve elektriksel iletkenlik değerleri, deneme sırasında her gün pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen değerleri belirlenmiştir (Anonim 1995).

Doku örneklerinin alınması

Balıklar fenoksietanol (320 µL/L) ile anestezi edilmiş, daha sonra balığın çatal boyu ve toplam ağırlığı ölçülmüştür. Bu ölçümlerden sonra her balık disekte edilmiş, karaciğer ve solungaç dokusu alınmıştır. Karaciğer ve solungaç dokusundan histolojik incelemeler için küçük bir parça alınmış ve Bouin fiksatif ile tespit edilmiştir. Karaciğer ve solungaç dokusunun diğer kısmı biyokimyasal analizler için alınmıştır. Bu dokularda GSH, GST, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) düzeyi belirlenene kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Histopatoloji

Bouin fiksatif ile tespit edilen dokular, etanol ile dehidrate edilmiş ve parafine gömülmüştür. Dokulardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin ve eosin ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Ünal 2005).

Doku homojenizasyonu

Analiz için -80 °C'de saklanan karaciğer ve solungaç dokusu derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra, 50 mM KH₂PO₄ tamponunda (4 °C, 1:5 w/v) 5 dk boyunca, porselen içinde ultrasonik doku parçalayıcı (Jencons Scientific Co., Bedfordshire, UK) ile homojenize edilmiştir. Homojenat, soğutmalı santrifüj (BHG Hermle Z 320 K) ile 9500 rpm'de, 4 °C'de 30 dk boyunca, santrifüj edilmiştir (Marklund 1990). Elde edilen süpernatant GSH, GST, SOD, CAT ölçümlerinde kullanılmıştır.

Biyokimyasal analizler

GSH içeriği, Beutler (1984) tarafından tanımlanan metot kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar µmol GSH/g doku olarak açıklanmıştır. GST aktivitesi, Habig ve ark. (1974) göre 340 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonuçlar U/g doku olarak verilmiştir. SOD aktivitesi, ticari bir kit (Ransod, Randox Lab., UK) üreticisinin prosedürü kullanılarak 505 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. SOD aktivitesi U/g doku olarak açıklanmıştır. CAT aktivitesi, spektrofotometrede Aebi (1974)'e göre ölçülmüştür. CAT aktivitesi 240 nm'de absorbanstaki azalış (hidrojen peroksit tüketimi) dikkate alınarak belirlenmiştir. Sonuçlar U/mg doku olarak verilmiştir.

İstatistik analizler

Biyodeny başlangıcı ve örnekleme günlerinde alınan balık ağırlığı ve boy değerlerinden % KF [(toplam ağırlık/toplam uzunluk³)x100] hesaplanmıştır (Çetinkaya ve ark. 2005). Test örnekleme günlerinde alınan balık ağırlığı ve karaciğer ağırlığı değerlerinden % HSI [(karaciğer ağırlığı/toplam ağırlık)x100] hesaplanmıştır (Schlenk ve ark. 2008). GSH, GST, SOD, CAT aktivite değerlerine göre; etkisi gözlemlenen en düşük konsantrasyon (LOEC), etkisi gözlenmeyen konsantrasyon (NOEC) parametreleri hesaplanmıştır (USEPA 1989; USEPA 1991; Ünsal 1998; OECD 2000; Çetinkaya 2005). Analizler sonucunda elde edilen veriler, SPSS for Windows paket programında, iki yönlü (konsantrasyon ve zaman) varyans analizi (ANOVA) ile Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bütün analizlerde $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Değerler, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Biyodeny

Teorik ve aktüel FA konsantrasyonu sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Teorik ve aktüel FA konsantrasyonları

Teorik FA konsantrasyonu (mg/L)	Aktüel FA konsantrasyonu (mg/L)
20	19.05
30	28.70
40	38.90

