T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

BAZI İNSAN PATOJENİ BAKTERİLER VE AĞIR METALLERİN MODEL ORGANİZMA OLAN ZEBRA BALIĞININ (*Danio rerio*) EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİNE ETKİLERİ

RIYAM GHAZI KAREEM AL-SARRAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE

OCAK - 2021
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Riyam Ghazi Kareem AL-SARRAY tarafından hazırlanan "**BAZI İNSAN PATOJENİ BAKTERİLER VE AĞIR METALLERİN MODEL ORGANİZMA OLAN ZEBRA BALIĞININ (*Danio rerio*) EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİNE ETKİLERİ**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **19.01.2021** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir

Danışman	Doç.Dr. Nejdet GÜLTEPE Atatürk Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Musa BULUT Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Fırat SEFAOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Riyam Ghazi Kareem AL-SARRAY

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI İNSAN PATOJENİ BAKTERİLER VE AĞIR METALLERİN MODEL ORGANİZMA OLAN ZEBRA BALIĞININ (*Danio rerio*) EMBRİYOLOJİK GELİŞİMİNE ETKİLERİ

RIYAM GHAZI KAREEM AL-SARRAY

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: DOÇ. DR. NEJDET GÜLTEPE

Zebra balığı *(Danio rerio*) bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada; FeClOH, $K_3Fe(CN)_6$, KCN ve $CuSO_4$ gibi bazı ağır metaller ile metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi bazı insan patojeni olan bakterilerin model organizma zebra balığının (*Danio rerio*) embriyolojik gelişimi üzerine toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Zebra balığı embriyoları, farklı ağır metallerin 0.5 mg/L konsantrasyondaki dozuna 96 hpf (döllenmeden sonraki saat) maruz bırakılmıştır. Maruziyet süresi boyunca mortalite, yumurtadan çıkma ve malformasyon oranları incelenmiştir. Deneme sonucunda, FeClOH ve $K_3Fe(CN)_6$ bileşiklerinin zebra balığı embriyoları için toksik olduğunu ve ölüm oranının $\leq$ %50 artmasına ve yumurtadan çıkmanın gecikmesine neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, FeClOH ve $K_3Fe(CN)_6$ bileşikleri anormalliklere neden olurken, KCN ve $CuSO_4$ bileşiklerinin zebra balığı embriyoları için uygulanan dozda daha toksik olduğu ve 24 hpf değerlendirmesinde ölüm oranının %100 olduğu tespit edilmiştir.

İnsan patojeni olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri $1x10^6$ CFU/mL dozuna 110 hpf maruz bırakılmıştır. Maruziyet süresi boyunca mortalite, yumurtadan çıkma ve malformasyon oranları incelenmiştir. Deneme sonucunda, tüm insan patojenik bakterilerinin zebra balığındaki ölüm oranının $\leq$ %50 artmasına neden olduğu ve yumurtadan çıkmayı geciktirdiği görülmüştür. Uygulanan patojenik bakterilerden bazılarının ise (metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli*) çeşitli anormalliklere neden olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan ağır metallere ve insan patojeni bakterilere kısa süreli maruz kalmanın zebra balığı embriyolarının gelişimi üzerinde toksik etkisi olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Model organizma, zebra balığı, ağır metal, insan patojenleri, embriyoloji, *Danio rerio*

Ocak 2021, 76 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

EFFECTS OF SOME HUMAN PATHOGENIC BACTERIA AND HEAVY METALS ON EMBRIYOLOGICAL DEVELOPMENT OF MODEL ORGANISM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

RIYAM GHAZI KAREEM AL-SARRAY

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF GENETICS AND BIOENGINEERING
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. NEJDET GÜLTEPE

Zebrafish (*Danio rerio*) is used as a model organism in scientific studies. For this reason, this study aimed to investigate the toxic effect of some heavy metals, which are FeClOH, $K_3Fe(CN)_6$, KCN, and $CuSO_4$), and some human pathogenic bacteria, which are Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-sensitive coagulase-negative *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, on the embryological development of model organism zebrafish (*Danio rerio*).

