



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

İki Disazo Boyanın *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) Üzerindeki Mortalite Etkisi ve Akut Toksisitesinin İncelenmesi

 Fikret SARI^{a,*}

^a Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tavas Meslek Yüksekokulu, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: fsari@pau.edu.tr

DOI: 10.29130/dubited.1031641

Öz

Bu çalışma iki 5-(3'-amino-4'-arilazo-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asit boyasının (Boya 1 ve Boya 2) ekotoksikolojik çalışmalarda model organizma olarak bilinen *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) üzerindeki mortalite etkisinin ve akut toksisitesinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Detaylı mortalite değerlendirmelerinden sonra Boya 2'nin organizmalar üzerinde Boya 1'e kıyasla daha fazla mortalite etkisine sebep olma potansiyeline sahip olduğu ve sucul ekosistemlerde yüksek konsantrasyonlarda uzun süreli bulunmasının bu ekosistemler için kayda değer bir tehdit oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Gerçekleştirilen toksite sınıflandırmasında Boya 1'in, 24 ve 48 saat maruziyetlerde pratikte toksik değilken 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede toksik olduğu, Boya 2'nin ise 24 saat maruziyette pratikte toksik değilken 48, 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede toksik olduğu bulunmuştur. Mortalite etkisi ve toksitedeki bu farklılıkların boya yapısında bulunan süstituentlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Bu çalışma, yapısında metoksi ve metil grubu içeren azo boyaların (sırasıyla Boya 1 ve Boya 2) *C. riparius* üzerindeki mortalite etkisi ve akut toksisitesi ile ilgili önemli bilgiler sunmaktadır. Ancak daha kapsamlı ekotoksikolojik değerlendirmeler yapabilmek için bu ve benzeri azo boyaların ve bozunma ürünlerinin farklı organizmalar üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının moleküler düzeyde incelendiği ve sucul ortamlardaki gerçek konsantrasyonlarının belirlendiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu bir gerçektir.

Anahtar Kelimeler: *Chironomus riparius*, Mortalite, Akut toksisite, Azo boya, Sucul ortam, Su kirliliği

Evaluation of Mortality Effect and Acute Toxicity of Two Disazo Dyes on *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae)

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate mortality effect and acute toxicity of two 5-(3'-amino-4'-arylazo-1H-pyrazole-5'-ylazo) barbituric acid dyes (Dye 1 and Dye 2) on *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) known as model organism in ecotoxicological studies. After detailed mortality assessments, it was concluded that Dye 2 had the potential to cause a greater mortality effect on organisms compared to Dye 1 and that its long-term existence in aquatic ecosystems at high concentrations could pose a significant threat to these ecosystems. In the performed toxicity classification, it was found that Dye 1 was practically non-toxic at 24- and 48-hour exposures but slightly toxic at 72- and 96-hour exposures, while Dye 2 was practically non-toxic at 24-hour exposure but slightly toxic at 48-, 72- and 96-hour exposures. It can be suggested that these differences in mortality effect and toxicity may be due to the different substituents in the dye structure. The present study provides valuable information regarding mortality effect and acute toxicity of azo dyes containing methoxy and methyl groups in

their structure (Dye 1 and Dye 2, respectively) on *C. riparius*. However, to be able to make more comprehensive ecotoxicological evaluations, it is a fact that there is a necessity for further studies in which the effects and action mechanisms of these and suchlike azo dyes and their degradation products on different organisms will be investigated at the molecular level and their actual concentrations in aquatic environments will be determined.

Keywords: *Chironomus riparius, Mortality, Acute toxicity, Azo dye, Aquatic environment, Water pollution*

I. GİRİŞ

Çevredeki zararlı ve toksik kirleticilerin küresel ölçekte endişelere yol açması nedeniyle çevresel konular ve çevre kirliliği gibi sorunlar giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Günden güne daha da büyüyen bir problem haline gelen çevre kirliliğinin çeşitlerinden biri de su kirliliğidir. Sucul ortamlar, çeşitli antropojenik aktivitelerden kaynaklanan kirleticilerin ve endüstriyel atıkların en önemli alıcısı durumundadır [1]. Bu antropojenik kirleticiler (veya toksik maddeler) suda yaşayan birçok organizma için ciddi riskler oluşturan, su kaynaklarındaki su kalitesine zarar veren ve sonuçta çevre kirliliğine neden olan metaller, pestisitler ve diğer organik maddeleri içermektedir [1], [2].

Renklendirme amacıyla çok çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılan boyalar ve boyar maddeler çevre kirliliğinin başlıca kaynağı olarak kabul edilmektedir [3]. Kimyasal yapılarına göre gruplandırılan boyalar arasında, en az bir azo ($-N=N-$) grubunun varlığı ile karakterize edilen ve organik renklendiriciler olarak oldukça büyük önem taşıyan azo boyalar, çok amaçlı bir boya sınıfı olarak kabul edilmektedir [4], [5]. Daha yüksek renk verimi ve daha iyi haslık özellikleri elde etmek için nitro, metoksi ve metil grupları gibi farklı süstitüentler içeren çeşitli azo boyalar yaygın olarak sentezlenmekte [6]–[10] ve çeşitli alanlardaki oldukça büyük uygulama potansiyelleri nedeniyle yıllardır kullanılmaktadır [11], [12].

Tekstil, boya ve tabakhane endüstrileri büyük miktarlarda atık su tahliye eder ve bu nedenle başlıca toksik deşarj kaynaklarıdır [13], [14]. Boyama işlemleri sırasında, boyaların %10-15 kadarı çevreye salınır ve suda çözünebilen azo boyalar çok düşük konsantrasyonlarda bile atık alıcı suları yüksek oranda renklendirerek görsel bir kirliliğe neden olabilir [15]. Bu görsel kirliliğin dışında, bazı azo boyalar ve bunların biyotransformasyon ürünleri kanserojen, mutajenik ve/veya toksiktir [16]–[18]. Boyaların laboratuvar deneylerinde kullanılan indikatör organizma veya direkt olarak ekosistem üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların sayısı nispeten az olduğu için boyaların ekosistemdeki akıbeti ve potansiyel etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu bağlamda azo boyalar temelli sucul toksikolojik incelemeler ve risk değerlendirme çalışmaları, çevre kirliliği konusunda mevcut projelerin geliştirilmesine ve etkili yönetsel kararların alınmasına katkıda bulunabilme potansiyeli nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

Akut toksisite, bir kimyasala kısa süreli maruziyetin hemen ardından ortaya çıkan toksisite olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre, akut toksisiteyi oluşturan akut maruziyet ve akut etki olmak üzere iki temel bileşen vardır [16]. Akut etkiler genellikle morbidite veya mortaliteden oluşmaktadır. Bu etkilerin nicel olarak ölçülme şekillerinden birisi de bir popülasyonun bir maddeye belirli bir süre maruz kalmasından sonra o popülasyon üyelerinin %50'sinin öldüğü madde konsantrasyonudur (LC_{50}) [16], [19]. Kimyasalların çevre üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgilenen ekotoksikolojide akut toksisite genellikle LC_{50} ile tanımlanmakta ve hesaplanan LC_{50} değerine göre kimyasalların akut toksisite bakımından sınıflandırması yapılabilmektedir [19]. Fakat LC_{50} değeri, ortamdaki belirli bir kimyasalın seviyesinin kabul edilebilir olup olmadığını göstermekten ziyade, göreceli akut toksisitenin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır [6]. Kimyasalların sucul organizmalar üzerindeki akut toksisitesine dayalı olarak sınıflandırılmasında kullanılan 5 adet toksisite kategorisi bulunmaktadır. Bu kategorilere göre sınıflandırma yapılırken 100 mg/L'den yüksek LC_{50} değerleri pratikte toksik değil, 10 mg/L ile 100 mg/L arasındaki LC_{50} değerleri hafif derecede toksik, 1 mg/L ile 10 mg/L arasındaki LC_{50} değerleri orta derecede toksik, 0,1 mg/L ile 1 mg/L arasındaki LC_{50} değerleri yüksek derecede toksik ve son olarak 0,1 mg/L'den daha düşük LC_{50} değerleri son derecede toksik olarak değerlendirilmektedir [19].

