



Triklorfonun *Gammarus pulex*'te Bazı Enzimatik Antioksidanlara Etkisinin Değerlendirilmesi

ŞuleTatar¹, Osman Serdar^{2*}, Dilan Tulpar³

1 Siyaset Bilimi ve Kamu Yönetimi Bölümü, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, Munzur Üniversitesi, Tunceli, Türkiye

2 Temel Bilimler Bölümü, Su Ürünleri Fakültesi, Munzur Üniversitesi, Tunceli, Türkiye

3 Çevre Yüksek Mühendisi, Diyarbakır, Türkiye

E-Posta: sytatar@munzur.edu.tr, oserdar@munzur.edu.tr, dilanntulpar@gmail.com

Gönderim 07.05.2024; Kabul 16.07.2024

Özet: Organofosfat (OP) bileşikler zararlıları ve böcekleri yok etmek için en yaygın kullanılan kimyasal maddelerdir. Triklorfon tarımda sebze ve meyve zararlılarına karşı kullanılan bir OP pestisittir. Bu çalışmada triklorfona maruz bırakılan *Gammarus pulex*'in antioksidan tepkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Asetilkolinesteraz (AChE), sitokrom P450 (CYP1A1) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri, ELISA yöntemi kullanılarak mikropłaka okuyucuda ölçülmüştür.

AChE enzim aktivitesini kontrol ile karşılaştırdığımızda tüm gruplarda (LC50 değerinin 1/8, 1/16 ve 1/32'sini içeren A, B ve C konsantrasyon grupları) 24 saat sonra istatistiksel açıdan anlamsız ($p>0,05$) artmış, 96 saatte ise istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0,05$) azalmıştır. Maruziyet süreleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında A ve B gruplarındaki azalmanın ancak 96 saatlik süre sonunda anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). CYP1A1 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamsız azalmıştır ($p>0,05$). GST enzim aktivitesi her iki grupta da uygulamadan 24 ve 96 saat sonra kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0,05$) artmıştır.

G. pulex'te triklorfon'a karşı AChE, CYP1A1 ve GST enzim aktivitelerindeki değişimlere bakıldığında bu enzimlerin yararlı biyobelirteçler olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Triklorfon, antioksidan enzimler, asetilkolinesteraz, *Gammarus pulex*, oksidatif stres

Determination of the Effects of Trichlorfon on Enzymatic Antioxidants in *Gammarus pulex*

Received 07.05.2024; Accepted 16.07.2024

Abstract: Organophosphate (OP) compounds are the most commonly used chemical substances to eliminate pests and insects. Trichlorfon is an OP pesticide used in agriculture against vegetable and fruit pests. In this study, it was aimed to investigate antioxidant responses of *Gammarus pulex* exposed to trichlorfon. Acetylcholinesterase (AChE), cytochrome P450 (CYP1A1) and glutathione S-transferase (GST) enzyme activities were measured in a microplate reader using the ELISA method.

When we compared AChE enzyme activity with control, it increased in all groups after 24 hours ($p>0.05$) and decreased in 96 hours ($p<0.05$). When the exposure times were statistically compared, the decrease in the A and B groups was found to be significant only at the end of the 96-hour period ($p<0.05$). CYP1A1 enzyme activity decreased in all groups compared to control group ($p>0.05$). GST enzyme activity was increased in both groups after 24 and 96 hours of application compared to control ($p<0.05$).

When we look at the changes in AChE, CYP1A1 and GST enzyme activities in *G. pulex* against trichlorfon, it was concluded that these enzymes can be used as useful biomarkers. *G. pulex* has proven to be an effective bioindicator that shows trichlorfon pollution in water.

Key Words: Trichlorfon, antioxidant enzymes, acetylcholinesterase, *Gammarus pulex*, oxidative stress.