Konsantrasyon ve zamana bağı olarak KF değerleri Çizelge 3'te verilmiştir. KF değerinin 20, 30 mg/L ve 30, 60 gün örneklemeğinde istatistiki olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 3. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının KF değerleri (n=10)

Konsantrasyon (mg/L)	KF (%)			
	Süre (Gün)			
	0	15	30	60
0	2.39±0.13 ^a	2.41±0.15 ^a	2.31±0.14 ^a	2.34±0.17 ^a
20	2.36±0.12 ^a	2.34±0.13 ^a	2.22±0.11 ^b	2.14±0.10 ^c
30	2.36±0.17 ^a	2.35±0.14 ^a	2.24±0.15 ^b	2.18±0.09 ^b
40	2.42±0.14 ^a	2.36±0.12 ^a	2.38±0.14 ^a	2.33±0.16 ^a

KF: kondisyon faktörü

a, b, c Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağı olarak gruplar arası ortalama değerlerin farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Konsantrasyon ve zamana bağı olarak HSI değerleri Çizelge 4'te verilmiştir. HSI değerinin istatistiki olarak önemsiz düzeyde azaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının HSI değerleri (n=10)

Konsantrasyon (mg/L)	HSI (%)		
	Süre (Gün)		
	15	30	60
0	1.39±0.27 ^a	1.53±0.25 ^a	1.37±0.20 ^a
20	1.23±0.22 ^a	1.37±0.27 ^a	1.23±0.33 ^a
30	1.23±0.46 ^a	1.33±0.21 ^a	1.35±0.26 ^a
40	1.14±0.29 ^a	1.32±0.22 ^a	1.36±0.32 ^a

HSI: hepatosomatik indeks

a, b, c Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağı olarak gruplar arası ortalama değerlerin farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Karaciğer, solungaç ve kas dokusunda yapılan GSH, GST, SOD ve CAT aktivite seviyelerine göre belirlenen etkisi gözlenen en düşük konsantrasyon (LOEC) ve etkisi gözlenmeyen konsantrasyon (NOEC) Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının LOEC ve NOEC değerleri

Enzim	Doku	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
GSH	Karaciğer	20	-
	Solungaç	20	-
GST	Karaciğer	20	30
	Solungaç	40	30
SOD	Karaciğer	20	40
	Solungaç	30	20
CAT	Karaciğer	30	40
	Solungaç	30	40

LOEC: etkisi gözlenen en düşük konsantrasyon; NOEC: etkisi gözlenmeyen konsantrasyon