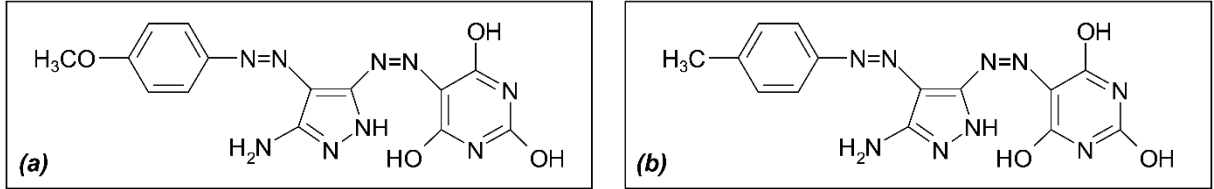
Birçok kimyasalın toksisitesinin değerlendirilebilmesi amacıyla laboratuvar ortamında gerçekleştirilen ekotoksikolojik incelemelerde çeşitli omurgasız canlı grupları test organizması olarak yıllardır kullanılmaktadır. Bu omurgasız canlı grupları arasında Chironomidae familyası (Insecta: Diptera) özellikle son yıllarda ön plana çıkmıştır. Chironomidler, sucul besin zincirinde önemli bir konuma sahiptir ve birçok canlı için önemli bir besin kaynağı olarak bilinir. Bu durum, chironomidlerin çevresel ve ekonomik önemini artırmaktadır. Kısa bir hayat döngüsüne sahip, oldukça yaygın bir yayılış gösteren ve laboratuvar koşullarında kolaylıkla yetiştirilebilen bir chironomid türü olan *Chironomus riparius*'un larva safhası çevredeki farklı stres faktörlerine ve birçok kirleticiye duyarlıdır [20]. Tüm bu özelliklerinin bir sonucu olarak *C. riparius*, toksisite çalışmaları için çok uygun model bir organizma olarak kabul görmektedir [21]–[24].

Bu çalışmada, seçilen iki disazo boyanın *C. riparius* üzerindeki mortalite etkisinin incelenmesi ve akut toksisitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle bu boyalara yönelik toksikolojik bilgiler elde ederek, onların doğadaki potansiyel risk durumları hakkında detaylı değerlendirmeler yapılmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. TEST EDİLEN AZO BOYALAR

Bu çalışmada gerçekleştirilen maruziyet testlerinde, daha önceden sentezlenmiş ve sentezi rapor edilmiş 5-(3'-amino-4'-arilazo-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asit boyaları olan iki disazo boya [7] kullanılmıştır. Kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilen bu disazo boyalardan biri metoksi grubu içeren 5-(3'-amino-4'-(4''-metoksifenilazo)-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asit (bundan sonra Boya 1 olarak adlandırılacaktır) iken, diğeri metil grubu içeren 5-(3'-amino-4'-(4''-metilfenilazo)-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asittir (bundan sonra Boya 2 olarak adlandırılacaktır).



Şekil 1. Test edilen disazo boyaların kimyasal yapısı. (a) 5-(3'-amino-4'-(4''-metoksifenilazo)-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asit (Boya 1). (b) 5-(3'-amino-4'-(4''-metilfenilazo)-1H-pirazol-5'-ilazo) barbitürik asit (Boya 2).

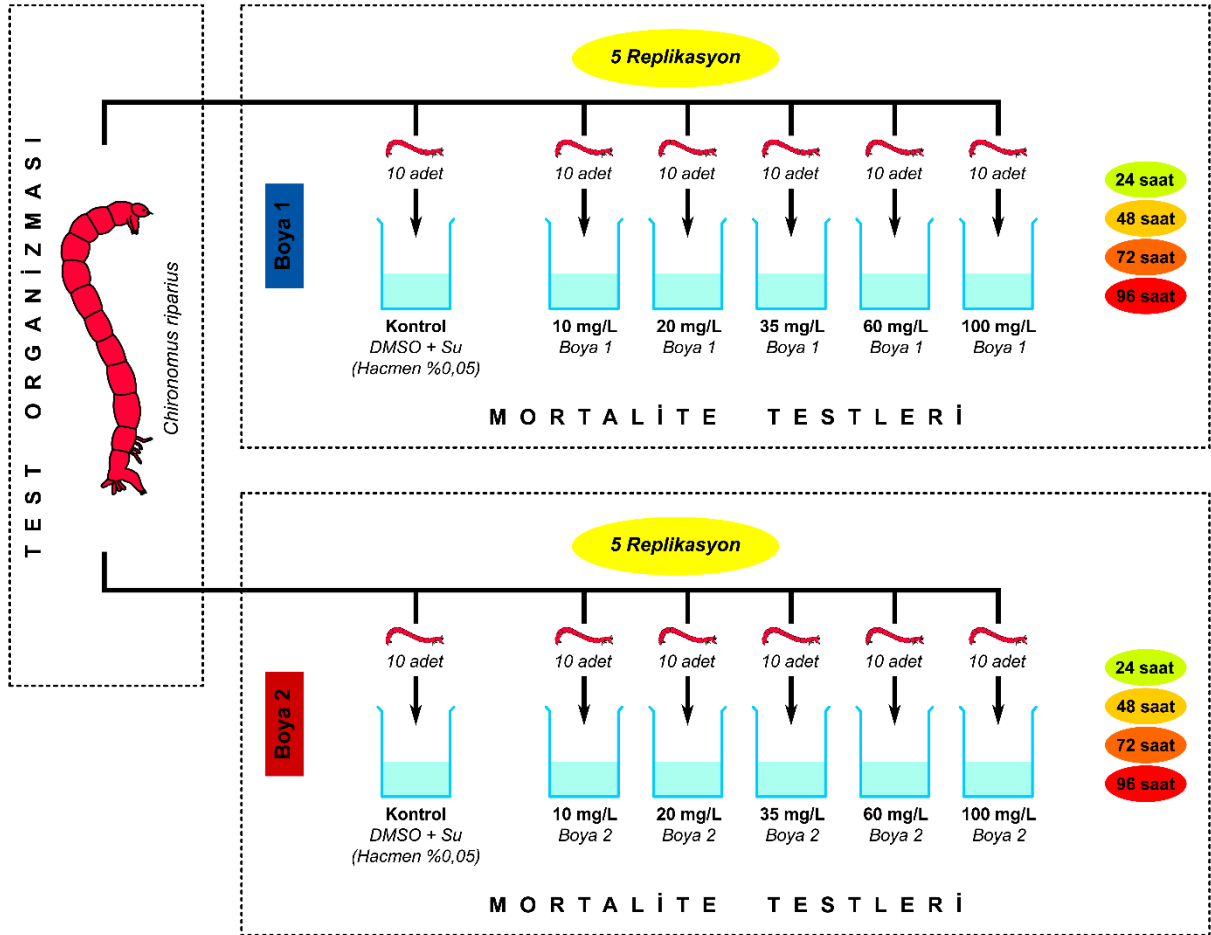
Maruziyet testleri için seçilen azo boyaların stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck, Almanya) yardımıyla 1000 mg/L konsantrasyonda hazırlanmış ve 4 °C'de amber şişelerde ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu stok solüsyonlar, maruziyet testleri için belirlenen boya konsantrasyonlarına ambalajlanmış içme suyu ile uygun şekilde seyreltilerek test solüsyonlarının son konsantrasyonları hazırlanmıştır. Ancak DMSO seviyesi hiçbir test solüsyonunda hacmen %0,05'ten daha yüksek olmamıştır. Bu sayede maruziyet testleri sırasında bu çözücünden kaynaklanan herhangi bir toksisitenin önüne geçilebilmiştir.