GİRİŞ

Triklorfon, kimyasal formülü C₄H₈Cl₃O₄P olan organofosfatlı (OP) bir pestisittir. Triklorfon, en çok kullanılan bileşiklerden biridir ve orta derecede toksiktir [1]. Normal kullanım koşullarında çok hızlı bir şekilde, daha toksik olan ve balık, yengeç ve karides gibi hedef dışı organizmalar için potansiyel bir tehdit oluşturan diklorvos formuna hidrolize olur [2-4]. Son yıllarda yüzden fazla farklı OP bileşiği sentezlenmiştir. Dünya genelinde veterinerlik, ilaç endüstrisi, hortikültür, tarım ve konut gibi alanlarda

*İlgili E-posta / Corresponding E-mail: oserdar@munzur.edu.tr (ORCID: 0000-0003-1744-8883)

Bu çalışma Munzur Üniversitesi BAP biriminin YLMUB017-16 sayılı projesi ile desteklenerek hazırlanan yüksek lisans tezinin bir parçasıdır.

yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [5]. OP pestisitlerin hedef organizmaya karşı seçiciliği neredeyse yoktur ve bu nedenle çoğu hedef dışı organizma üzerinde yüksek derecede akut toksisiteye sahiptir. Bu nedenle, OP bileşiklerinin etkileri nedeniyle ekosistemde birçok canlı zehirlenme riski altındadır [6].

Ekolojik çalışmalarda incelenmesi gereken bazı biyobelirteçler bulunmaktadır. Bunların başlıcaları; kondisyon faktörü, sitokrom P-450 enzimleri, DNA hasarı, asetilkolinesteraz enzim aktivitesi, metalotionin sentezi, antioksidan enzimler, lipid peroksidasyonu, vitellojen seviyeleri ve histopatolojik incelemelerdir [7].

OP insektisitlerin toksik etkileri, kolinesteraz inhibitörleri olarak görülür. Bunlar, asetilkolinin nöromüsküler kavşaklarda ve kolinerjik sinapslarda hidrolizini gerçekleştiren AChE'yi inhibe etme kapasitesine sahiptir [8]. AChE inhibitörü olarak sonuçta, serbest radikallerin birikimine ve böylece hücre hasarına yol açan lipid peroksidasyonu (LPO) başlar [9]. Bu nedenle, beyin AChE aktivitesinin inhibisyonu, karasal ve sucul organizmalarda OP'lere maruz kalmanın teşhisi için en yaygın olarak kullanılan biyobelirteç olmuştur. Bazı organik sınıfları metabolize ve detoksifiye eden sitokrom P450 ailesinin önemli bir üyesi olan Sitokrom P450 1A (CYP1A), önemli bir biyobelirteçtir [10-11]. Bu kimyasallar CYP1A ekspresyonunu indükleyebilir [12]. Zararlı eksojen maddelere maruz kalma sırasında CYP1A ekspresyonu dokularda indüklenir [13]. Bu nedenle, CYP1A toksikolojik yanıtları izlemede yaygın olarak kullanılan bir biyobelirteçtir [14]. GST, non-polardaki karbon, kükürt veya azot atomları içeren elektrofilik bileşiklerin indirgenmiş glutatyonla konjuge edilmesini katalize eden bir enzim grubudur [15]. Bu şekilde, GST ilaçların, pestisitlerin ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasını sağlar.

Gammaridae familyasına ait tatlı su türleri, geniş bir yayılıma sahip olmaları, kolay toplanabilmeleri, kirlenmeye karşı toleransları ve gösterge türler olmaları nedeniyle kirletici maddelerin ekolojik toksik etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan organizmalardır [16-18].

Bu çalışmada, doğal ortamında bir hedef dışı organizma olan *Gammarus pulex*, triklorfon'a maruz bırakılarak oksidatif stres biyobelirteçleri olan AChE, CYP1A1 ve GST aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın canlı materyalini oluşturan *G. pulex* bireyleri, Munzur Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde yetiştirilen ergin erkek bireylerden elde edilmiştir. Model organizmalar, laboratuvarında 18°C'de, 12:12 parlak / karanlık periyotta stok akvaryumlarına yerleştirilmiş ve deneylere kadar söğüt yaprakları ile beslenmiştir [18-20]. Stok akvaryum suyu fizikokimyasal parametrelerinden pH, çözülmüş oksijen, iletkenlik ve su sıcaklığı, YSI marka Professional Plus model multiparametre cihazı ile günlük olarak ölçülerek kayıt edilmiştir.

