

Tatlı Su Midyelerine (*Unio mancus*) İmidakloprit Uygulanmasının Solungaç ATPaz Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Miraç Uçkun¹ , Aysel Alkan Uçkun*² 

¹ Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, ADIYAMAN

*² Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği, ADIYAMAN

(Alınış / Received: 02.03.2021, Kabul / Accepted: 12.04.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 28.04.2021)

Anahtar Kelimeler

ATPaz,
İmidakloprit,
Tatlısu midyeleri,
Unio mancus

Öz: Dünya çapında yaygın olarak kullanılan sistemik bir neonikotinoid insektisit olan imidaklopritin (IMI) tatlı su kütlelerine karışması, ekosistem sağlığı açısından endişe uyandırmaktadır. IMI'nin hedef dışı organizmalar olan tatlı su midyeleri üzerindeki ölümcül olmayan etkileri hakkında bilgi eksikliği vardır. Bu çalışmada, 96 saat boyunca dört IMI konsantrasyonuna (1.25, 12.5, 125 ve 1250 µg AI L⁻¹) maruz kalan tatlı su midyelerinde (*Unio mancus*) bu böcek ilacının potansiyel toksik etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bunun için midyelerin toksik kirleticilerle ilk etkileşim organı olan solungaçlarında Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg²⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve toplam ATPaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. IMI maruziyetinin, bütün ATPaz türlerini kontrole göre önemli oranda inhibisyona uğrattığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, IMI'nin ATPaz'ların aktivitesini bozarak hücrelerde iyon homeostazını ve enerji sentezini yıkıcı bir etkiye sahip olduğu, bunun da midyelerin genel metabolizmasını etkileyebileceği söylenebilir. Sonuçlarımız, tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midyelerin IMI'ye maruz kalma nedeniyle zarar görebilecekleri olası sonuçlar konusunda bir erken uyarı verme niteliğindedir.

Effect of Imidacloprid Application to Freshwater Mussels (*Unio mancus*) on Gill ATPase Activities

Keywords

ATPase,
Imidacloprid
Freshwater mussels,
Unio mancus

Abstract: The mixing of imidacloprid (IMI), a systemic neonicotinoid insecticide widely used worldwide, into freshwater bodies raises concerns for ecosystem health. There is a lack of information about the non-lethal effects of IMI on freshwater mussels that are non-target organisms. In this study, it was aimed to determine the potential toxic effects of this insecticide on freshwater mussels (*Unio mancus*) exposed to four IMI concentrations (1.25, 12.5, 125 and 1250 µg AI L⁻¹) for 96 hours. For this purpose, Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and total ATPase activities were evaluated in the gills of mussels, which are the first organ of interaction with toxic pollutants. It has been observed that IMI exposure significantly inhibited all ATPase types compared to control. As a result, it can be said that IMI has a destructive effect on ion homeostasis and energy synthesis in cells by disrupting the activity of ATPases, which may affect the general metabolism of mussels. Our results provide an early warning of possible consequences that mussels living in freshwater ecosystems could be harmed by exposure to IMI.

*İlgili Yazar: ayseluckun@gmail.com

1. Giriş

Pestisitler, önemli ekolojik etkileri olan çok çeşitli organik mikro kirleticiler arasında yer almaktadır. Pestisitler, çiftlik alanlarından, şehir altı çimlerinden veya yol kenarındaki bentlerden gelen yağmur suyu akışıyla en yakın dere akıntularına ve nehirlere taşınır. Bazen haşere kontrol faaliyetinin bir parçası olarak su yollarına bile püskürtülürler. Yaygın olarak kullanılan pestisitler çevreyi kontamine ettiklerinde, orada yaşayan canlı organizmaları tehdit edecek boyutta birikebilirler [1]. Neonikotinoid grubu insektisit olan imidakloprit (IMI) en yaygın kullanılan pestisitlerden biridir. IMI; pirinç hunileri, yaprak bitleri, tripler, beyaz sinekler, termitler, çim böcekleri, toprak böcekleri ve bazı böcekler dahil olmak üzere emici böceklerin kontrolü için toprak, tohum ve yaprak uygulamalarında kullanılır [2]. Aktif kimyasal, böceğin sinir sistemindeki uyarıların iletimini engelleyerek çalışır. Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) üzerindeki bağlanma, asetilkolin nörotransmitterinin birikmesine yol açarak böceğin felç olmasına ve ölümüne yol açar [3]. IMI suda oldukça çözünür olduğundan, kullanıldığı bölgeden sucul alanlara kolayca taşınır, bu nedenle burada yaşayan böcek ve kabuklu türlerini hedefleyerek hem ölümcül hem de ölümcül olmayan etkilere yol açar [4]. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) [5], suda yaşayan organizmaların korunması için yüzey suyundaki kabul edilebilir IMI konsantrasyonunu 1.05 mg L⁻¹ olarak belirlemiştir. Ancak, dünyanın farklı su ortamlarında yüzey suyundaki IMI konsantrasyonlarının kılavuz değerlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Miranda vd. (2011) [6], IMI'nin diğer neonikotinoidlere kıyasla hedef olmayan organizmalar üzerinde ciddi etkileri teşvik etme konusunda daha büyük bir risk sunduğunu bildirmiştir.