B. TEST ORGANİZMASI VE MARUZİYET TESTLERİ

Bu çalışmada test organizması olarak kullanılmak üzere *C. riparius* seçilmiştir. Bu omurgasız türünün nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan ve/veya korunan bir tür olmaması ve ayrıca deney hayvanı kategorisinde bulunmaması nedeniyle çalışmadaki deneylerde kullanılması için etik kurul izni alınmasına gerek kalmamıştır. Test organizmaları, başka bir çalışma için [24] Pamukkale Üniversitesi'nde oluşturulmuş olan *C. riparius* stok kültürlerinden alınmıştır. Stok kültürlerdeki

yumurta kitlelerinde bulunan larvalar yumurtadan çıktıktan yaklaşık 15 gün sonra dördüncü dönem (instar) larva haline gelmiş ve maruziyet testlerinde kullanılmıştır.

100 mL'lik cam beherlerde gerçekleştirilen mortalite testlerinde, her bir boya için 1 kontrol grubu ve 5 deney grubu oluşturulmuştur (Şekil 2). Kontrol grubu olarak ambalajlanmış içme suyu içinde hazırlanmış hacmen %0,05'lik DMSO kullanılmıştır. Maruziyet testlerinde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla her iki boya için de 1, 10 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda 24 saatlik aralık belirleme çalışması yapılmış [19], [24] ve bu ön çalışmanın sonuçlarına göre her iki boyanın 10, 20, 35, 60 ve 100 mg/L konsantrasyonları seçilerek deney grupları olarak kullanılmıştır. Oluşturulan bu gruplara göre solüsyonları (50 mL) hazırlanmış cam beherlerin her birine, aktif ve görünüş olarak sağlıklı olan 10 adet dördüncü dönem (instar) larva rastgele seçilerek konulmuştur. Her bir maruziyet testi 5 replikasyonlu olarak ve statik test koşullarında gerçekleştirilmiştir [19], [24]. Testlere başlarken, suyun buharlaşmasını engellemek için beherlerin ağzı parafilmle kapatılmış ve test süresi boyunca kapalı tutulmuştur. Maruziyet testleri 20 ± 1 °C'de ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde 96 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve bu süreçte larvalar beslenmemiş ve havalandırma sağlanmamıştır. Test süresi boyunca 24 saatlik aralıklarla her bir beherdeki canlı ve ölü larvalar sayılarak kayıt altına alınmıştır. Larvalar, üç kez hafif dokunmaya rağmen hareketsiz kalarak tepki vermediklerinde ölü olarak kabul edilmiş ve ölü larvalar beherden uzaklaştırılmıştır. Bir testin kontrol grubunda sağ kalım oranı %90'ın üzerindeyse o test geçerli kabul edilmiştir [19].



Şekil 2. Çalışmanın şematik gösterimi.

C. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

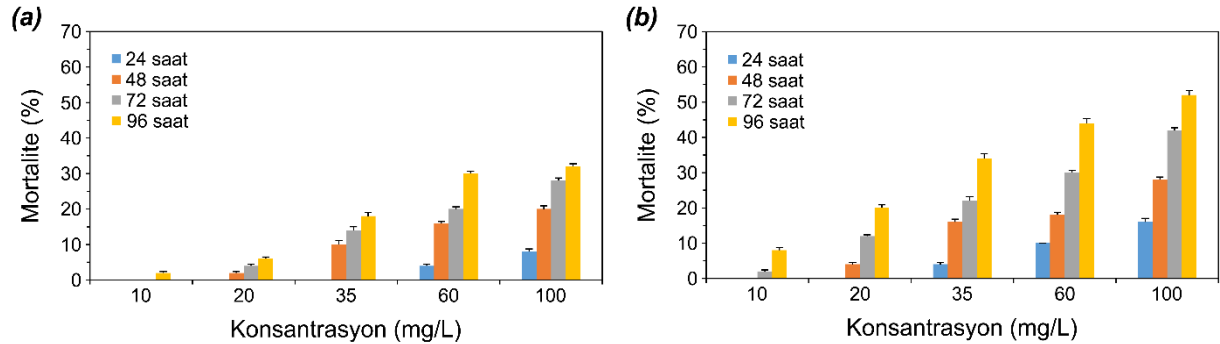
Elde edilen mortalite oranları ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı boyanın konsantrasyonları arasındaki ve maruziyet süreleri arasındaki mortalite farklılıkları tek yönlü varyans

analizi (one-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve anlamlı farklılık olması durumunda bu farklılıkların hangi konsantrasyonlar ve hangi maruziyet süreleri arasında bulunduğunu tespit etmek için de Fisher'in en küçük anlamlı farklar (Fisher's LSD) metodu uygulanmıştır. İki boyanın mortalite oranlarındaki farklılıklar bağımsız iki örnek *t*-testi (2-sample *t*-test) ile incelenmiştir. Her bir boya için, mortalite ile boya konsantrasyonu ve maruziyet süresi arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon metodu ile test edilmiş ve korelasyon katsayıları (*r*) belirlenmiştir. Mortalite (bağımlı değişken) ile maruziyet süresi ve konsantrasyon (bağımsız değişkenler) arasındaki ilişkiyi modellemek amacıyla her bir boya için çoklu regresyon analizi uygulanmış ve bağımsız değişkenin/değişkenlerin bağımlı değişkendeki varyasyonu açıklayabilme oranı olarak bilinen belirleme katsayısı (*r*²) tespit edilmiştir. Tüm bu istatistiksel analizler Minitab 19 (Minitab Inc., State College, PA) paket programında gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık değeri (*p*) 0,05 olarak belirlenmiş ve bu değer altındaki tüm *p* değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca her bir boya için, gerçekleştirilen 5 replikasyonlu *C. riparius* maruziyet testlerinden elde edilen ortalama mortalite oranları kullanılarak, farklı maruziyet sürelerindeki (24, 48, 72 ve 96 saat) LC₅₀ değerleri ve bunların %95 güven sınırları SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL) paket programında probit analizi metodu ile hesaplanmıştır.