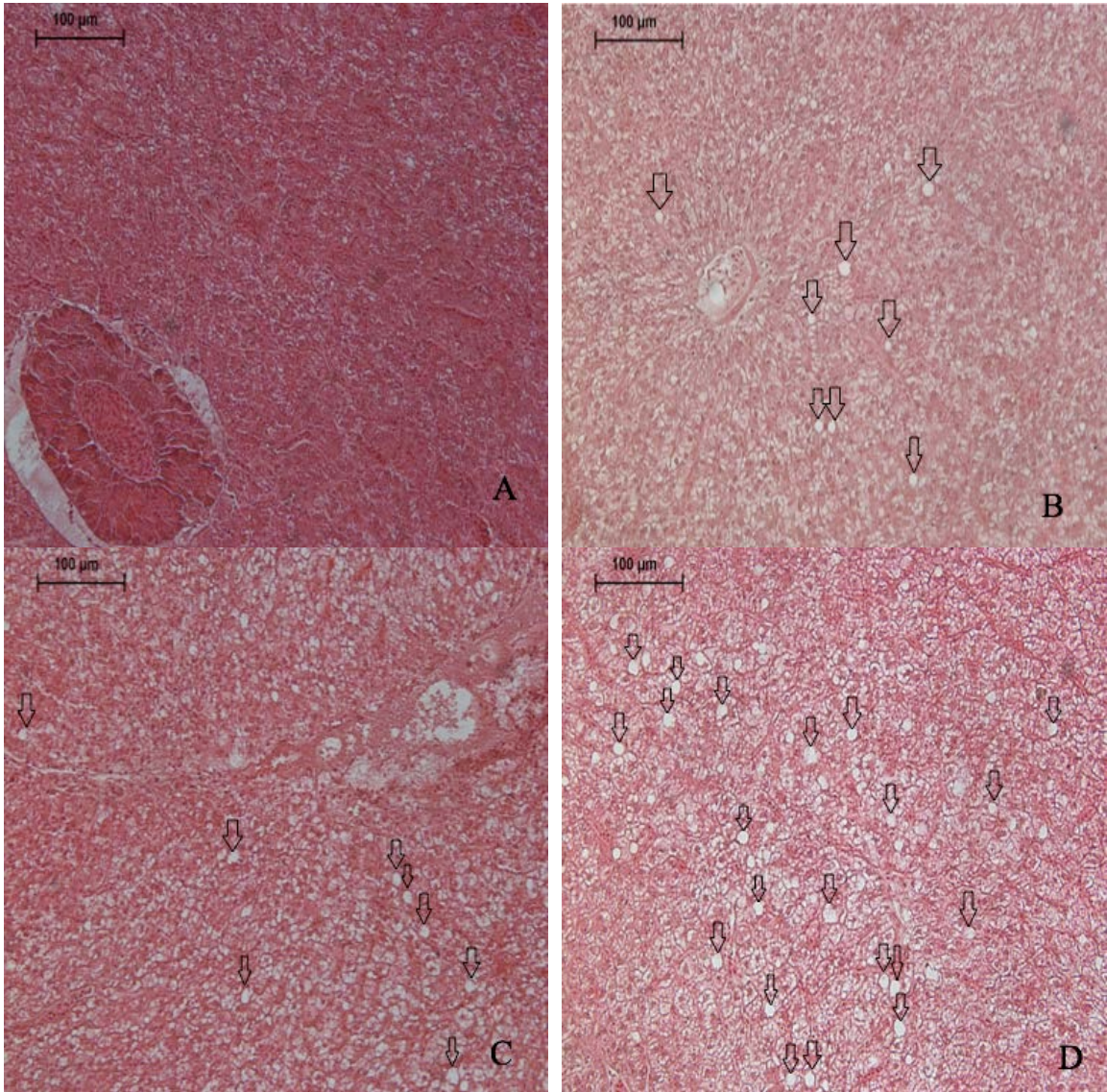
Histolojik değişiklikler

Karaciğer dokusunda vakuolizasyon (Şekil 1 B,C,D); solungaç dokusunda lamellerde kalınlaşma (yüzey epitel hücrelerinde çoğalma) (Şekil 2 B), interlamellar boşluklar (epitel tabakada ayrılma) olarak tespit edilmiştir (Şekil 2 C, D).