Triklorfon'un ergin *G. pulex* üzerindeki LC50 (letal konsantrasyon) değeri probit analizi ile hesaplanmıştır [21]. Triklorfon'un *G. pulex* üzerindeki 96 saatlik LC50 değeri belirlenmiştir. Bu amaçla, aralık belirleme testleri sonrasında belirlenen konsantrasyonlarda 96 saatlik LC50 değeri hesaplanmıştır. Organizmalar daha sonra LC50 değerinin 1/8, 1/16 ve 1/32'si (0,05; 0,025 ve 0,0125mg/L triklorfon) oranındaki öldürücü olmayan triklorfon konsantrasyonlarına 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır [21]. Dört uygulama grubu aşağıda açıklandığı gibi tasarlanmıştır:

- Kontrol grubu : Triklorfon içermeyen grup,
- Grup A : LC50 değerinin 1/8'i oranında triklorfon içeren grup,
- Grup B : LC50 değerinin 1/16'sı oranında triklorfon içeren grup,
- Grup C : LC50 değerinin 1/32'si oranında triklorfon içeren grup.

Aralık belirleme, akut toksisite (LC50) testleri ve deneysel uygulamalar da dahil olmak üzere tüm deneysel uygulama testleri üç kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Tüm biyotestlerin her tekrarında on organizma kullanılmıştır. Deneysel uygulamalar sırasında, *G. pulex* bireylerinin beslenmesi durdurulmuştur.

G. pulex bireyleri tartılmış ve AChE için 1/10 w/v, CYP1A1 ve GST için ise 1/5 w/v oranında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS tamponu) eklenerek buz ile homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Bu örnekler, bir soğutmalı santrifüjde 15000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlar -80°C dondurucuda deneyler tamamlanana kadar saklanmıştır. Enzim aktiviteleri, The CUSABIO Şirketi'nden satın alınan ELISA kitleri (AChE, CYP1A1 ve GST'nin sırasıyla katalog numaraları: CSB-E17001Fh; CSB-EL006395FI ve CSB-EL006395FI) kullanılarak belirlenmiştir.

İstatistiksel analizler için SPSS versiyon 24.0 yazılımı kullanılmıştır. Akut toksisite testi (96 saatlik LC50) SPSS versiyon 24.0 PROBIT analizi kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarının biyokimyasal parametrelerindeki değişiklikler, iki yönlü varyans analizi (TWOWAY - ANOVA) ile test edilmiştir [20, 22].