Midyeler, uzun ömürlü, kozmopolit, hareketsiz ve dipten beslenen canlılar olduğundan, sucul ortamlarda kimyasal kirletici maddelerin ve fiziksel değişikliklerin değerlendirilmesinde kullanılan yararlı biyogöstergelerdir [7, 8]. *Unio mancus* (Lamarck 1819), Atatürk Baraj Gölü'nde en yaygın bulunan tatlısu midye türüdür. Bu çalışmada, *U. mancus*, biyogösterge tür olarak seçilmiştir. Sucul organizmaların solungaçlarındaki doku hasarı, toksik maddelerle temas halinde olduklarında kolaylıkla gözlenir. Solungaç yüzeyi, tüm vücut yüzey alanının yarısından fazlasını temsil eder. Bu önemli organ çok işlevlidir ve sucul canlılarda ozmoregülasyon, azotlu atık atılımı, asit-baz dengesi ve solunumdan sorumludur [9]. Adenozin trifosfatlar (ATPazlar), zara bağlı enzimlerdir ve iyonları biyolojik zarlardan geçirirler, böylece hücre içindeki hareketlerini düzenlerler. ATPazlar, pestisitler ve ilaçlar gibi organik kirleticilerin toksisitesine duyarlı olduklarından, suda yaşayan organizmalardaki kirlilik stresinin değerlendirilmesinde yararlı biyokimyasal belirteçler olarak kullanılırlar [10]. Literatürde, tüm dünyada en yaygın pestisit olarak kullanılan IMI'nin *Unio mancus* tatlısu midyeleri üzerine olan etkisi hakkında çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, IMI'nin ticari formuna maruz kalan tatlı su midyelerinin solungaçlarında ATPaz aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hayvanlar ve deney koşulları

Haziran 2019'da tatlı su midyesi *U. mancus* örnekleri bir balıkçı tarafından Atatürk Baraj Gölü'nden toplanmıştır. Toplanan midyeler, baraj gölü suyu ile doldurulmuş plastik konteynerler ile uygun koşullar altında hızlı bir şekilde laboratuvara nakledilmiştir. Midyeler laboratuvara sevk edildikten sonra, 15 gün boyunca damacana/pet su ile doldurulmuş 50 L hacimli polikarbonat tank içerisinde bekletilerek laboratuvar koşullarına adaptasyonu sağlanmıştır. Tank bir hava pompası ile sürekli olarak havalandırılmış ve midyeler 20 ± 1 °C'de 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulmuştur. Midyeler adaptasyon sırasında, sucul omurgasızlar için özel üretilmiş ticari konsantre fitoplankton (Roti-Rich™) ile üç günde bir beslenmiştir.

2.2. Toksikite testleri

15 günlük adaptasyon sürecinden sonra IMI'nin *U. mancus* üzerindeki subletal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla 1 kontrol ve 4 maruziyet grubu olmak üzere toplam 5 uygulama grubu kurulmuştur. Tüm test grupları üç tekrarlı olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu amaçla, 35x25x15 cm boyutlarında 10 L kapasiteli polietilen propilen tanklara her doz için kendine ait 4 L pestisit (test) solüsyonu ve 4'er adet midye bırakılarak deney düzeneği kurulmuştur (Her bir tekrar grubu için 4 hayvan, her bir dozun 3 tekrarlı grubunda toplam 12 hayvan kullanılmıştır, n=12). Test solüsyonu içeren tankların akvaryum hava pompası yardımıyla sürekli havalandırılması sağlanmıştır. Deney esnasında midyeler beslenmemiştir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait su numunelerinin sıcaklığı, çözünmüş oksijen yüzdesi, pH ve iletkenliği, deneylerin başlangıcında (0. saat) bir multiparametre cihazı (YSI Pro Plus Çoklu Parametre) kullanılarak ölçülmüştür. Ortalama pH, iletkenlik, sıcaklık ve çözünmüş oksijen değerleri sırasıyla 7.62 (7.54 - 7.70), 27.30 µS cm⁻¹ (24.75 - 29.85), 17.1 °C (16.9 - 17.3) ve 7.10 mg L⁻¹ (7.00 - 7.20) olarak tespit edilmiştir. Toksikite testlerinde IMI'nin ticari formu (Confidor® SC 350, Bayer, Germany) kullanılmıştır. Bu ticari formun aktif bileşeni 350 g AI L⁻¹ (AI=active ingredient) olarak etiketlenmiştir. USEPA

(2017) [11], tatlı su omurgasızları için IMI'nin akut ve kronik toksisite konsantrasyonlarını sırasıyla 0.385 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlemiştir. En düşük test konsantrasyonu, USEPA tarafından belirlenen bu değerlere göre seçilmiş ve diğer konsantrasyonlar geometrik olarak 10 kat fazlası olarak alınmıştır. Böylece midyeler, 96 saatlik statik yenileme test sisteminde IMI'nin farklı nominal subletal konsantrasyonuna (1.25, 12.5, 125 ve 1250 $\mu\text{g Al L}^{-1}$) maruz bırakılmıştır.