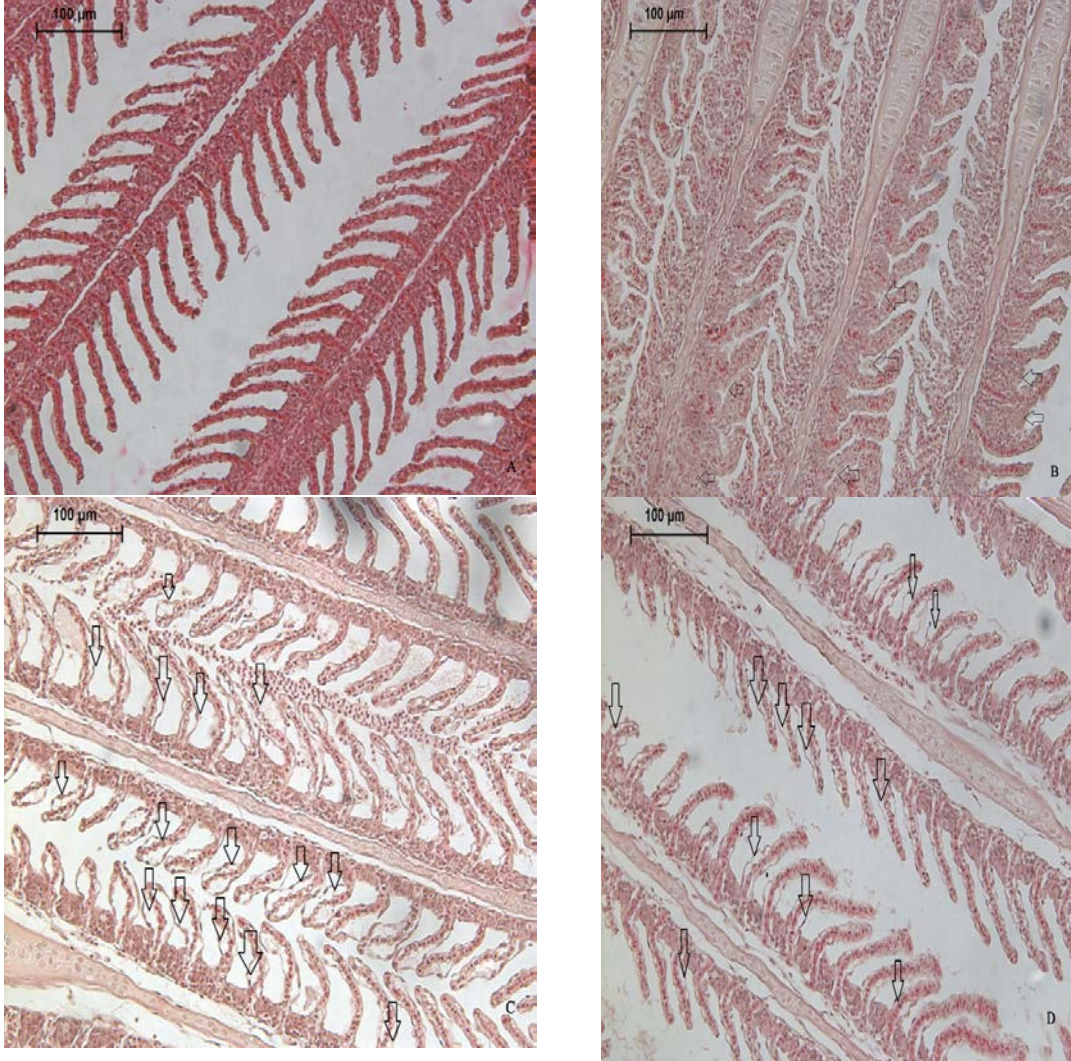
Karaciğerde 15 günlük maruziyette belirgin ve yaygın bir değişiklik gözlenmezken 30 ve 60 günlük uygulamada, vakuolizasyon belirlenmiştir. Santos ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada 50 mg/L ve üzeri FA konsantrasyonlarında *Corydoras melanistius* balığı karaciğerinde sinüzoid kapillar konjesyonu görüldüğünü, yapısal olarak stoplazmik granülasyonda değişikliklerle hepatosit hipertrofinin mevcut olduğunu belirlemişlerdir. Chinabut ve ark. (1988), 75 mg/L FA'ya 8 hafta süreyle maruz bıraktıkları

Cyprinus carpio fraylarında karaciğerde herhangi bir histolojik değişiklik görmezken *Puntius gonionotus* fraylarında karaciğerde yağ dejenerasyonu belirlemişlerdir.