III. BULGULAR

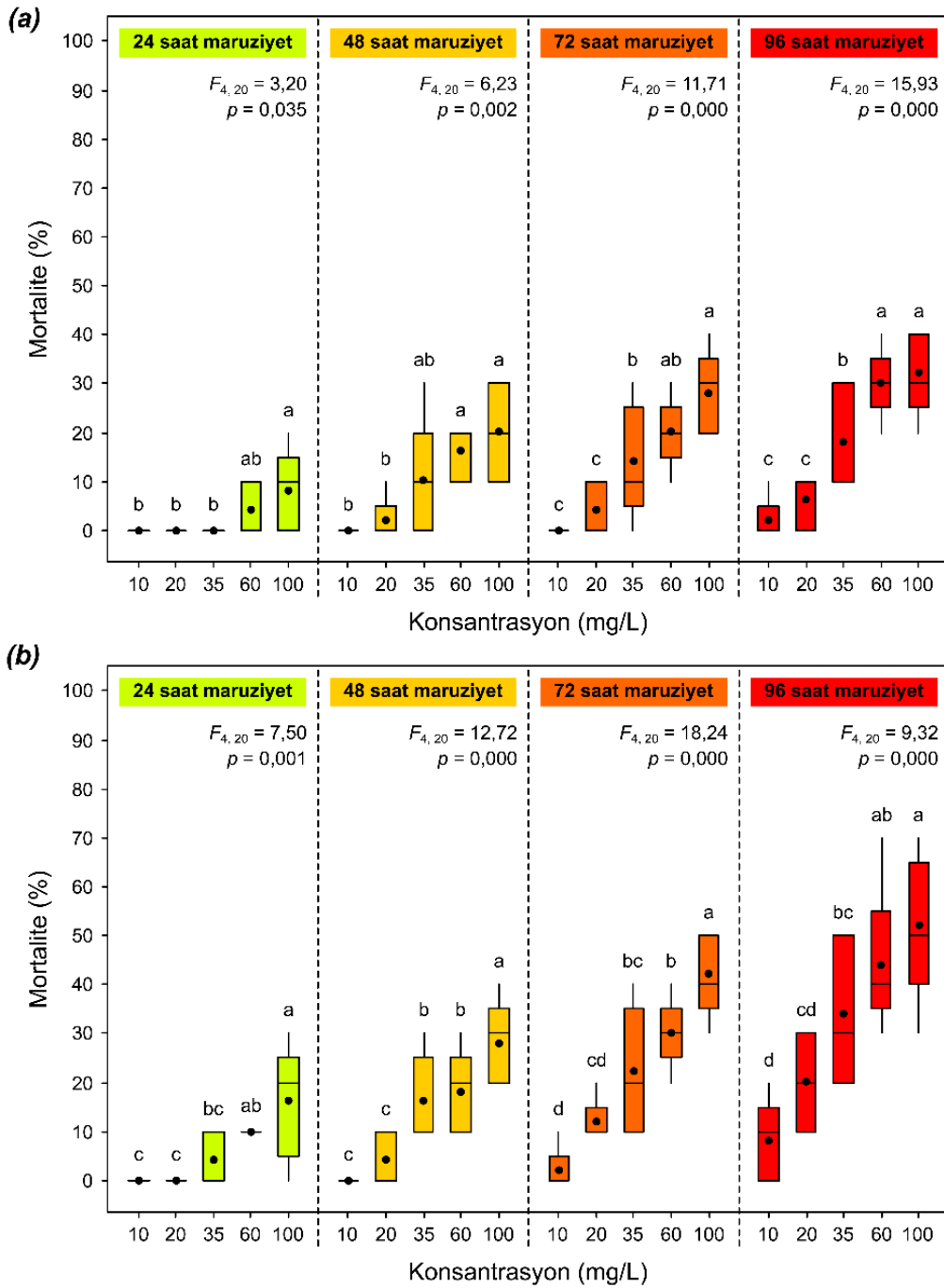
Maruziyet deneylerindeki test süresi boyunca kontrol gruplarının tamamındaki *C. riparius* sağ kalım oranı %100 olarak tespit edilmiş ve bu nedenle de tüm testler geçerli kabul edilmiştir. Test süresi boyunca mortalite oranları Boya 1 için %0 ile %40 arasında, Boya 2 içinse %0 ile %70 arasında değişmiştir. Boyaların farklı konsantrasyonlardaki ortalama *C. riparius* mortalite oranları Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. Test edilen disazo boyalar Boya 1'in (a) ve Boya 2'nin (b) farklı konsantrasyonlarının farklı maruziyet sürelerinde *C. riparius* mortalitesi üzerine etkileri.

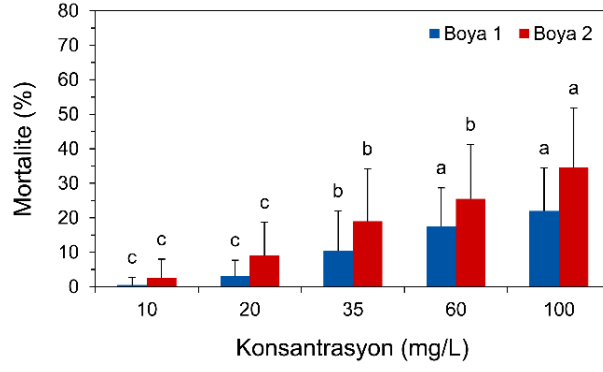
A. KONSANTRASYON DEĞERLENDİRMELERİ

Eş maruziyet sürelerinde boya konsantrasyonlarının sebep olduğu *C. riparius* mortaliteleri istatistiksel olarak incelendiğinde her iki boya için de tüm maruziyet sürelerinde farklı boya konsantrasyonlarında gözlenen mortalite oranlarının istatistiksel açıdan farklı olduğu belirlenmiştir (*p*<0,05) (Şekil 4). Buna göre Boya 1 ve Boya 2'nin yüksek konsantrasyonlarının düşük konsantrasyonlarına kıyasla istatistiksel açıdan önemli ölçüde daha yüksek mortalite oranlarına sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4a ve b).



Şekil 4. Boya 1 (a) ve Boya 2 (b) için farklı konsantrasyonların eş maruziyet sürelerindeki *C. riparius* mortalite oranları. Grafiklerde kutudaki siyah nokta ortalama, yatay çizgi medyanı, kutunun alt ve üst sınırları sırasıyla 25. ve 75. persentil değerlerini, kutunun altındaki ve üstündeki dikey çizgiler ise dağılım aralığını göstermektedir. Tek yönlü ANOVA testinin istatistiksel sonuçları grafiklere dahil edilmiştir. Bir maruziyet süresi içerisinde farklı harfler konsantrasyonlar arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı mortalite farklılıklarını ifade etmektedir ($p < 0,05$).