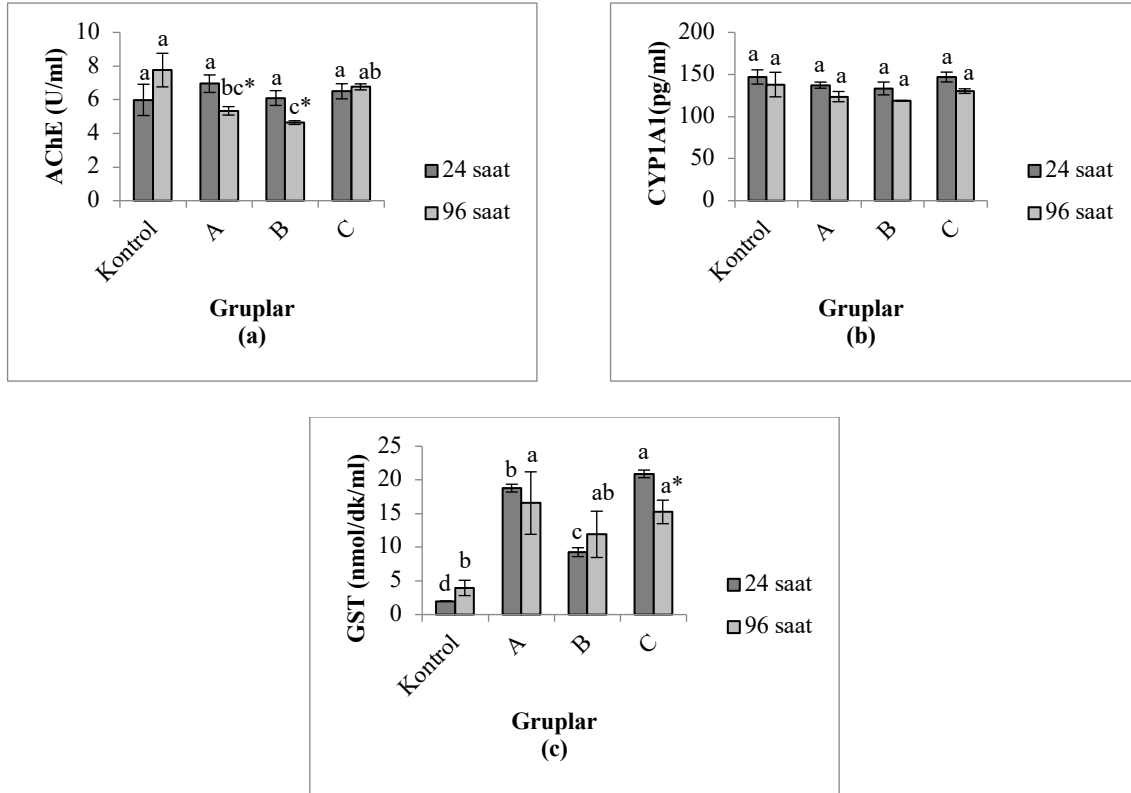
BULGULAR

Stok akvaryum suyu fizikokimyasal parametreleri, pH $7,93 \pm 0,41$; çözünmüş oksijen $10,79 \pm 0,78$ ppm; iletkenlik $3,78 \pm 0,23$ ms/cm ve su sıcaklığı $18 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak kayıt edilmiştir.

Triklorfon'un *G. pulex*'e karşı LC50 (letal konsantrasyon) değeri, probit analizi ile $0,40 \pm 0,06$ mg/l triklorfon olarak hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Triklorfon'un *G. pulex* üzerindeki akut toksisite (LC50) değerleri

Tekrar	LC50 (mg/L)
I.	0,359
II.	0,467
III.	0,360
Ortalama	$0,400 \pm 0,06$



Şekil 1. *G. pulex*'in triklorfon'a maruz kaldığı durumlarda a) AChE aktivite (U/ml), b) CYP1A1 aktivite (pg/ml) ve c) GST aktivite (nmol/dk/ml).

(*) Aynı grupta farklı maruz kalma süreleri arasındaki iki yönlü bağımsız T testine göre istatistiksel farklılıkları gösterir; * $p < 0,05$.

Harfler (a, b, c), aynı maruz kalma süresindeki tüm uygulama grupları arasındaki Duncan'ın çoklu aralık testindeki istatistiksel farklılıkları gösterir; a,b,c,d $p < 0,05$.

AChE aktivite, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda 24 saat sonra artmıştır ($p > 0,05$). Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında, tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak, 96 saat sonra, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda azalmıştır ($p < 0,05$). Bu azalma, grup A ve B'de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Maruz kalma

süreleri karşılaştırıldığında, 24 saat sonra A ve B uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 1a).

CYP1A1 aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda 24 ve 96 saat sonra azalmıştır. Bu azalma, 24 ve 96 saat sonra tüm tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 1b).