Solungaç dokusunda, karaciğer dokusundaki histolojik değişikliklerin oluşum sürecinin gecikmesinin aksine FA'nın tüm konsantrasyon ve örnekleme günlerinde solungaç lamellerinde kalınlaşma (yüzey epitel hücrelerinde çoğalma), interlamellar boşluklar (epitel tabakada ayrılma) tespit edilmiştir. Santos ve ark. (2012), FA toksisitesinin solungaçlarda patolojik zararlara, solungaçların fonksiyon bozukluklarına, osmoregülasyon ve solunum dengesizliklerine ve ölüme neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca solungaç epitelinin, büyük bir yüzey alanına sahip olmasından dolayı dış çevre ile birincil temas yüzeyini oluşturduğunu ve bu yüzden sudaki mevcut kirleticilerin hedefi olduğunu ifade etmişlerdir. FA'ya maruz bıraktıkları *Corydoras melanistius* balığı solungaçlarında interlamellar boşluklarla dolu hiperplasi oluşumunu rapor etmişlerdir. Bu tespitler çerçevesinde ağır metal ve herbisit gibi çeşitli ajanlara tepki olarak gerçekleşen interlamellar boşluklarla dolu epitel hiperplasi durumunun balığın kendisini korumak için oluşan temel bir strateji gibi olduğunu tahmin etmektedirler. Chinabut ve ark. (1988), 75 mg/L FA'ya 8 hafta süreyle maruz bıraktıkları *Cyprinus carpio* fraylarında solungaçta herhangi bir histolojik değişiklik görmezken *Puntius gonionotus* fraylarında solungaç lamellerinde hiperplasi oluşumu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalarda belirlenen histolojik değişiklikler ile bu çalışmanın sonuçları benzerlik göstermektedir.



Şekil 1. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının karaciğer dokusu, (A) kontrol, (B) 30 mg/L 30 gün vakuolizasyon, (C, D) 40 mg/L 15 gün, 40 mg/L 60 gün vakuolizasyon.



Şekil 2. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının solungaç dokusu, (A) kontrol, (B) 30 mg/L 15 gün lamellerde kalınlaşma (yüzey epitel hücrelerinde çoğalma), (C, D) 30 mg/L 60 gün, 40 mg/L 60 gün interlamellar boşluklar (epitel tabakada ayrılma).

Biyokimyasal analizler

GSH içeriği Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. FA'ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının karaciğer ve solungaç dokusunda zamana bağlı olarak GSH içeriği, Ortalama±standart sapma, (n=10)

		GSH ($\mu\text{molGSH/g doku}$)		
		Süre (Gün)		
Konsantrasyon (mg/L)	Doku	15	30	60
0	Karaciğer	4016.37±714.85 ^a	4056.06±752.89 ^a	4405.24±365.63 ^a
	Solungaç	2079.52±201.82 ^a	2133.64±126.39 ^a	2236.66±197.74 ^a
20	Karaciğer	3936.98±785.95 ^b	3757.35±559.48 ^b	5043.05±454.19 ^a
	Solungaç	1958.31±515.90 ^b	2214.64±491.84 ^{ab}	2581.31±253.95 ^a
30	Karaciğer	2974.89±903.69 ^c	4323.84±543.21 ^b	5030.26±427.95 ^a
	Solungaç	1738.30±407.99 ^c	2943.94±346.91 ^b	3244.68±159.14 ^a
40	Karaciğer	3108.10±225.00 ^c	4333.25±410.60 ^b	5113.69±405.10 ^a
	Solungaç	1757.81±278.89 ^c	2355.25±471.58 ^b	2948.65±411.62 ^a

a, b, c Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak gruplar arası ortalama değerlerini farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

GST aktivite değişimi izelge 7’de verilmiştir.

Çizelge 7. FA’ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının karaciğer ve solungaç dokusunda zamana bağlı olarak GST aktivite düzeyleri, Ortalama±standart sapma, (n=10)