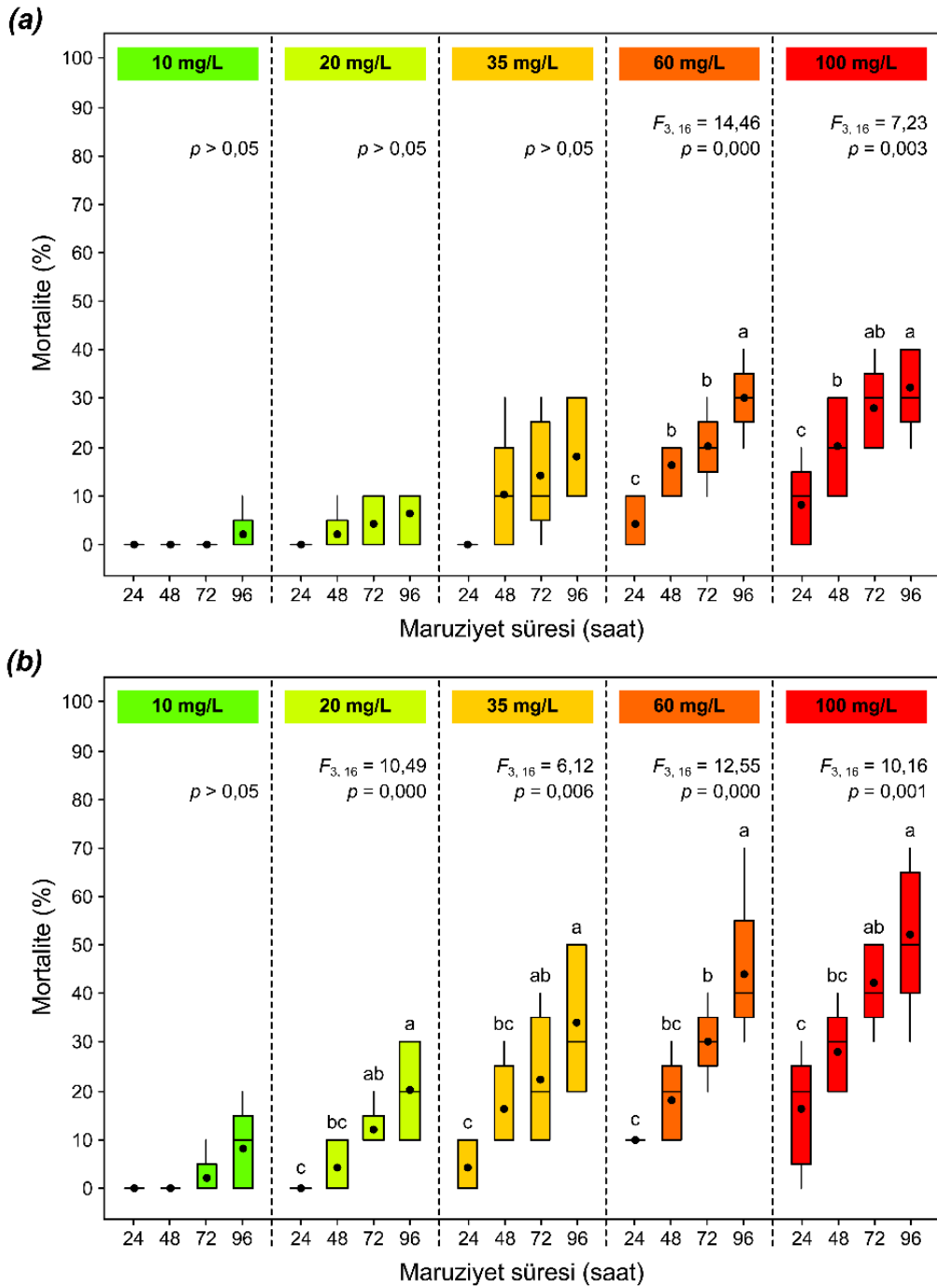
Boya konsantrasyonlarındaki ortalama *C. riparius* mortaliteleri istatistiksel olarak incelendiğinde her iki boya için de farklı konsantrasyonlarda elde edilen mortalite oranları arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Boya 1 için $F_{4,95}=19,29$; $p < 0,001$ ve Boya 2 için $F_{4,95}=18,05$; $p < 0,001$). Buna göre Boya 1 için en yüksek mortalite oranı 100 ve 60 mg/L konsantrasyonlarda (sırasıyla $22 \pm 12,40$ ve $17,5 \pm 11,18$), Boya 2 için ise 100 mg/L konsantrasyonda ($34,5 \pm 17,31$) gözlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Test edilen boya ların farklı konsantrasyonlardaki ortalama *C. riparius* mortalite oranları. Grafikte standart sapma değ erleri de gösterilmektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler aynı boyanın konsantrasyonları arasındaki istatistiksel mortalite oranı farklılıklarını ifade etmektedir ($p < 0,05$).

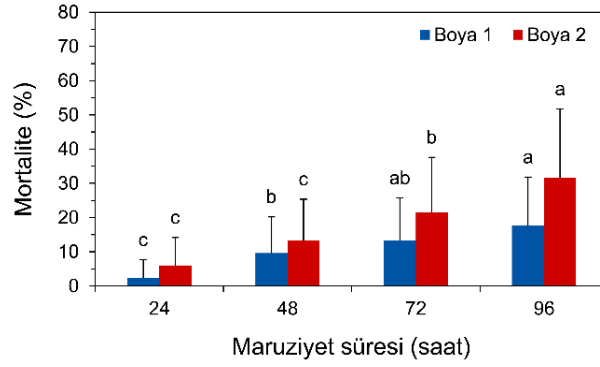
B. MARUZİYET SÜRESİ DEĞERLENDİRMELERİ

Eş konsantrasyonlarda maruziyet sürelerinin *C. riparius* mortaliteleri istatistiksel olarak incelendiğinde Boya 1 için sadece 60 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda, Boya 2 için ise 10 mg/L dışındaki tüm konsantrasyonlarda farklı maruziyet sürelerinde gözlenen mortalite oranlarının istatistiki bakımdan farklı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 6). Buna göre Boya 1'in özellikle yüksek konsantrasyonlarda (60 ve 100 mg/L) uzun maruziyet sürelerinin daha kısa maruziyetlere kıyasla istatistiksel açıdan önemli ölçüde daha yüksek mortalite oranları ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Şekil 6a). Boya 2 için de aynı durum geçerlidir ancak söz konusu durum 20 mg/L gibi düşük sayılabilecek bir boya konsantrasyonundan itibaren gözlenmiştir (Şekil 6b).



Şekil 6. Boya 1 (a) ve Boya 2 (b) için farklı maruziyet sürelerinin eş konsantrasyonlardaki *C. riparius* mortalite oranları. Grafiklerde kutudaki siyah nokta ortalamayı, yatay çizgi medyanyı, kutunun alt ve üst sınırları sırasıyla 25. ve 75. persentil değerlerini, kutunun altındaki ve üstündeki dikey çizgiler ise dağılım aralığını göstermektedir. Tek yönlü ANOVA testinin istatistiksel sonuçları grafiklere dahil edilmiştir. Bir konsantrasyon içerisindeki farklı harfler maruziyet süreleri arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı mortalite farklılıklarını ifade etmektedir ($p < 0,05$).