Zebrafish embryos were exposed to different heavy metals at a concentration was 0.5 mg/L for 96 hpf (hours post-fertilization). Mortality, hatching, and malformation rates were examined during the exposure period. The result showed that FeClOH and $K_3Fe(CN)_6$ were toxic to zebrafish embryos and caused an increased mortality rate of $\leq$ 50% and delayed hatching. Moreover, FeClOH and $K_3Fe(CN)_6$ caused a type of abnormalities while KCN and $CuSO_4$ were more toxic to zebrafish embryos and caused a mortality rate increased, which was 100% at 24 hpf.

On the other hand, when zebrafish embryos were infected with human pathogenic bacteria such as Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-sensitive coagulase-negative *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, at 1 x 10^6 CFU/mL for 110 hpf mortality, hatching and malformation rates were examined. The results showed all of the human pathogenic bacteria caused an increased mortality rate of $\leq$ 50% and delay hatching. Some human pathogenic bacteria (methicillin-sensitive coagulase-negative *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, and *Escherichia coli*) caused several types of abnormalities.

In conclusion, short-term exposure to heavy metals and pathogenic bacteria has a toxic effect on zebrafish embryos' development.

KEYWORDS: Model organism, zebrafish, heavy methal, human pathogenic bacteria, embryology, *Danio rerio*

January 2021, 76 Page

TEŞEKKÜR

Varlığımın amacı olan, hayatımdaki her şey için Allah'a şükrediyorum. Öncelikle hayatımda bulunan ve beni destekleyen herkese teşekkür ediyorum.

Annem ve Babam; varlığınızın önünde, size olan duygularımı ifade etmek için uygun kelimeleri bulamıyorum sizi nasıl anlatsam az gelir varlığınızın önünde kelimeler ve düşünceler aciz kalır. Ne kadar teşekkür etsem ne kadar övsem hakkınızı ödeyemem. Duygularımın bir ifadesini burada ellerimin arasında alçakgönüllü bir hediye olarak sunuyorum... İlkokula ilk adımımı attığımdan bugüne kadar öğrenim hayatımda benim için gösterdiğiniz cömert çabalarınız için çok teşekkür ediyorum. Bu başarının meyvesi sizin eserinizdir.Tez çalışmaı yaparken her adımımda yanımda olan Doç.Dr. Nejdet GÜLTEPE hocama saygıyla teşekkür ediyorum. Bana hocalık ve danışmanlıktan önce uzakta olan anne ve babamın ilgisini gösterdi. Tezime başladığım ilk günden beri, çalışmamı başarıyla ve mükemmel bir şekilde yerine getirmek için içimde coşku ruhu uyandırmada büyük etkisi oldu... Evet, saygıdeğer hocam, görevim zordu ve kız olarak ülke dışına ilk kez çıktığım için daha da çok zordu ve bütün bu zorlukları sizin yardımınızla bu zorlukları aşabildim. Ve size saygıyla teşekkür ediyorum. Bana tüm akademik seviyelerde eğitim veren ve bugüne ulaştığım için büyük övgüyü hak eden tüm hocalarıma teşekkür ediyor, emeklerinizin meyvesini aldığımı belirterek saygılarımı sunuyorum.Ve beni destekleyen bütün arkadaşlarımada saygıyla teşekkür ediyorum...