		GST (U/g doku)		
		Süre (Gün)		
Konsantrasyon (mg/L)	Doku	15	30	60
0	Karaciğer	16.19±5.20 ^a	16.50±2.30 ^a	19.14±1.75 ^a
	Solungaç	7.72±0.68 ^a	7.20±1.20 ^a	6.80±0.90 ^a
20	Karaciğer	17.31±2.37 ^a	14.62±2.89 ^b	15.59±2.52 ^{ab}
	Solungaç	9.50±1.60 ^a	8.74±2.16 ^a	9.47±1.64 ^a
30	Karaciğer	13.67±3.37 ^a	16.23±2.11 ^a	15.94±2.61 ^a
	Solungaç	10.35±2.49 ^a	11.58±1.33 ^a	10.07±1.75 ^a
40	Karaciğer	16.01±3.48 ^b	14.42±3.43 ^b	20.11±4.32 ^a
	Solungaç	9.31±1.26 ^b	9.59±1.67 ^{ab}	11.15±2.49 ^a

a, b Duncan oklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak gruplar arası ortalama değerlerin farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

SOD aktivite düzeyleri izelge 8’de verilmiştir.

Çizelge 8. FA’ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının karaciğer ve solungaç dokusunda zamana bağlı olarak SOD aktivite düzeyleri, Ortalama±standart sapma, (n=10)

		SOD (U/g doku)		
		Süre (Gün)		
Konsantrasyon (mg/L)	Doku	15	30	60
0	Karaciğer	1684.98±206.16 ^c	2173.47±89.15 ^b	2649.55±218.01 ^a
	Solungaç	32.85±9.81 ^c	40.14±5.91 ^b	49.00±4.01 ^a
20	Karaciğer	1675.09±332.64 ^b	1821.34±460.88 ^b	2589.40±181.61 ^a
	Solungaç	25.86±5.78 ^c	39.50±5.49 ^b	44.90±3.89 ^a
30	Karaciğer	1599.19±295.13 ^b	1703.21±366.58 ^b	2566.22±198.92 ^a
	Solungaç	23.26±15.60 ^b	37.94±5.42 ^a	42.86±4.94 ^a
40	Karaciğer	1165.12±394.56 ^c	1573.78±336.00 ^b	2276.27±198.22 ^a
	Solungaç	21.48±8.66 ^b	34.58±7.04 ^a	41.03±6.31 ^a

a, b, c Duncan oklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak gruplar arası ortalama değerlerin farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

CAT aktivite seviyeleri izelge 9’da belirtilmiştir.

Çizelge 9. FA’ya 60 gün süreyle maruz bırakılan sazan balığının karaciğer ve solungaç dokusunda zamana bağlı olarak CAT aktivite düzeyleri, Ortalama±standart sapma, (n=10)

		CAT (U/mg doku)		
		Süre (Gün)		
Konsantrasyon (mg/L)	Doku	15	30	60
0	Karaciğer	16.97±2.35 ^a	18.72±1.63 ^a	18.80±2.53 ^a
	Solungaç	0.33±0.09 ^a	0.42±0.10 ^a	0.34±0.10 ^a
20	Karaciğer	20.29±1.07 ^a	18.85±1.97 ^a	18.89±2.29 ^a
	Solungaç	0.51±0.07 ^a	0.42±0.09 ^a	0.45±0.12 ^a
30	Karaciğer	19.07±1.07 ^b	20.43±1.19 ^a	18.62±1.70 ^b
	Solungaç	0.37±0.08 ^b	0.58±0.13 ^a	0.40±0.08 ^b
40	Karaciğer	19.06±1.51 ^a	18.71±2.28 ^a	19.30±1.03 ^a
	Solungaç	0.44±0.12 ^a	0.54±0.15 ^a	0.54±0.09 ^a

a, b Duncan oklu karşılaştırma testine göre, formaldehit konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak gruplar arası ortalama değerlerin farklılıklarını ifade etmektedir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