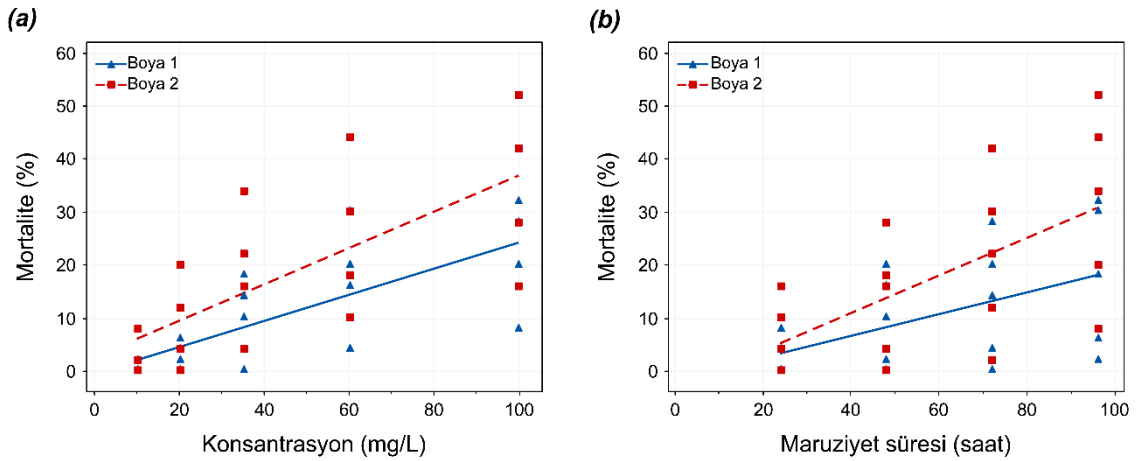
Maruziyet sürelerindeki ortalama *C. riparius* mortaliteleri istatistiksel olarak incelendiğinde her iki boya için de farklı maruziyet sürelerinde elde edilen mortalite oranları arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Boya 1 için $F_{3,96}=8,30$; $p < 0,001$ ve Boya 2 için $F_{3,96}=13,89$; $p < 0,001$). Buna göre en yüksek mortalite oranı her iki boya için de 96 saatlik maruziyet süresinde (Boya 1 için $\%17,60 \pm 14,22$ ve Boya 2 için $\%31,60 \pm 20,14$) gözlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Test edilen boyaaların farklı maruziyet sürelerindeki ortalama *C. riparius* mortalite oranları. Grafikte standart sapma değerleri de gösterilmektedir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler aynı boyanın maruziyet süreleri arasındaki istatistiksel mortalite farklılıklarını ifade etmektedir ($p < 0,05$).

C. MORTALİTE İLE KONSANTRASYON VE MARUZİYET SÜRESİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER

Test edilen boyaaların mortalite ile konsantrasyon ve maruziyet süresi arasındaki korelasyonları test etmek için gerçekleştirilen analizler, her iki boyanın mortalitesi ile konsantrasyon ve maruziyet süresi arasında istatistiksel bakımdan anlamlı korelasyonlar olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$). Buna göre boya konsantrasyonunda ve maruziyet süresinde meydana gelen artışların mortalitede artışa sebep olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 8). Ancak Boya 2 için mortalite ve maruziyet süresi arasında kısmen güçlü bir korelasyon olduğu bulunurken ($r = 0,610$; $p < 0,01$), Boya 1 için orta derece bir korelasyon olduğu saptanmıştır ($r = 0,520$; $p < 0,05$). Mortalite ve boya konsantrasyonu arasındaki korelasyonun ise her iki boya için güçlü olduğu belirlenmiştir (Boya 1 için $r = 0,748$; $p < 0,001$ ve Boya 2 için $r = 0,715$; $p < 0,001$). Gerçekleştirilen çoklu regresyon analizi, her iki boya için de bağımlı değişken olarak düşünülen mortalite ile bağımsız değişken olarak düşünülen hem boya konsantrasyonu hem de maruziyet süresi arasında istatistiksel bakımdan anlamlı ilişki olduğunu göstermiştir ($p < 0,001$). Belirlenen modellere göre r^2 değerlerinin her iki boya için de 0,83'ten büyük olduğu bulunmuştur (Boya 1 için $r^2 = 0,831$ ve Boya 2 için $r^2 = 0,893$). Buna göre Boya 1 için bağımsız değişkenler mortalitede meydana gelen değişimin %83,1'ini, Boya 2 için ise %89,3'ünü açıklayabilmektedir.



Şekil 8. Test edilen boyaaların mortalitesi ile konsantrasyon (a) ve maruziyet süresi (b) arasındaki korelasyon.

D. BOYALARIN MORTALİTE FARKLILIKLARI

Test edilen boyaaların *C. riparius*'ta neden olduğu mortalite oranları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, her ne kadar eş maruziyet sürelerinde Boya 2'nin mortalite oranı Boya 1'inkinden daha

fazla olsa da 24 ve 48 saat maruziyetlerde iki boyanın mortalite oranları arasında anlamlı farklılıklar bulunmadığı ($p>0,05$), fakat 72 ve 96 saat maruziyetlerde Boya 2'nin Boya 1'e göre istatistiki bakımdan daha yüksek mortaliteye sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 1). Boyaların genel mortalite oranları kıyaslandığındaysa, 72 ve 96 saat maruziyet sürelerindeki duruma benzer şekilde, Boya 2'nin sahip olduğu mortalite oranının ($18,10\pm 17,45$) Boya 1'ine ($10,70\pm 12,33$) göre istatistiki bakımdan daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Tablo 1).

Tablo 1. Test edilen boyaların genel ve eş maruziyet sürelerindeki *C. riparius* mortalite oranları (ortalama±standart sapma) ile boyaların mortalitelerinin karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen bağımsız iki örnek t-testine ilişkin sonuçlar.

Maruziyet süresi	Mortalite oranları (%)		t-testi sonuçları		
	Boya 1	Boya 2	t	sd	p
24 saat	2,40±5,23	6,00±8,16	-	-	>0,05
48 saat	9,60±10,60	13,20±12,15	-	-	>0,05
72 saat	13,2±12,49	21,60±15,99	2,07	45	0,044
96 saat	17,60±14,22	31,60±20,14	2,84	43	0,007
Genel	10,70±12,33	18,10±17,45	3,46	178	0,001

E. BOYALARIN AKUT TOKSİSİTELERİ

Maruziyet testlerindeki *C. riparius* mortalite verileri kullanılarak 24, 48, 72 ve 96 saat maruziyet sürelerindeki LC_{50} değerleri ve bunların %95 güven sınırları başarılı bir şekilde belirlenebilmiştir (Tablo 2). Her iki boya için de maruziyet süresinin artmasıyla LC_{50} değerinde bir azalma, dolayısıyla da akut toksisitede bir artış gözlenmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saat maruziyet sürelerinde Boya 2, Boya 1'den sırasıyla 1,39; 1,42; 1,84 ve 2,16 kat daha toksik bulunmuş ve dolayısıyla da Boya 2'nin *C. riparius* için tüm maruziyet sürelerinde Boya 1'e göre daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Boyaların LC_{50} değerleri üzerinden yapılan toksisite karşılaştırması maruziyet süresinin uzamasına paralel olarak Boya 2'nin akut toksisitesinde Boya 1'e göre daha fazla bir artış olduğunu göstermiştir.

Tablo 2. Test edilen boyaların *C. riparius* için farklı maruziyet sürelerindeki LC_{50} değerleri ve %95 güven sınırları (parantez içi).