Riyam Ghazi Kareem AL-SARRAY

Kastamonu, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. YÖNTEM **34**
2.1 Zebra Balığı (*Danio rerio*) ve Yumurta Alımı 34
2.2 Kullanılan Ağır Metaller ve İnsan Patojenleri 34
2.3 Görüntüleme Sistemleri 35
2.4 Toksisite Testleri 36
2.5 İstatistiksel Analizler 36
3. BULGULAR **37**
3.1 Ağır Metal Toksisite Sonuçları 37
3.1.1 FeClOH Toksisitesi 37
3.1.2 $K_3Fe(CN)_6$ Toksisitesi 39
3.1.3 KCN Toksisitesi 42
3.1.4 $CuSO_4$ Toksisitesi 42
3.2 İnsan Patojeni Toksisite Sonuçları 43
3.2.1 Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) Toksisitesi 43
3.2.2 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Toksisitesi 44
3.2.3 Metisiline Duyarlı Koagülaz Negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS) Toksisitesi 45
3.2.4 *Acinetobacter baumannii* Toksisitesi 47
3.2.5 *Escherichia coli* Toksisitesi 49
3.2.6 *Pseudomonas aeruginosa* Toksisitesi 52
4. SONUÇ VE ÖNERİLER **58**
KAYNAKLAR **59**
ÖZGEÇMİŞ **76**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Fabrika atıkları 1
Şekil 1.2 Ağır metaller 2
Şekil 1.3 Ağır metal kirliliğinin akış diyagramı 3
Şekil 1.4 Siyanürün toksisite mekanizması 5
Şekil 1.5 Bakır toksisitesinin semptomları 8
Şekil 1.6 Bakırın hücredeki etkileri 9
Şekil 1.7 Zebra balığı (Danio rerio) 26
Şekil 1.8 Erkek (♂) ve dişi (♀) zebra balığı (Danio rerio) 27
Şekil 1.9 Zebra balığı (Danio rerio) yumurtası ve embriyosu 28
Şekil 1.10 Benzerlik gösteren zebra balığı (Danio rerio) ve insan organ sistemeleri 29
Şekil 2.1 Zebra balığı (Danio rerio) üretim sistemi 34
Şekil 2.2 Ağır metal çalışması görüntüleme sistemi 35
Şekil 2.3 İnsan patojeni çalışması görüntüleme sistemi 35
Şekil 3.1Grupların FeClOH mortalite oranları 37
Şekil 3.2 Yumurtaların FeClOH açılma oranları 38
Şekil 3.3 Emriyolardaki FeClOH anomali oranları 38
Şekil 3.4 FeCIOH uygulanan zebra balığı embriyolarında 48 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Dt, kuyruk deformasyonu; Ea, göz anomalisi; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji). 39
Şekil 3.5 FeCIOH uygulanan zebra balığı embriyolarında 72 hpf'de görülen anomaliler (Vt, vertebral defromasyon; Ct, çarpık kuyruk). 39
Şekil 3.6 Grupların K3Fe(CN)6 mortalite oranları 40
Şekil 3.7 Yumurtaların K3Fe(CN)6 açılma oranları 40
Şekil 3.8 Emriyolardaki K3Fe(CN)6 anomali oranları 41
Şekil 3.9 K3Fe(CN)6 uygulanan zebra balığı embriyolarında 48 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Dt, kuyruk defromasyonu; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji). 41
Şekil 3.10 K3Fe(CN)6 uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Dt, kuyruk defromasyonu; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji; Ht, kanca kuyruk; HD, Helesial vücut) 41
Şekil 3.11 Grupların KCN mortalite oranları 42
Şekil 3.12 Grupların CuSO4 mortalite oranları 42
Şekil 3.13 Grupların MSSA mortalite oranları 43
Şekil 3.14 Yumurtaların MSSA açılma oranları 44
Şekil 3.15 Grupların MRSA mortalite oranları 45
Şekil 3.16 Yumurtaların MRSA açılma oranları 45
Şekil 3.17 Grupların MSCoNS mortalite oranları 46
Şekil 3.18 Yumurtaların MSCoNS açılma oranları 46
Şekil 3.19 Embriyolardaki MSCoNS anomali oranları 47
Şekil 3.20 MSCoNS uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Vd, omurga deformasyonu; Dt, kuyruk deformasyonu). 47

Şekil 3.21 Grupların A. baumannii mortalite oranları 48
Şekil 3.22 Yumurtaların A. baumannii açılma oranları 48
Şekil 3.23 Embriyolardaki A. baumannii anomali oranları 49
Şekil 3.24 baumannii uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Vd, omurga deformasyonu). 49
Şekil 3.25 Grupların E.coli mortalite oranları 50
Şekil 3.26 Yumurtaların E.coli açılma oranları 50
Şekil 3.27 Embriyolardaki E. coli anomali oranları 51
Şekil 3.28 *E. coli* uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Sc, skoliyosis; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; Ed, ödem omurga deformasyonu). 51
Şekil 3.29 Grupların P. aeruginosa mortalite oranları 52
Şekil 3.30 Yumurtaların P. aeruginosa açılma oranları 52