GSH’nin karaciğer dokusunda 20 mg/L’de 15, 30 günde önemli olarak azaldığı, 30, 40 mg/L’de 15, 30 günde önemli olarak değiştiği; solungaç dokusunda 20 mg/L’de 15 günde önemli olarak azaldığı, 30, 40

mg/L'de 15, 30 günde önemli olarak değiştiği görülmüştür (Çizelge 6). GST'nin karaciğer dokusunda 20, 40 mg/L'de 30 günde önemli olarak azaldığı, 40 mg/L'de 15 günde önemli olarak azaldığı; solungaç dokusunda 40 mg/L'de 15 günde önemli olarak arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 7). SOD'un karaciğer dokusunda 20, 30 mg/L'de 15 günde önemli olarak azaldığı; solungaç dokusunda 30, 40 mg/L'de 15, 30 günde önemli olarak azaldığı (Çizelge 8) görülmüştür. CAT'ın karaciğer dokusunda 30 mg/L'de 15, 60 günde önemli olarak değiştiği; solungaç dokusunda 30 mg/L'de 15, 60 günde önemli olarak değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 9). Trivedi ve ark. (2012), *Carassius auratus*'u bakır sülfat pentahidrata (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mg/L) 24 saat süreyle maruz bırakmış ve karaciğer dokusunda GSH, GST, SOD, CAT aktivite düzeylerine bakmışlardır. 0.1 mg/L'de SOD ve CAT aktivitesinde önemli bir değişiklik olduğunu, 0.5, 1.5 mg/L'de tüm parametrelerde önemli bir değişiklik olduğunu bildirmişlerdir. Yonar ve ark. (2014), FA uygulanan gökkuşuğu alabalığında bazı hematolojik ve antioksidan parametreleri araştırmışlardır. 4 gün boyunca 30 dk süreyle 40 ve 120 mg/L FA uygulamışlar ve karaciğer, böbrek ve solungaç dokusunda GST ve GSH ölçmüşlerdir. GST ve GSH'ın önemli olarak arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda belirlenen enzim aktivite düzeyleri ile bu çalışmanın sonuçları benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmayla formalinin sazan balığında incelenen kriterler için hafif toksik etkiye sahip olduğu düşünülebilir. Formalin akuakültürde çok yaygın kullanıldığından, kontrolsüz ve gereksiz kullanımından kaçınılması oluşabilecek olumsuz biyolojik etkilerini azaltacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (proje no: 2015-SU-B117).

Kaynaklar

- Adeyemo OK, Akano OF, Emikpe BO (2012). Effect of formalin on spawning success and organ histology in *Clarias gariepinus*. Research Journal of Environmental Toxicology 6(2): 42–50.
- Aebi H (1974). Catalase, s. 673–684, In: Methods of enzymatic analysis, Bergemeyer HU (eds), Academic Press, New York.
- Anonim (1995). Standart methods for the examination of water and wastewater. 19nd ed. APHA, AWWA, WEF, Washington, USA.
- Anonim (1999). Toxicological profile for formaldehyde. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology/Toxicology Information Branch 1600 Clifton Road NE, E-29 Atlanta, Georgia 30333.
- Balta F, Kayış Ş, Dengiz Balta Z (2009). Doğu karadeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) görülen costiasis enfestasyonu ve tedavisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi 5(1–2): 11–16.
- Beutler E (1984). Red cell metabolism. s. 105–106, In: A manual of biochemical methods (3nd ed.), Grune and Startton, New York.
- Bulut C (2010). Bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O) ve formaldehit (CH₂O)'in gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) histopatolojik ve hematolojik etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta (yüksek lisans tezi, basılmamış).
- Çetinkaya O (2005). Akuatik toksikoloji: balık biyodeneyleleri, bölüm 7, s. 169–217, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Karataş M (eds) Nobel, Yayın No. 772, Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi No.1, Ankara.
- Çetinkaya O, Şen F, Elp M (2005). Balıklarda büyüme ve büyüme analizleri, bölüm 4, s. 93–120, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Karataş M (eds) Nobel, Yayın No. 772, Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi No.1, Ankara.
- Chinabut S, Limsuwan C, Tonguthai K, Pungkachonboon T (1988). Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. Network of Aquaculture Centres in Asia, NACA/WP/88/73.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130–7139.
- HACH (1999). DR/2010 Spectrometer procedures manuel, Loveland, USA 850p.
- IPCS (1989). Formaldehyde. Geneve, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 219 pp. (Environmental Health Criteria 89).