2.3. İmidaklopritin test sularındaki gerçek konsantrasyonlarının belirlenmesi

Test sularındaki gerçek IMI konsantrasyonları, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda sıvı kromatografisi çift kütle spektrometresi (LC-MS/MS, Shimadzu Quadropole 8040) kullanılarak belirlenmiştir. IMI'nin sulu çözeltilerdeki konsantrasyonunun LC-MS/MS ile belirlenmesine dair literatürde çalışmalar mevcuttur [12, 13]. Çalışmamızda, IMI'nin tutulma süresinin yaklaşık 4 dakika olduğu tespit edilmiştir. IMI konsantrasyonlarının hesaplanması için kalibrasyon eğrisi 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ aralığında oluşturulmuştur. Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ), sırasıyla 0.23 $\mu\text{g L}^{-1}$ ve 0.70 $\mu\text{g L}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (r^2) 0.999 olarak bulunmuştur. IMI, 256.10 \rightarrow 208.80 kütle-yük oranları (m / z) ve 256.20 \rightarrow 175.20 m / z geçişlerinde tespit edilmiştir. Her numune üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. LC-MS/MS cihaz koşulları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. LC-MS/MS'in enstrümantal koşulları.

Cihaz modeli	Shimadzu LC-MS/MS-8040
Mobil faz A	1 mM amonyum asetat % 100 su içinde
Mobil faz B	% 100 metanol
Kolon	Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D. \times 50 mm L, 3 μm)
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Akış hızı	0.4 mL dak ⁻¹
Arayüz akımı	4.5 kV
Püskürtme gazı akış hızı	3 mL dak ⁻¹
Kurutma gazı akış hızı	15 mL dak ⁻¹
DL sıcaklığı	250 °C
HB sıcaklığı	400 °C

2.4. ATPaz aktivitelerinin belirlenmesi

Maruz kalma süresinin sonunda solungaç dokuları buz üzerinde disekte edildi ve enzim aktivitesinin belirleneceği zamana kadar -80°C'de derin dondurucuya (New Brunswick -86°C Ultra-low Temperature) plastik fermuarlı torbalarda saklandı. Solungaç dokuları tartılmış ve bir teflon uçlu homojenizatör (Heidolph RZR 2021) kullanılarak 1: 4 (w / v) oranında 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) içinde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 16.000 x g'de 4 °C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich 460 R). Elde edilen süpernatantlar, ATPaz aktiviteleri ve toplam protein konsantrasyonu ölçümleri için ependorf tüplerine aktarılmıştır. Tüm okumalar, bir mikropilaka okuyucu spektrofotometrede (Thermo, Varioscan Flash 2000) üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Toplam protein konsantrasyonları, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Bradford (1976) [14] yöntemi ile ölçülmüştür. ATPaz aktiviteleri ise Atlı ve Canlı (2011) [15] tarafından geliştirilmiş metodun mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanmasıyla belirlenmiştir. Mg^{2+} -ATPaz ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitelerini ölçmek için 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 40 mM Tris-HCl ve 1 mM quabain içeren inkübasyon ortamı (pH 7.7) kullanılmıştır. Ca^{2+} -ATPaz aktivitesi için 1 mM CaCl_2 , 4 mM MgCl_2 , 40 mM Tris-HCl ve 1 mM EGTA içeren inkübasyon ortamı (pH 7.7) kullanılmıştır. Enzim aktivitelerini ölçmek için, 5 μL süpernatant ve 60 μL inkübasyon çözeltisi mikropilaka kuyucuklarına pipetlenmiş ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ön inkübasyondan sonra ortama 10 μL 3 mM Na_2ATP eklenerek reaksiyon başlatılmış ve tekrardan 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu inkübasyondan sonra da karışıma 35 μL buz soğukluğunda saf su ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Ek olarak, quabain içermeyen ortam, süpernatant ve saf su karışımı, kör olarak kullanılmak üzere mikropilaka kuyucuklarına pipetlenmiştir. İnkübasyon sırasında ortama substrat olarak eklenen 3 mM ATP'den salınan inorganik fosfat (Pi) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [16]. Reaksiyonun sonunda, %5 polioksietilen 10 lauril eter ve %2 amonyum molibdat içeren 190 μL ana reaktif, mikropilaka kuyularına pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra, absorbans 390 nm'de okunmuştur. Pi standardı olarak KH_2PO_4 (100-1000 μM) kullanılmıştır. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi, toplam ATPaz aktivitesi (ouabain içeren ortam) ve Mg^{2+} -ATPaz aktivitesi (ouabain içermeyen ortam) arasındaki fark kullanılarak hesaplanmıştır. Ca^{2+} -ATPaz ve Mg^{2+} -ATPaz aktiviteleri, sırasıyla CaCl_2 ve MgCl_2 varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki fark kullanılarak hesaplanmıştır. Enzim aktiviteleri $\mu\text{mol Pi/mg protein/saat}$ olarak ifade edilmiştir.