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 Demir toksisitesinin aşamaları 13
Tablo 3.1 Ağır metal çalışması özet tablosu 42
Tablo 3.2 İnsan patojeni çalışması özet tablosu 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	**:** Yüzde
>	**:** Büyük
<	**:** Küçük
≤	**:** Küçükeşit
♀	**:** Dişi
♂	**:** Erkek
ATP	**:** Adenozin trifosfat
CFU	**:** Koloni formundaki ünite
CFU/mL	**:** Mililitredeki koloni formundaki ünite
cm	**:** Santimetre
cm^3	**:** Santimetreküp
$CuSO_4$	**:** Bakır sülfat
DNA	**:** Deoksiribonükleik asit
FeClOH	**:** Demir hidroksil klorür
g	**:** Gram
g/cm^3	**:** Santimetreküpteki gram
HCN	**:** Hidrojen siyanür
$K_3Fe(CN)_6$	**:** Potasyum ferrisiyanür
KCN	**:** Potasyum siyanür
kg	**:** Kilogram
L	**:** Litre
mg	**:** Miligram
mg/kg	**:** Kilogramda miligram
mg/L	**:** Litredeki miligram
mL	**:** Mililitre
mmol	**:** Milimol
mmol/L	**:** Litredeki milimol
t	**:** Ton
µ	**:** Mikron
µm	**:** Mikrometre

Kısaltmalar

dpf	**:** Döllenmeden sonraki gün
EPA	**:** Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı
hpf	**:** Döllenmeden sonraki saat
MRSA	**:** Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*
MSCoNS	**:** Metisilin duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis*
MSSA	**:** Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*
WHO	**:** Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Sanayi devriminden bu yana insanlığın ihtiyaçlarını karşılamak için birçok fabrika kurulmuş ve bunların üretimine bağlı olarak bazı atıklar oraya çıkmıştır. Fabrikalardan kaynaklı çevre kirliliği, sanayi toplumunun gelişmesi, genişlemesi ve 20. yüzyılda artan nüfus yoğunluğu ile bağlantılı bir sorundur. Çevresel kirlilik, belirli amaçlar için uygun özelliklere sahip büyük antropojenik kimyasalların üretimi ile yoğunlaşmaktadır. Son 80 yılda kimyasalların üretimi yıllık 1 tondan 400 milyon t üzerine çıkmıştır (Haq, 2013). Kirletici; çevredeki sakıncalı etkilere neden olan, çevrenin refahını bozan, yaşam kalitesini düşüren ve sonunda ölüme neden olabilen herhangi bir maddedir. Böyle bir madde, istenen veya kabul edilebilir bir sınır olabilecek bir dizi veya tolerans sınırının ötesinde ortamda bulunmalıdır. Dolayısıyla çevre kirliliği, çevrede bir kirleticinin varlığıdır ve hava, su ve toprak kirlenebilir (Şekil 1.1) böylelikle çevrede bulunan canlılar zarar görebilir (Duruibe vd., 2007).



Şekil 1.1 Fabrika atıkları

Kirletici emisyonları dünya çapında artmakta ve bu artış özellikle su ortamında büyük sağlık ve çevre sorunlarını beraberinde getirmektedir. Kirlilik genellikle ağır metallerin karışımından oluşur (Richetti vd., 2011). "Ağır metaller" terimi, nispeten yüksek yoğunluğa sahip olan ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirli olan herhangi bir metalik elementi ifade eder (Khanam, 2014). Ağır metaller, atomik yoğunluğu 4 g/cm^3 miktardan daha fazla veya sudan 5 kat daha fazla olan metaller ve

metaloidler grubuna uygulanan genel bir toplu terimdir (Duruibe vd., 2007). Ağır metal terimi kullanımının yoğunlukla çok az ilgisi olup, daha çok kimyasal özelliklerle ilgilidir. Ağır metaller, insan sağlığını ve çevreyi etkileyebilecek bireysel metaller ve metal bileşiklerdir; ağır metaller arasında kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), çinko (Zn), cıva (Hg), arsenik (As), gümüş (Ag) krom (Cr), bakır (Cu) ve Demir (Fe) sayılabilir (Şekil 1.2) (URL-1).