GST aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda artmıştır. Maruz kalma süreleri (24-96 saat) karşılaştırıldığında, C grubu hariç tüm maruziyet gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Şekil 1c).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Toksikoloji, fiziksel veya kimyasal ajanların canlı organizmalar üzerindeki zararlarını ve yıkıcı etkilerini inceler. Bu bağlamda sucül toksikoloji testleri, toksikolojide fiziksel veya kimyasal ajanların canlı organizmalar üzerindeki zararlarını ve yıkıcı etkilerini belirlemeyi amaçlamaktadır [23]. Suda yaşayan organizmalar üzerinde yapılan toksisite testlerinin temel amacı, bir maddenin hangi konsantrasyonda organizmaya zararlı olduğunu belirlemektir. Günümüzde biyoanalizler organizmaların fizyolojisi, patolojisi, beslenmesi, davranışlarını kapsarlar. Birçok konuyu aydınlatmak için bir araç olarak kullanılmaktadır [24]. LC50 değeri kimyasal maddelerin kısa süreli uygulamalardan dolayı akut toksik etkilerinin değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir [25]. Bu çalışmada, test organizmasının maruz kalacağı ölümcül olmayan konsantrasyonu belirlemek amacıyla triklorfon'un 96 saatlik LC50 değeri statik yöntemle belirlenmiştir.

Triklorfon tarım alanlarında kullanılmakta olup, süzülerek veya toprakla sürüklenerek sulara ulaşmaktadır. Sudaki triklorfon balığın derisi ve solungaçlarından emilerek balığın vücuduna geçerek öldürücü ve ölümcül etkilere neden olur [4].

Araştırmacılar *G. pulex*'teki kolinesteraz (ChE) aktivitesini incelemişlerdir. Sonuçlar *G. pulex*'in asetilkolinesterazın tipik özelliklerini gösteren tek bir ChE'ye sahip olduğunu göstermiştir [26]. Pek çok çalışma pestisitlerin AChE aktivitesini engellediğini de bildirmiştir.

24 saatlik uygulamadan sonra *Cyprinus carpio*'da triklorfon'a maruz kalmanın AChE aktivitesinde %52-57 oranında azalmaya neden olduğu bulunmuştur [27]. Triklorfon uygulaması sonucunda AChE'nin *Oreochromis niloticus*'ta %85 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir [4]. Klorpirifos insektisitinin *G. pulex*'te AChE aktivitelerini inhibe ettiği bildirilmiştir [26]. Yapılan bir çalışmada atrazin ve endosulfan pestisitlerin birlikte ve ayrı ayrı uygulandığı *Gammarus kichneffensis*'in AChE düzeyleri incelenmiştir. Çoklu etkilere maruz kalan canlılarda AChE aktivitesinin, pestisitlerin tek başına kullanılmasıyla baskılandığı tespit edilmiştir. Atrazin ve indoxacarb'ın etkisi incelendiğinde; pestisitlerin çoklu etkilerine 24 ve 48 saatte maruz bırakılan hayvanların enzim aktivitesinin, tek pestisit uygulamasına kıyasla önemli ölçüde inhibe olduğu gözlenmiştir [28]. Çalışmamızda AChE aktiviteleri 24 saat sonra artmış, 96 saat sonra ise azalmıştır. AChE aktivitesindeki azalmanın antikolinesteraz olan organofosfatlı insektisitlerin inhibitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu artışın olumsuz bir adaptasyon olduğu ve pestisit direncinin göstergesi olduğu düşünülmektedir [29].

CYP1A1, organik kirleticilere maruz kalmanın çok iyi bir biyobelirteçidir. Sitokrom P450'ler ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır ve metabolizmadaki işlevi, kimyasalların toksik etkilerine duyarlılıktaki tür çeşitliliği ile ilişkili olabilir [30-32]. 4 mg/L triklorfon maruziyetinden sonra *C. carpio* L.'de CYP1A aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir [13]. Ksenobiyotiklerin varlığı her zaman CYP1A1 düzeylerini artırmayabilir. Bu, ya kirletici konsantrasyonun yüksek olduğunu ya da kirleticilerin varlığının CYP1A1'i spesifik olarak inhibe ettiğini göstermektedir [33]. Yapılan bir çalışmada farklı örnekleme noktalarından alınan CYP1A enzimlerinin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve referans bölgeye göre pestisit kullanımının yoğun olduğu tarım bölgelerinden örneklenen balıklarda baskılandığı tespit edilmiştir [34]. Çalışmamızda CYP1A1 aktiviteleri tüm gruplarda kontrol grubuna göre 24 ve 96 saat sonra azalmıştır.