2.5. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22 (ABD) yazılım paketi ile gerçekleştirilmiştir. Shapiro-Wilk ve Levene testleri kullanılarak, tüm değişkenler sırasıyla normallik ve homojenlik açısından analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farkı test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Tüm veriler, 12 numune üzerinden hesaplanan ortalama değer \pm standart hata olarak sunulmuştur. Tüm analizler için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. İmidaklopritin test sularındaki gerçek konsantrasyonu

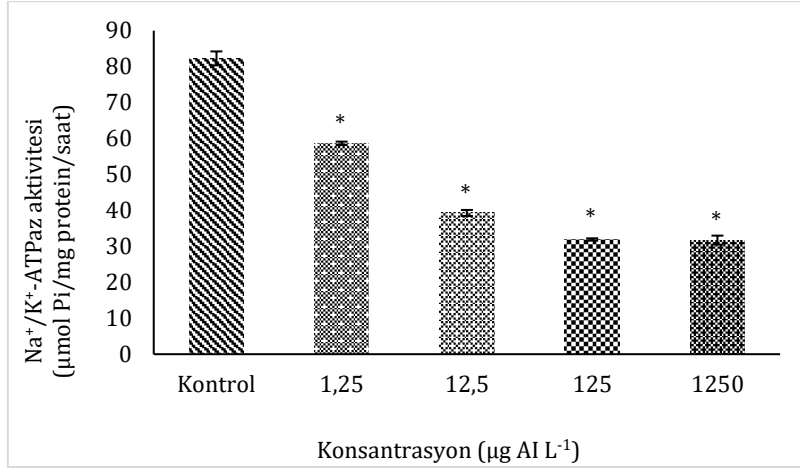
LCMSMS analizinden elde edilen test sularındaki gerçek IMI konsantrasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir. 24 saat sonraki gerçek konsantrasyonların, nominal konsantrasyonlardan yaklaşık %10 daha düşük olduğu belirlenmiştir. Nominal ve gerçek konsantrasyonlar arasındaki bu farklılıklar, yüzey aktif maddeler, çözücüler ve pestisitlerin ticari formülasyonlarında kullanılan koruyucular gibi diğer bileşiklerden kaynaklanıyor olabilir [17].

Tablo 2. İmidaklopridin test sularındaki gerçek konsantrasyonları (Ortalama \pm standart hata (N=3)).

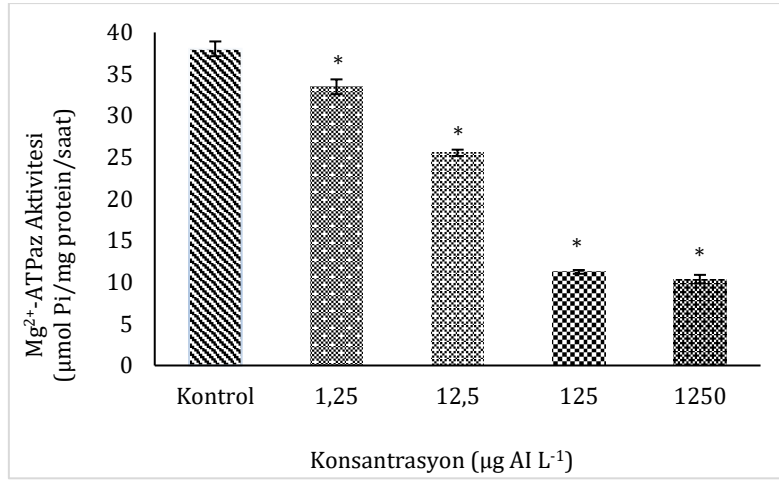
Nominal konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gerçek konsantrasyonlar ($\mu\text{g L}^{-1} \pm$ Standart hata)			
	Uygulamadan önce	Geri kazanım (%)	24 saat uygulamadan sonra	Geri kazanım (%)
Kontrol	0	-	0	-
1.25	1.27 \pm 0.04	101.6%	1.04 \pm 0.07	83.2%
12.5	12.46 \pm 0.41	99.7%	11.53 \pm 0.16	92.2%
125	130.55 \pm 1.59	104.4%	114.15 \pm 3.01	91.3%
1250	1251.79 \pm 10.98	100.1%	1191.29 \pm 26.84	95.3%