Şekil 1.2 Ağır metaller

Ağır metaller çevreye doğal ve/veya antropojenik yollarla girerler (Şekil 1.3) Çeşitli ağır metal kaynakları arasında; toprak erozyonu, yer kabuğunun doğal ayrışması, madencilik, endüstriyel atıklar, kentsel yüzey akışı, kanalizasyon deşarjı, perstisit ve insektisitler vardır (Morais vd., 2012) Her ne kadar bu metaller bitkilerde ve hayvanlarda çok önemli biyolojik işlevlere sahip olsalar da, bazen kimyasal koordinasyon ve oksidasyon-azaltma özellikleri onlara homeostaz, taşıma, bölümlendirme ve gerekli hücre bileşenlerine bağlanma gibi kontrol mekanizmalarından kurtulabilmeleri için ek bir fayda sağlamıştır. Bu metaller, kendileri için yapılmamış protein bölgelerine, orijinal metalleri doğal bağlanma yerlerinden çıkararak hücrelerin arızalanmasına ve nihayetinde toksisiteye neden olarak bağlanır. Önceki araştırmalar, biyolojik makromoleküllerin oksidatif bozulmasının temel olarak ağır metallerin DNA ve nükleer proteinlere bağlanmasından kaynaklandığını bulmuştur (Flora vd., 2008).



Şekil 1.3 Ağır metal kirliliğinin akış diyagramı

Ağır metaller canlılarda bir takım toksik semptomlarla kendini göstermektedir. Semptomlar genellikle kontaminasyonun ilk göstergeleridir ve bu nedenle kontaminantı tanımlamaya yardımcı olur. Metal zehirlenmesi sonucu ortaya çıkan semptomlar arasında; çocuklarda zihinsel engellilik, yetişkinlerde bunama, merkezi sinir sistemi bozuklukları, böbrek hastalıkları, karaciğer hastalıkları, uykusuzluk, duygusal dengesizlik, depresyon ve görme bozuklukları yer alır. Kısacası, metallere maruz kalma ile ilişkili toksisite, tanınmayan veya uygun olmayan şekilde tedavi edilen, klinik olarak önemli bir tıbbi sorunu temsil eder. Ayrıca morbidite ve mortalite oranlarını artırmada büyük etkiye sahiptir. Evsel, endüstriyel ve tarımsal amaçlarda daha geniş uygulanabilirliğe sahip olmaları nedeniyle, çevrede yaygın olarak dağıtılmaları, insanlar üzerindeki potansiyel sağlık etkileri konusunda ciddi endişeler uyandırmaktadır. Önemli miktarlarda metale ani maruziyetten kaynaklanan toksisite (mesleki maruziyet gibi) tipik olarak birden fazla organ sistemini etkilese de, toksik metallerin sağlık sonuçlarının ciddiyeti, elementin türüne ve şekline, maruziyet yoluna ve süresine daha daha büyük oranda toksisiteye maruz kalan kişinin bireysel duyarlılığına bağlıdır (Jan vd., 2011). Sağlık açısından bakıldığında, metallerin patofizyolojisi esas olarak;

- ✓ Artan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi ile karakterize edilen oksidatif stres oluşumuna,