Maruziyet süresi	LC_{50} değeri (mg/L)	
	Boya 1	Boya 2
24 saat	195,45 (122,28-1177,55)	140,16 (97,71-258,10)
48 saat	112,20 (76,50-184,36)	79,02 (53,87-113,72)
72 saat	77,66 (54,27-108,64)	42,29 (28,38-54,34)
96 saat	56,76 (40,24-73,25)	26,33 (10,08-35,82)

IV. TARTIŞMA

Boya içeren atıkların genellikle sulara deşarj edilmesi nedeniyle [25] azo boyalar çevresel anlamda endişe kaynağıdır [6]. Çünkü azo boyaların bazılarının toksik, mutajenik ve kanserojen özelliklerinin olması bu boyaların boya içeren endüstriyel atıklar ile çevreye salınmasının büyük bir sorun haline gelmesine neden olmaktadır [25]. Bu bağlamda azo boyaların mortalite etkisinin ve toksisitesinin değerlendirilmesi hem çevre hem de maruz kalan organizmalar üzerindeki çeşitli etkileri nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Nitekim bazı azo boyaların suda yaşayan organizmalara karşı toksisitesinin incelendiği bazı çalışmalar azo boyaların toksisitesinin değerlendirilmesinin önemini gözler önüne sermektedir [6], [16], [18], [24], [26].

Bu çalışmada konsantrasyon ve maruziyet süresi gruplarının karşılaştırılması sonucu, test edilen her iki boya için de yüksek konsantrasyonlarda ve uzun maruziyet sürelerinde daha yüksek mortalite oranları

tespit edilmiştir. Ayrıca bu sonuç, her iki boya için de mortalite ile boya konsantrasyonu ve maruziyet süresi arasında bulunan pozitif korelasyonlar tarafından da desteklenmektedir. Nitekim gerçekleştirilen çoklu regresyon analizinde bağımsız değişkenler olarak hem boya konsantrasyonunun hem de maruziyet süresinin boyanın neden olduğu mortalite oranı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan boyaların genel mortalite oranları kıyaslandığında Boya 2'nin *C. riparius* üzerinde Boya 1'den daha yüksek mortalite etkisine sahip olduğu, boyaların eş maruziyet sürelerindeki mortalite oranları kıyaslandığında ise 72 ve 96 saat maruziyet sürelerinde yine Boya 2'nin *C. riparius* üzerinde Boya 1'den daha yüksek mortalite etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Tüm bu istatistiksel analizler neticesinde elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda, Boya 2'nin yapısında sübstitüent olarak bulunan metil grubunun organizmalar üzerinde Boya 1'in yapısındaki metoksi grubuna kıyasla daha fazla mortalite etkisine sebep olma potansiyeline sahip olduğu ve Boya 2'nin sucül ekosistemlerde yüksek konsantrasyonlarda uzun süreli bulunmasının bu ekosistemler için kayda değer bir tehdit oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Azo boyaların toksik özelliklerinin boya yapısında bulunan sübstitüentlerin çeşidine ve doğasına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir [6], [24], [27]. Fakat bu ve benzeri yapıdaki boyaların doğadaki gerçek risk durumlarının kesin bir şekilde ortaya çıkarılabilmesi ve tam anlamıyla bir risk değerlendirmesi için onların doğadaki konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekir.

Mortalite etkilerinin yanı sıra, bu çalışmada test edilen iki boya farklı maruziyet süreleri için hesaplanan LC₅₀ değerlerine göre akut toksisite kategorileri doğrultusunda sınıflandırılmıştır. Buna göre Boya 1, 24 ve 48 saat maruziyetlerde pratikte toksik değilken (LC₅₀>100 mg/L), 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede toksiktir (10 mg/L<LC₅₀≤100 mg/L). Boya 2 ise 24 saat maruziyette pratikte toksik değilken (LC₅₀>100 mg/L), 48, 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede toksiktir (10 mg/L<LC₅₀≤100 mg/L). Ancak bu sınıflandırmanın sadece akut letal etkiler için geçerli olduğu ve letal olmayan konsantrasyonlara kronik maruziyetin de sucül organizmalar için tehlike oluşturabildiği gerçeği unutulmamalıdır. LC₅₀ değerleri üzerinden yapılan akut toksisite değerlendirmeleri, tüm maruziyet sürelerinde Boya 2'nin akut toksisitesinin Boya 1'e göre daha yüksek olduğunu ve maruziyet süresi uzadıkça Boya 2'nin akut toksisitesinde Boya 1'e göre daha fazla bir artış gerçekleştiğini göstermiştir.

Literatürde metoksi ve metil gruplarının birbirine göre veya başka sübstitüentlere göre *C. riparius* üzerindeki mortalite etkisinin ve LC₅₀ değerlerinin karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmadığı için bu çalışmada *C. riparius* için elde edilen bulguların karşılaştırılması mümkün olamamıştır. Ancak *G. roeseli* üzerinde yapılan 48 saatlik bir boya toksisitesi değerlendirme çalışmasında metil grubu içeren boyanın metoksi grubu içeren boyaya göre daha yüksek mortalite oranına dolayısıyla her iki maruziyet süresinde de (24 ve 48 saat) daha yüksek LC₅₀ değerine sahip olduğu bulunmuştur [6]. Her ne kadar kullanılan test organizmaları ve test edilen boyalar farklı olsa da *C. riparius* ile gerçekleştirilen mevcut çalışmada metil ve metoksi gruplarını içeren iki boyanın gösterdiği genel toksisitenin şekli *G. roeseli* ile gerçekleştirilen söz konusu çalışmada metil ve metoksi gruplarını içeren iki boyanın gösterdiği ile benzerdir. Bu noktada, metil grubu içeren Boya 2'nin metoksi grubu içeren Boya 1'e kıyasla daha toksik olmasının nedenlerini açıklama ihtiyacı doğmasına karşın mevcut çalışma bunun için yeterli değildir. Dolayısıyla, bu sübstitüentlerin *C. riparius* üzerindeki etkileri ve etki mekanizmaları ile *C. riparius*'un bu etkilere karşı verdiği cevapların özellikle moleküler düzeyde incelenmesi, söz konusu toksisitenin nedenlerinin açıklanmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca toksisitenin genellikle azo boyanın kendisinden değil, parçalanma ürünlerinden kaynaklandığı düşünüldüğünde [28], bu iki boyanın parçalanma ürünlerinin daha ileri çalışmalarda incelenmesi yerinde olacaktır.

V. SONUÇ

Mortalite değerlendirmeleri neticesinde Boya 2'nin organizmalar üzerinde Boya 1'e kıyasla daha fazla mortalite etkisine sebep olma potansiyeline sahip olduğu ve sucül ekosistemlerde yüksek konsantrasyonlarda uzun süreli bulunmasının bu ekosistemler için kayda değer bir tehdit oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Yapılan toksisite sınıflandırmasında Boya 1'in, 24 ve 48 saat maruziyetlerde pratikte toksik değilken 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede toksik olduğu, Boya 2'nin ise 24 saat maruziyette pratikte toksik değilken 48, 72 ve 96 saat maruziyetlerde hafif derecede

toksik olduğu bulunmuştur. Mortalite etkisi ve toksisitedeki bu farklılıkların boya yapısında bulunan sübstitüentlerin farklı olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Gerçekleştirilen bu çalışma, yapısında metoksi ve metil grubu içeren azo boyaaların *C. riparius* üzerindeki mortalite etkisi ve akut toksisitesi ile ilgili önemli bilgiler sunmaktadır. Ancak daha kapsamlı ekotoksikolojik değerlendirmeler yapabilmek için bu ve benzeri yapıdaki azo boyaaların ve bozunma ürünlerinin farklı organizmalar üzerindeki etkilerini ve etki mekanizmalarını moleküler düzeyde inceleyecek ve sucul ortamlardaki gerçek konsantrasyonlarını belirleyecek çalışmalara ihtiyaç olduğu da bir gerçektir.