3.2. ATPaz aktiviteleri

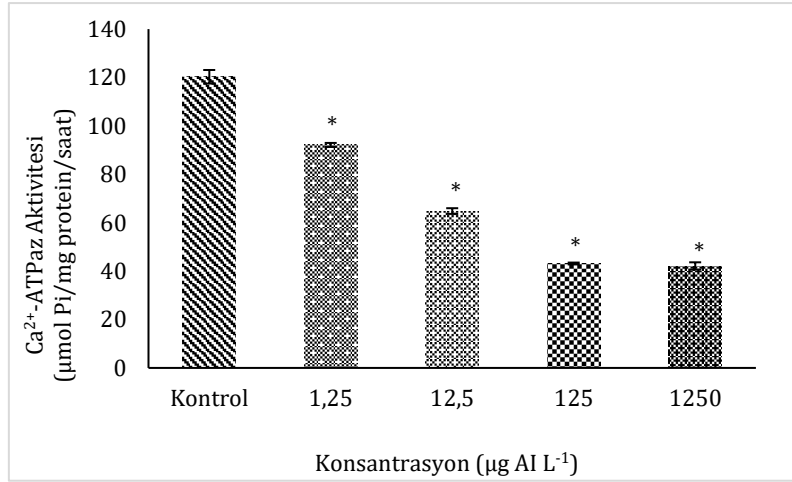
Na^+/K^+ -ATPaz, Mg^{2+} -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve toplam ATPaz aktivitelerine ait sonuçlar sırasıyla Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'de gösterilmiştir. Na^+/K^+ -ATPaz aktiviteleri kontrole göre doza bağımlı bir şekilde azalmıştır. 1.25, 12.5, 125 ve 1250 uygulama dozlarında kontrole göre sırasıyla yaklaşık olarak %29, %52, %61.2 ve %61.4 oranlarında inhibisyon gözlenmiştir ve bu farkların hepsi istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. Mg^{2+} -ATPaz aktiviteleri de uygulanan IMI konsantrasyonları arttıkça kontrole göre artan oranlarda (%12, %33, %70, %73) inhibisyona uğramıştır. Mg^{2+} -ATPaz aktivitelerindeki bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunmuştur. Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri de aynı şekilde uygulanan IMI dozuna bağlı olarak kontrole göre artan oranda ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. En yüksek inhibisyon, kontrole göre yaklaşık %65'lik bir oranla, en yüksek IMI uygulama dozu olan 1250 $\mu\text{g AI L}^{-1}$ konsantrasyonunda gözlenmiştir. 125, 12.5 ve 1.25 $\mu\text{g AI L}^{-1}$ dozlarında ise sırasıyla %56, %64 ve %65 oranlarında kontrole göre anlamlı düşüşler olmuştur ($p < 0.05$). Toplam ATPaz aktiviteleri de diğer ATPaz aktivitelerinde olduğu gibi IMI dozu artışına bağlı olarak kontrole göre artan oranda anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. Buradaki inhibisyon oranları da sırasıyla %24, %40, %60 ve %63'dür ($p < 0.05$).



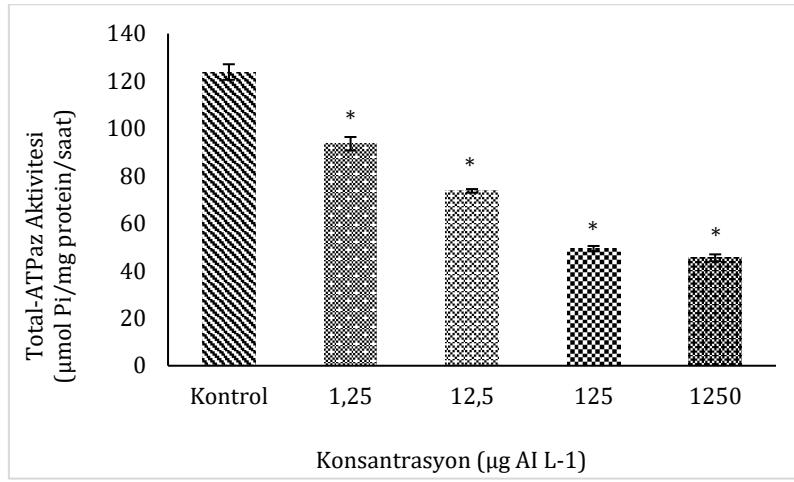
Şekil 1. $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaz}$ aktivite düzeylerinde değişiklikler. *: $P < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemi göstermektedir.



Şekil 2. $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPaz}$ aktivite düzeylerinde değişiklikler. *: $P < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemi göstermektedir.



Şekil 3. $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPaz}$ aktivite düzeylerinde değişiklikler. *: $P < 0.05$, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemi göstermektedir.



Şekil 4. Toplam-ATPaz aktivite düzeylerinde değişiklikler. *: P <0.05, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel önemi göstermektedir.