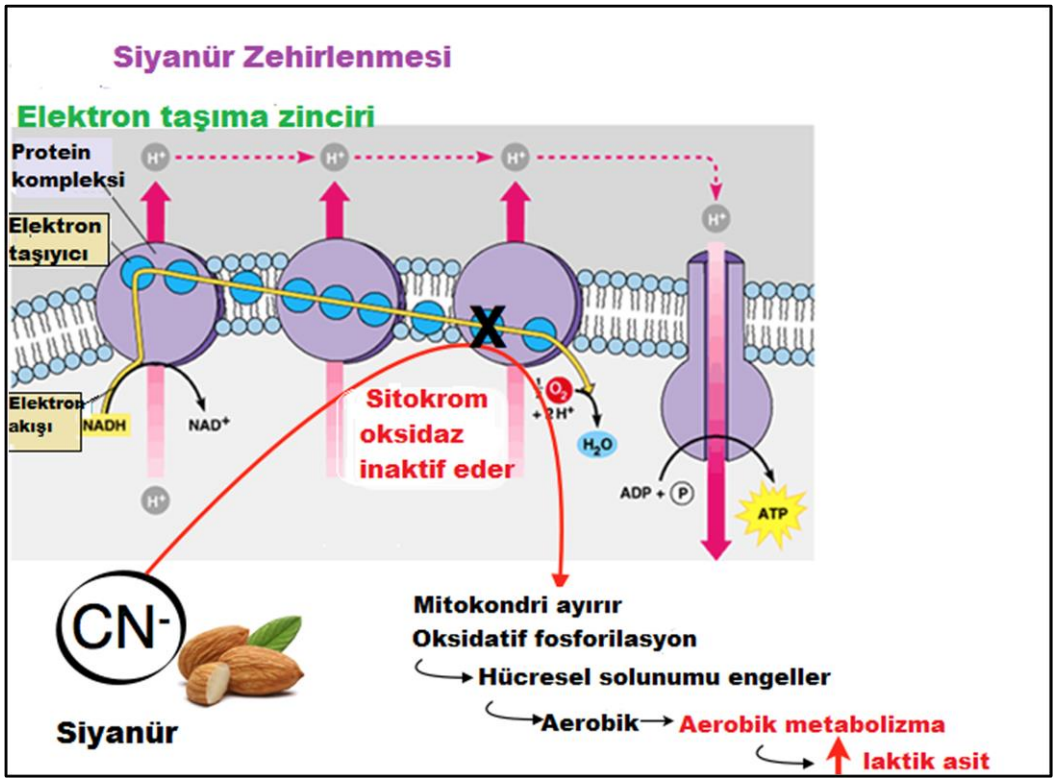
- ✓ Hücre içi antioksidan depolarının ve serbest radikal temizleyicilerin tükenmesine,

- ✓ Reaktif oksijen türlerinin metabolizmasına ve detoksifikasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunan enzimlerin aktivitesinin inhibisyonu veya azalmasına bağlıdır (Jan vd., 2011).

Bu çalışmada düşük maruziyet saviyelerinde bile toksisiteye neden olabilen sistemik toksik maddeler olarak kabul edilen ve tehlikeli maddeler sıralamasında en üst sıralarda yer alan KCN, $CuSO_4$, $K_3Fe(CN)_6$ ve FeClOH tercih edilmiştir.

KCN (potasyum siyanür) oldukça toksiktir ve hidrojen siyanürün sulu bir potasyum hidroksit solüsyonu ile işlenmesi ve ardından solüsyonun vakumda buharlaştırılmasıyla üretilir. 1900'den ve Castner işleminin icadından önce; KCN, alkali metal siyanürlerin en önemli kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu tarihsel süreçte KCN, potasyum ferrosiyanürün ayrıştırılmasıyla üretilmiştir (Sabourin vd., 2016). KCN, mitokondriyal sitokrom c oksidaz üzerinde etkili olan güçlü bir hücresel solunum inhibitörüdür. Bu inhibisyon, oksidatif fosforilasyon yoluyla yüksek enerjili fosfatların (adenozin trifosfat) üretimi için oksijeni kullanamama ile sonuçlanır (Leavesley vd., 2008). KCN, merkezi sinir, kardiyovasküler ve pulmoner sistemler gibi en yüksek enerji talebine sahip organ sistemlerini etkiler (Hawk vd., 2016). KCN; elektro kaplama, metalurji, organik kimyasalların üretimi, plastikler, fotoğraf geliştirme, pestisitler, fümigasyon ve madencilikte faydalı endüstriyel kullanım alanlarına sahiptir (Dzombak vd., 2005). Bu nedenle, yüksek siyanür konsantrasyonu içeren endüstriyel atık, siyanürün istenmeyen şekilde çevreye taşınmasını önlemek için uygun yönetimi gerektirir. Örneğin, altın madenlerinden gelen siyanür atıklarının yanlış yönetimi, çeşitli bölgelerde içme suyu ve gıda zinciri kontaminasyonu yoluyla insan sağlığı riskiyle sonuçlanmıştır (Porgo ve Gokyay, 2017).Sulu bir çözelti içinde KCN, hidratlanmış potasyum (K^+) iyonlarına ve siyanür (CN^-) iyonlarına ayrıştırılır. Siyanür, dünyadaki en zehirli kimyasal