Karakaya Baraj Gölü'nden alınan sazan karaciğeri üzerinde araştırmacıların yaptıkları bir çalışmada pestisit birikiminin GST aktivitesinde artışa neden olabileceğini öne sürülmüştür [35]. Aynı çalışma grubu Sarıyar Barajı'nda sazanın karaciğeri üzerindeki GST ve CYP aktivitelerini ölçmüş ve pestisit kirliliğinin yüksek olduğu Sarıyar'da referans noktasına göre GST aktivitesinin önemli ölçüde yüksek olduğunu bulmuştur [36]. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular literatürdeki diğer çalışmalarla

benzerlik göstermektedir. Artan GST aktivitesi muhtemelen daha yüksek bir triklorfon konsantrasyonuna maruz kalma sonrası adaptasyondan kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre; tarımda kullanılan triklorfon insektisitinin *G. pulex* üzerinde toksik etki yaptığı düşünülmektedir. *G. pulex*'te triklorfonun toksik etkilerinin araştırılmasında AChE, CYP1A1 ve GST'nin yararlı biyobelirteçler olduğu sonucuna varılmıştır. Bu biyobelirteçlerin seviyelerindeki konsantrasyon ve zamana bağlı olarak elde edilen sonuçlar, test organizmasının toksik maddeye tepkisinin toksik maddenin konsantrasyonuna ve uygulama süresine göre değiştiğini göstermektedir. Bu nedenle bu atıkların sınır değerlere uygunluğu düzenli olarak kontrol edilmeli ve toksikolojik veriler dikkate alınarak sınır değerler belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Woo SJ, Kim NY, Kim SH, Ahn SJ, Seo JS, Jung SH, Cho MY, Chung JK (2018) Toxicological effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio* L. following thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 209:18-27.
- [2] Treves-Brown KM (2000) *Applied fish pharmacology*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London 309p.
- [3] Chang CC, Lee PP, Liu CH, Cheng W (2006) Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 20:574–585.
- [4] Guimaraes ATB, Silva De Assis HC, Boeger W (2007) The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 68:57–62.
- [5] Kwong TC (2002) Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* 24:144–149.
- [6] Fulton MH, Key PB (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ Toxicol Chem* 20:37–45.
- [7] Valvanidis A, Vlachogianni T (2010) Integrated biomarkers in aquatic organisms as a tool for biomonitoring environmental pollution and improved ecological risk assessment. *Science Advances on Environmental Chemistry Toxicology and Ecotoxicology issues*, www.chemtox-ecotox.org
- [8] Amitai G, Moorad D, Adani A, Doctor BP (1998) Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem Pharmacol* 56:293–299.
- [9] Slaninova A, Smutna M, Modra H, Svobodova Z (2009) A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol Lett* 30(1).
- [10] Oinonen T, Saarikoski S, Husgafvel-Pursiainen K, Hirvonen A, Lindros KO (1994) Pretranslational induction of cytochrome P450A enzymes by β -naphthoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones. *Biochem Pharmacol* 48:2189–2197.
- [11] Shimada T, Sugie A, Shindo M, Nakajima T, Azuma E, Hashimoto M, Inoue K (2003) Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 187:1–10.
- [12] Stegeman JJ, Woodin BR, Singh H, Oleksiak MF, Celander M (1997) Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 116:61–75.
- [13] Woo SJ, Kim NY, Kim SH, Ahn SJ, Seo JS, Jung SH, Cho MY, Chung JK (2018) Toxicological effects of trichlorfon on hematological and biochemical parameters in *Cyprinus carpio* L. following thermal stress. *Comp Biochem Phys C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 209:18-27.
- [14] Moon YS, Jeon HJ, Nam TH, Choi SD, Park BJ, Ok YS, Lee SE (2016) Acute toxicity and gene responses induced by endosulfan in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chem Spec Bioavailab* 28:103–109.
- [15] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88.