4. Tartışma ve Sonuç

ATPaz sistemi ksenobiyotikler için bir hedef olarak tanımlanmıştır. Toksik bileşikler bu enzimleri inhibe ederek hücre zarlarının fosfolipid kısmına bağlanırlar, böylece zarın konfigürasyonunu değiştirebilirler [18]. Solungaç dokusu, organizmada solunum, iyon dengesi, asit-baz dengesi ve azotlu atıkların boşaltımı işlevini gören çok fonksiyonlu bir organdır [19]. Sucul canlılarda çeşitli toksik maddeler, ilk temas organı olan solungaç yüzeyi tarafından emilerek vücuda girer ve daha sonra yayılır. Bu kirleticilerin solungaç membranı ile etkileşimi, membran geçirgenliğini etkileyerek membranın ozmotik ve iyonik dengesini bozabilir [20]. Sucul canlılarda kirleticilerle doğrudan etkileşimde bulunan enzim, Na⁺/K⁺-ATPaz'dır [21]. Na⁺/K⁺-ATPaz, hücrenin iyonik homeostazının korunmasında sorumlu, anahtar bir transmembran enzimidir. Tatlı su organizmalarında, Na⁺/K⁺-ATPaz enzimi, solungaç epitel hücrelerinde bulunur ve aktif olarak iyon düzenlenmesinde rol oynar [22]. Bu enzimin inhibisyonu, aktif Na⁺ ve K⁺ iyonlarının taşınmasının bloke edildiğini gösterir. Deltametrinin letal ve subletal etkisine bırakılan *Cirrhinus mrigala*'da solungaç, karaciğer ve kas dokusunda Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [20]. Sırasıyla sipermetrin ve glifosat uygulanan sazanlarda (*Cyprinus carpio*) solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin önemli derecede inhibe olduğu tespit edilmiştir [23, 24]. Na⁺/K⁺-ATPaz inhibisyonu, hücrelerin ve organların fizyolojik gereksinimlerini sürdürmek için gerekli hayati iyonların ve besinlerin taşınmasının azaldığı anlamına gelebilir [25]. Çalışmamızda uygulanan IMI konsantrasyonu arttıkça Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitelerinin inhibe olması, su ortamındaki IMI ile ilk temas eden dokunun solungaç olması nedeniyle IMI'nin solungaç membranı geçirgenliğini ve dolayısıyla iyon dengesini bozması anlamına gelebilir. Mg²⁺-ATPaz, mitokondride oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezinde rol oynar [26]. Mg²⁺-ATPaz ayrıca hücresel membranın bütünlüğünden ve hücre içi branşiyal geçirgenliği stabilize etmek için gerekli Mg iyonlarının epitel geçişini düzenlemekten sorumludur [27]. Çalışmamızda Mg²⁺-ATPaz inhibisyonu, IMI'nin mitokondriyal zarlara verdiği hasardan dolayı oksidatif enerjinin fosfata bağlı enerjiye dönüşmesinin başarısızlığı olarak yorumlanabilir [25, 28]. Sipermetrine maruz kalan *Clarias batrachus* türlerinde böbrek Mg²⁺-ATPaz aktivitesindeki anlamlı olmayan indüksiyonların, pestisit streisiyle başa çıkmak için artan ATP üretimine bağlı olabileceği öne sürülmüştür [29]. Ca²⁺-ATPaz, sarkoplazmik retikulum tübüllerinde bulunan ve hücrede Ca²⁺ seviyelerini korumak için Ca²⁺ iyonlarını sitozolden ve lümenenden uzaklaştırmaya yarayan bir enzimidir [30]. Deltametrin uygulanan *Cirrhinus mrigala*'nın solungaçlarında Ca²⁺-ATPaz aktivitesinin ölümcül konsantrasyonlara ulaştıkça kademeli olarak azaldığı gözlenmiştir [20]. Çalışmamızda, Ca²⁺-ATPaz inhibisyonuna, IMI maruziyeti sonucunda oluşan oksidatif fosforilasyon ve lipid peroksidasyon ürünleri neden olabilir. Ca²⁺-ATPaz inhibisyonunun bir sonucu olarak, hücre içi oksijen radikalleri ve sitozolik Ca²⁺ birikimi meydana gelmiş olabilir [31].