TEŞEKKÜR: Çalışmada test edilen boyaaları sağlayan Doç. Dr. Aykut DEMİRÇALI'ya çok teşekkür ederim. Bu çalışma herhangi bir kurum ya da kuruluştan maddi destek almamıştır.

VI. KAYNAKLAR

- [1] I. Bashir, F. A. Lone, R. A. Bhat, S. A. Mir, Z. A. Dar, and S. A. Dar, “Concerns and threats of contamination on aquatic ecosystems,” *Bioremediation Biotechnol. Sustain. Approaches to Pollut. Degrad.*, pp. 1–26, 2020.
- [2] G. R. Scott and K. A. Sloman, “The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 68, no. 4, pp. 369–392, 2004.
- [3] N. C. Yildirim and M. Yaman, “The usability of oxidative stress and detoxification biomarkers in *Gammarus pulex* for ecological risk assessment of textile dye methyl orange,” *Chem. Ecol.*, vol. 35, no. 4, pp. 319–329, 2019.
- [4] P. F. Gordon and P. Gregory, “Azo Dyes,” in *Organic Chemistry in Colour*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1987, pp. 95–162.
- [5] H. Zollinger, *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*, 3rd rev. Weinheim: Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2003.
- [6] A. Demirçalı, F. Karcı, and F. Sari, “Synthesis and absorption properties of five new heterocyclic disazo dyes containing pyrazole and pyrazolone and their acute toxicities on the freshwater amphipod *Gammarus roeselii*,” *Color. Technol.*, vol. 137, no. 3, pp. 280–291, 2021.
- [7] A. Demirçalı, “5-(3'-Amino-4'-arilazo-1H-pirazol-5'-il azo) barbitürük asit boyarmaddelerin sentezi ve spektroskopik özelliklerinin incelenmesi,” *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim. Derg.*, vol. 24, no. 7, pp. 1293–1297, 2018.
- [8] A. Demirçalı, “Novel heterocyclic disazo dyes containing pyrazole and phenylpyrazole. part 1: Synthesis, characterization, solvent polarity and acid-base sensitive characteristics,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1231, p. 129960, 2021.
- [9] F. Yıldırım, A. Demirçalı, F. Karcı, A. Bayrakdar, P. T. Taşlı, and H. H. Kart, “New coumarin-based disperse disazo dyes: Synthesis, spectroscopic properties and theoretical calculations,” *J. Mol. Liq.*, vol. 223, pp. 557–565, 2016.
- [10] F. Yıldırım, “3-amino-5-hidroksi-1H-pirazol bazlı bazı yeni disazo boyarmaddelerinin sentezi ve spektroskopik özellikleri,” *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edeb. Fakültesi Fen Derg.*, vol. 16, no. 1, pp. 189–199, 2021.

- [11] M. T. Gabr, N. S. El-Gohary, E. R. El-Bendary, M. M. El-Kerdawy, N. Ni, and M. I. Shaaban, "Synthesis, antimicrobial, antiquorum-sensing and cytotoxic activities of new series of benzothiazole derivatives," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 26, no. 12, pp. 1522–1528, 2015.
- [12] A. K. El-Damasy, J. H. Lee, S. H. Seo, N. C. Cho, A. N. Pae, and G. Keum, "Design and synthesis of new potent anticancer benzothiazole amides and ureas featuring pyridylamide moiety and possessing dual B-RafV600E and C-Raf kinase inhibitory activities," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 115, pp. 201–216, 2016.
- [13] S. H. Lin and C. F. Peng, "Treatment of textile wastewater by electrochemical method," *Water Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 277–282, 1994.
- [14] Y. Verma, "Toxicity assessment of dye containing industrial effluents by acute toxicity test using *Daphnia magna*," *Toxicol. Ind. Health*, vol. 27, no. 1, pp. 41–49, 2011.
- [15] R. Anliker, "Color chemistry and the environment," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 1, no. 2, pp. 211–237, Sep. 1977.
- [16] J. S. Bae and H. S. Freeman, "Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*," *Dye. Pigment.*, vol. 73, no. 1, pp. 81–85, 2007.
- [17] R. O. Alves de Lima, A. P. Bazo, D. M. F. Salvadori, C. M. Rech, D. de Palma Oliveira, and G. de Aragão Umbuzeiro, "Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 626, no. 1–2, pp. 53–60, Jan. 2007.
- [18] E. R. A. Ferraz, M. D. Grando, and D. P. Oliveira, "The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*," *J. Hazard. Mater.*, vol. 192, no. 2, pp. 628–633, 2011.
- [19] E. Zucker, "Hazard Evaluation Division Standard Evaluation Procedure: Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates," *US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs*, Washington, DC, 1985.
- [20] P. V. Michailova, "Rearrangements in Chironomidae (Diptera) genomes induced by various environmental stress factors," *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 10–20, 2011.
- [21] M. de la Fuente, R. M. Folgar, P. Martínez-Paz, E. Cortés, J. L. Martínez-Guitarte, and M. Morales, "Effect of environmental stressors on the mRNA expression of ecdysone cascade genes in *Chironomus riparius*," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021.
- [22] R. Planelló, Ó. Herrero, P. Gómez-Sande, I. Ozáez, F. Cobo, and M. J. Servia, "Ecdysone-related biomarkers of toxicity in the model organism *Chironomus riparius*: Stage and sex-dependent variations in gene expression profiles," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, p. e0140239, Oct. 2015.
- [23] H. B. Doria and M. Pfenninger, "A multigenerational approach can detect early Cd pollution in *Chironomus riparius*," *Chemosphere*, vol. 262, p. 127815, Jan. 2021.
- [24] A. Sari and F. Sari, "A comparative examination of acute toxicities of three disazo dyes to freshwater macroinvertebrates *Gammarus roeseli* (Crustacea: Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera)," *Chem. Ecol.*, vol. 37, no. 8, pp. 683–703, 2021.
- [25] B. D. C. Ventura-Camargo and M. A. Marin-Morales, "Azo Dyes: Characterization and Toxicity—A Review," *Text. Light Ind. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 2, pp. 85–103, 2013.

[26] M. Hernández-Zamora and F. Martínez-Jerónimo, “Exposure to the azo dye Direct blue 15 produces toxic effects on microalgae, cladocerans, and zebrafish embryos,” *Ecotoxicology*, vol. 28, no. 8, pp. 890–902, 2019.

[27] E. R. A. Ferraz et al., “Differential toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and Daphnia acute toxicity test,” *Environ. Toxicol.*, vol. 26, no. 5, pp. 489–497, Oct. 2011.

[28] A. Bafana, S. S. Devi, and T. Chakrabarti, “Azo dyes: Past, present and the future,” *Environ. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 350–370, 2011.