- [16] Tatar S, Cıkcıoğlu Yildirim N, Serdar O, Yildirim N, Ogedey A (2018) The using of *Gammarus pulex* as a biomonitor in ecological risk assessment of secondary effluent from municipal wastewater treatment plant in Tunceli, Turkey. *Hum Ecol Risk Assess* 24(3):819–829.
- [17] Yildirim NC, Yaman M (2019) The usability of oxidative stress and detoxification biomarkers in *Gammarus pulex* for ecological risk assessment of textile dye methyl orange. *Chem Ecol* 35(4):319–329.
- [18] Serdar O (2019) The effect of dimethoate pesticide on some biochemical biomarkers in *Gammarus pulex*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21): 21905-21914.
- [19] De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lüring M, Peeters ETHM (2006) Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 78(3):209–216.
- [20] Serdar O, Yildirim NC, Tatar S, Yildirim N, Ogedey A (2018) Antioxidant biomarkers in *Gammarus pulex* to evaluate the efficiency of electrocoagulation process in landfill leachate treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 12538-12544.
- [21] Ödün NA, Serdar O (2022) Zebra Midye (*Dreissena polymorpha*)'de Malathionun Akut Toksisitesi (LC50)'nin Belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 7(3): 269-273.
- [22] Kalaycı Ş (2010) SPSS uygulamalı çok değişkenli istatistik teknikleri. Asil Publications Ankara/Turkey.
- [23] Serdar O, Aydın R, Çalta M (2019) The Evaluation in Different Temperature of Acute Toxic Effect of Cadmium on *Gammarus pulex* (Freshwater Amphipoda). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(3): 366-370.
- [24] Serdar O (2021) Determination of the effect of cyfluthrin pesticide on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by Some Antioxidant Enzyme Activities. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 6(1): 77-83.
- [25] Saygı Ş (2003) Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane tıp dergisi (GTD) Gülhane Medical Journal (GMJ)*, 291.
- [26] Xuereb B, Noury P, Felten V, Garric J, Geffard O (2007) Cholinesterase activity in *G. pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236:178–189.
- [27] Chandrasekara HU, Pathiratne A (2005) Influence of low concentrations of trichlorfon on hematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac Res* 36:144–149.
- [28] Demirci Ö (2013) Çeşitli pestisitlerin *Gammarus kischineffensis*'in antioksidan enzim sistemi ve bazı biyobelirteçler üzerine etkisi. Dicle University Master Thesis 152p.
- [29] Pala A (2013) Triklorfon uygulanan pullu sazan (*Cyprinus Carpio*)'da asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi ve bazı kan parametrelerinin araştırılması. Fırat University Master Thesis 60p.
- [30] Bairy ACD, Woodin BR, Stegeman JJ (1999) Elevated levels of multiple Cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-Sao Paulo, Brazil. *Aquat Toxicol* 44(4):289–305.
- [31] Delescluse C, Lédéric N, Li R, Piechocki MP, Hines RN, Gidrol X, Rahmani R (2001) Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(4): 399-407.
- [32] Tatar S, Yildirim NC, Serdar O, Ergüven GO (2020) Can Toxicities Induced by Insecticide Methomyl be Remediated Via Soil Bacteria *Ochrobactrum thiophenivorans* and *Sphingomonas melonis*?. *Current Microbiol* 77:1301-1307.
- [33] Wirgin II, Theodorakis CV (2002) Molecular biomarkers in aquatic organisms. In: Adams SM (ed) *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. Bethesda AFS 73–82.
- [34] Karaca M (2010) Sucul sistem canlılarında organoklorlu pestisitlerin analizi ve antioksidan enzim aktivitelerinin biyogösterge amaçlı uygulanması. Ege University Master Thesis 163p.
- [35] Özmen M, Güngördü A, Kuçukbay FZ, Güler RE (2006) Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicology* 15:157–169.
- [36] Özmen M, Ayas Z, Güngördü A, Ekmekçi GF, Yerli, S (2008) Ecotoxicological assessment of water pollution in Sariyar Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicol Environ Saf* 70:163–173.