ATPaz aktivitesindeki azalma, sudaki kirleticilerin neden olduğu enzim kompleksindeki bölümlenmeden kaynaklanan allosterik bir değişiklikten kaynaklanıyor olabilir [10]. Buradan yola çıkarak, çalışmamızdaki toplam ATPaz aktivitesindeki azalmayı, IMI'nin -SH gruplarına olan yüksek afinitesine bağlayabiliriz. Metil parationun beyaz bacaklı karideslerde toplam ATPaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir [32]. Bizim çalışmamıza benzer olarak, bir fungusit olan penkonazol *U. mancus*'a 96 saatlik akut olarak uygulandığında, solungaçlarda Mg²⁺-ATPaz hariç, diğer ATPazların (Na⁺/K⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve toplam ATPaz) aktivitelerinin uygulanan doz artışına bağlı olarak inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir [33]. Bu inhibisyonların, tatlı su midyelerinin canlılığını sürdürmek için hipometabolik durumda enerji ekonomisine girmenin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür. Azoksistrobin ve penkonazolün ayrı ayrı uygulandığı kerevitlerin solungaç ve kas dokusunda Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg²⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve toplam ATPaz aktivitelerinin kontrole göre önemli derecede inhibisyona uğradığı ve bu inhibisyonların

nedeninin, bu pestisitlerin hücrel enerji üretim mekanizmasını bozarak veya enzimlerle doğrudan etkileşime girerek gaz değişimini ve iyonik regülasyonu bozması olabileceği ileri sürülmüştür [34, 35]. Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg²⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve toplam ATPaz aktivitelerinin doz artışından dolayı inhibisyonu, Marigoudar [36] tarafından bildirildiği üzere, organların hücrel iyonik regülasyonunun yok edildiğini gösterir. Çalışmamızdaki ATPaz sonuçlarından, IMI'nin enerji sentezi ve kullanım süreçlerinde yer alan bu enzimler üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olduğu, dolayısıyla maruz kalan midyelerin genel metabolizmasının da etkilendiği tespit edildi. IMI'nin toksisitesi ile ilgili yapılacak ileriki çalışmalarda, biyokimyasal parametrelerin etkinliği için bu çalışmanın önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak, IMI pestisitinin kullanıldığı tarım alanlarına yakın sucul alanlarda yaşayan midyelerin tehlike altında olduğu söylenebilir.

Kaynakça

- [1] Srivastava, A., Jangid, N.K., Srivastava, M., Rawat, V. 2018. Chapter 1. Pesticides as Water Pollutants. Copyright © 2019, IGI Global. Copying or distributing in print or electronic forms without written permission of IGI Global is prohibited. DOI: 10.4018/978-1-5225-6111-8.ch001
- [2] Nauen, R., Hungenberg, H., Tollo, B., Tietjen, K., Elbert, A. 1998. Antifeedant effect, biological efficacy and high affinity binding of imidacloprid to acetylcholine receptors in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. Pesticide Management Science, 53, 133-140.
- [3] Okazawa, A., Akamatsu, M., Ohoka, A., Nishiwaki, H., Cho, W.J., Nakagawa, N., Ueno, T. 1998. Prediction of the binding mode of imidacloprid and related compounds to house-fly head acetylcholine receptors using three-dimensional QSAR analysis. Pesticide Science, 54, 134-144.
- [4] Butcherine, P., Benkendorff, K., Kelaher, B., Barkla, B.J. 2019. The risk of neonicotinoid exposure to shrimp aquaculture. Chemosphere, 217, 329-348.
- [5] USEPA, 2014. OPP Pesticide Toxicity Database. http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/aquatic_life_benchmark.htm. January 25, 2017.
- [6] Miranda, G.R.B., Raetano, C.G., Silva, E., Daam, M., Cerejeira, M.J. 2011. Environmental fate of neonicotinoids and classification of their potential risks to hypogean, epygean, and surface water ecosystems in Brazil. Human Ecological Risk Assessment, 17, 981-995.
- [7] Benedetti, M., Gorbi, S., Fattorini, D., D'Errico, G., Piva, F., Pacitti, D., Regoli, F. 2014. Environmental hazards from natural hydrocarbons seepage: integrated classification of risk from sediment chemistry, bioavailability and biomarkers responses in sentinel species. Environmental Pollution, 185, 116-126.
- [8] Scudiero, R., Creti, P., Trinchella, F., Esposito, M.G. 2014. Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): levels and seasonal trends. Comptes Rendus Biologies, 337(7), 451-458.
- [9] Kumar, A., Prasad, M.R., Srisvatav, K., Tripathi, S., Srivastav, A.K. 2010. Branchial histopathological study of *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified neem extract, azadirachtin. World Journal of Zoology, 5, 239-243.
- [10] Pham, B., Miranda, A., Allinson, G., & Nugegoda, D. 2017. Evaluating the non-lethal effects of organophosphorous and carbamate insecticides on the yabby (*Cherax destructor*) using cholinesterase (AChE, BChE), Glutathione S-Transferase and ATPase as biomarkers. Ecotoxicology and Environmental Safety, 143, 283-288.
- [11] USEPA, Aquatic Life Benchmarks and Ecological Risk Assessments for Registered Pesticides; OPP Aquatic Life Benchmarks, 2017. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk#benchmarks> [accessed 10 April 2019].
- [12] Abdallah, O., Ghani, S.A., Hrouzkova, S. 2017. Development of validated LC-MS/MS method for imidacloprid and acetamiprid in parsley and rocket and evaluation of their dissipation Dynamics. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 40, 392-399.
- [13] Pietrzak, D., Wator, K., Pekała, D., Wojcik, J., Chochorek, A., Kmiecik E., Kania, J. 2019. LC-MS/MS method validation for determination of selected neonicotinoids in groundwater for the purpose of a column experiment. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 54, 424-431.
- [14] Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- [15] Atli, G., Canli, M. 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology, 20(8), 1861-1869.
- [16] Atkinson, A., Gatenby, A. D., Lowe, A. G. 1973. The determination of inorganic orthophosphate in biological systems. Biochimica et Biophysica Acta, 320, 195-204.
- [17] Korkmaz, V., Güngördü, A., Ozmen, M. 2018. Comparative evaluation of toxicological effects and recovery patterns in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to phosalone-based and cypermethrin-based pesticides. Ecotoxicology and Environmental Safety, 160, 265-272.