- Klobucar GIV, Stambuk A, Pavlica M, Peric MS, Hackenberger BK, Hylland K (2010). Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ekotoxicology* 19: 77–84.
- Kurutuş EB, Şahan A, Altun T (2009). Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of spotted barb (*Capoeta barroisi* Lortet, 1894) living in the river Ceyhan, Adana, Turkey. *Turk J. Biol.* 33: 275–282.
- Marklund SL (1990). Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. *Methods in Enzymology* 186: 260–265.
- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33(3): 414–425.
- Meinelt T, Pietrock M, Burnison K, Steinberg C (2005). Formaldehyde toxicity is altered by calcium and organic matter. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 121–124.
- Nouh WG, Selim AG (2013). Toxopathological studies on the effect of formalin and copper sulphate in tilapia as a commonly used disinfectant in aquaculture. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 3(6): 7–20.
- OECD (2000). Fish juvenile growth test. OECD TG 215 (2000), C.14, Dir 2001/59/EC (O. J. L 225 2001).
- Özgür ME, Bayır İ, Albayrak Ö (2011). Gökkuşluğu alabalığı yavrularında formaldehit akut toksisitesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4(1): 71–75.
- Parlak H, Arslan ÖÇ, Boyacıoğlu M, Karaaslan MA (2009). Ekotoksikoloji, ders kitabı. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları, no:79, ders kitabı dizini no:39, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova–İzmir.
- Sanoli AB, Kanabur VV (2001). Acute toxicity of cyanide and formalin to a fresh-water fish *Lepidocephalichthys guntea* (catfish). *Indian J. Fish.* 48(1): 99–101.
- Santos RFB, Dias HM, Fujimoto RY (2012). Acute toxicity and histopathology in ornamental fish Amazon Bluespotted Corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 84(4): 1001–1007.
- Schlenk D, Handy R, Steinert S, Depledge MH, Benson W (2008). Biomarkers, pp. 683–731, , In: The Toxicology of Fishes, Unit III. Methodologies and Applications, 16. Di Giuhio RT and Hinton DE (eds), CRC Press Taylor and Francis Group, USA.
- Tisler T, Zagorc-Koncan J (1997). Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. *Water, Air, and Soil Pollution* 97(3): 315–322.
- Tokşen E (2004). Çipura yavrularında (*Sparus aurata* L., 1758) görülen *Trichodina spp.* enfeksiyonlarına formaldehit banyolarının etkisi. *EÜ Su Ürünleri Dergisi* 21(1–2): 31–33.
- Trivedi MH, Sangai NP, Renuka A (2012). Assessment of toxicity of copper sulphate pentahydrate on oxidative stress indicators on liver of gold fish (*Carassius auratus*). *Bulltin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 1(9): 52–57.
- Ünal G (2005). Balıklarda Histolojik Teknikler, bölüm 11, s. 301–356, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, Karataş M (eds) Nobel, Yayın No. 772, Fen ve Biyoloji Yayınları Dizisi No.1, Ankara.
- Ünsal M (1998). Kirlilik deneyleri: Yöntemler ve sonuçların değerlendirilmesi. TKB, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bodrum, Seri A, No.11, 168.
- USEPA (1989). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA 600/4-89/001. Office of Research and Development, U.S. EPA, Cincinnati, OH, USA.
- USEPA (1991). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA 600/4-90/027. Office of Research and Development, U.S. EPA, Washington, D.C., USA.
- Yang SD, Lin TS, Liu FG (2005). Studies on the formalin toxicity and formaldehyde residues in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Taiwan Fisheries Research* 13(1): 25–34.
- Yonar SM, Sağlam N, Yöntürk Y, Aytemur A, Koşar A (2014). Formaldehit uygulanan gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda bazı hematolojik ve antioksidan parametrelerin araştırılması. *Journal of Fisheries Sciences.com* 8(4): 317–323.