- [18] Chhaya, J., Thaker, J., Mittal, R., Nuzhat, S., Mansuri, A.P., Kundu, R. 1997. Influence of textile dyeing and printing industry effluent on ATPases in liver, brain, and muscle of mudskipper, *Periophthalmus dipses*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 58, 793-800.
- [19] Liu, D., Chen, H.G.Z., Wang, Y. 2014. Effect of cadmium on the extracellular Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the gill and small intestine of Goldfish *Carassius auratus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 3(7), 672-678.
- [20] David, M., Sangeetha, J., Harish, E.R., Shrinivas, J., Naik, V.R. 2014. Deltamethrin induced alteration in Na⁺-K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ associated ATPases activity in the freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. International Journal of Pure and Applied Zoology, 2(2), 175-181.
- [21] Watson, T.A., Beamish, F.W.H. 1980. Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 66, 77-82.
- [22] Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Wendelaar Bonga, S. 2000. Na⁺/K⁺-ATPase immuno-reactivity in branchial chloride of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. Journal of Experimental Biology, 20, 370-387.
- [23] Balaji, G., Nachiyappan, M., Venugopal, R. 2015. Sub-Lethal Effect of Cypermethrin on Ca⁺, Mg⁺ and Na⁺/K⁺-ATPase Activity in Fresh Water Teleost, *Cyprinus carpio*. World Journal of Zoology, 10(3), 168-174.
- [24] Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., Li, X. 2019. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. Environmental Pollution, 252, 1288-1300.
- [25] Begum, G. 2011. Organ-specific ATPase and phosphorylase enzyme activities in a food fish exposed to a carbamate insecticide and recovery response. Fish Physiology and Biochemistry, 37, 61-69.
- [26] Begum, G., Vijayaraghavan, S. 1994. In vivo inhibition of branchial Na⁺-K⁺, Mg²⁺ ATPase of *Clarias batrachus* exposed to sub-lethal concentration of dimethoate. Pollution Research, 13, 213-216.
- [27] Parvez, S., Sayeed, I., Raisuddin, S. 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65, 2-66.
- [28] Shwetha, A.D., Hosetti, B.B. 2012. Effect of exposure to sublethal concentrations of zinc cyanide on tissue ATPase activity in the fresh water fish, *Cirrhinus mrigala* (HAM). Archives of Biological Sciences Belgrade, 64, 257-263.
- [29] Begum, G. 2009. Enzymes as biomarkers of cypermethrin toxicity: response of *Clarias batrachus* tissues ATPase and glycogen phosphorylase as a function of exposure and recovery at sublethal level. Toxicology Mechanisms and Methods, 19, 29-39.
- [30] Saxena, T.B., Zachariassen, K.E., Jorgensen, L. 2000. Effects of ethoxyquin on the blood composition of turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative Biochemistry and Physiology, 127, 1-9.
- [31] Balasundaram, K., Ramalingam, K., Selvarajan, V.R. 1995. Phosalone poisoning on the cation-linked ATPases of central nervous system of *Rana tigrina* (Daudin). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 111, 451-455.
- [32] Comoglio, L., Amin, O., Roque, A., Betancourt-Lozano, M., Anguas, D., & Haro, B. M. 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. Ecotoxicology and Environmental Safety, 62(1), 66-74.
- [33] Yoloğlu, E. 2019. Assessment of Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, and total ATPase activities in gills of freshwater mussels exposed to penconazole. Commagene Journal of Biology, 3, 88-92.
- [34] Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. 2020. Evaluation of the acute toxic effect of azoxystrobin on non-target crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) by using oxidative stress enzymes, ATPases and cholinesterase as biomarkers. Drug and Chemical Toxicology, DOI: 10.1080/01480545.2020.1774604
- [35] Uçkun, A.A., Öz, Ö.B. 2020. Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). Environmental Science and Pollution Research, 27, 35626-35637.
- [36] Marigoudar, S.R. 2012. Cypermethrin induced some pathophysiological and biochemical changes in the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). PhD Thesis, Karnatak University, Dharwad, India.