maddelrden biridir. Siyanürün aşırı toksisitesi, diğer elementlerle reaksiyona girmeye hazır olmasından ve dolayısıyla normal biyolojik süreçlere müdahale etmesinden kaynaklanmaktadır (Daya vd., 2000). Siyanürün birincil etki bölgesinin merkezi sinir sistemi olduğu varsayılmaktadır (Okolie ve Audu, 2004). Siyanür, mitokondrinin solunum elektron taşıma zincirindeki mitokondriyal enzim sitokrom oksidazı inhibe ederek (Şekil 1.4), hem oksidatif metabolizmayı hem de ilişkili oksidatif fosforilasyon sürecini bozar (Daya vd., 2000).



Şekil 1.4 Siyanürün toksisite mekanizması

Siyanür güçlü ve hızlı etkili bir boğucudur; normal hemoglobin oksijenasyonu varlığında sitotoksik hipoksiye neden olarak sitokrom oksidazın inaktivasyonu yoluyla doku anoksisine neden olur. Hipoksinin etkisi, merkezi sinir sisteminde solunum durmasına ve ölüme yol açabilen depresyona neden olur (Shwetha ve Hosetti, 2009). İnsanlarda çeşitli nöropatik ve tirotoksik durumlardan düşük seviyelerde siyanüre kronik maruziyetin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Manjunatha vd., 2015).

Siyanür; su, hayvanlar ve insanlar tarafından tüketilen yiyeceklerde bulunabilir (Vetter, 2000). Günlük yaşantımız içerisinde bulunan; sofra tuzunda, manyok, papaya ve fındık gibi 1000'den fazla bitki ve meyve çeşidinde düşük konsantrasyonlarda siyanür bulunmaktadır (Akyıldız vd., 2010). Ayrıca insanlar sigara içilmesi ve endüstriyel dumanın solunması yoluyla da siyanüre maruz kalabilir (Warnakula vd., 2020).

Akut siyanür zehirlenmesi hafiften şiddetliye kadar değişmektedir. Bunlar;

- ✓ *Kısa süreli siyanüre maruz kalma:* Yaygın semptomlar arasında; baş dönmesi, baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, taşipne, taşikardi, huzursuzluk ve halsizlik yer alır.

- ✓ *Uzun süreli siyanüre maruz kalma:* Yaygın semptomlar arasında; nöbetler, bilinç kaybı, konvülsiyonlar, kardiyovasküler kollaps ve pulmoner ödem yer alır ve ölüme neden olabilir (Knoblauch vd., 2020).

Plazma, kan laktat seviyeleri ve buna bağlı kan siyanür konsantrasyonu ile ilişkilidir ve insanlarda akut siyanür intoksikasyonu için belirlenmiş takribi bir vekil ölçüdür (Baud vd., 2002). İnsanlarda normal kan laktat seviyeleri, fiziksel olarak gerilmemiş, sağlıklı bireylerde 0,5 ile 1,5 mmol/L arasında değişir. Yüksek kan laktat seviyeleri, anaerobik egzersiz, çeşitli patofizyolojik nedenler (kalp durması sonrası, bölgesel doku iskemisi, karaciğer yetmezliği ve mitokondriyal hastalık) yanı sıra ilaç ve siyanür gibi toksinlerin alımı dahil olmak üzere çeşitli bir etiyolojiye sahiptir (Knoblauch vd., 2020).

Siyanür sucul ortamda ekolojik risklere yol açabilir çünkü siyanür arıtma atık sularında, ham endüstriyel atık su içinde 0,01 ila 10 mg/L ve atık suda 0,01-0,1 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda sucul ortamda yaygın bir kirletici olarak tespit edilmiştir (Liu vd., 2018). Suda yaşayan organizmaların siyanüre duyarlılığı yüksek oranda türe özgüdür ve ayrıca suyun pH değeri, sıcaklığı ve oksijen içeriğinin yanı sıra organizmanın yaşam evresi ve koşullarından da etkilenir. Balıklar ve suda yaşayan omurgasızlar, siyanüre maruz kalmaya özellikle duyarlıdır (Dube vd., 2013).

Bakır sülfat ($CuSO_4$) en yaygın bakır tuzudur; pestisit olarak tarımsal amaçlı ve deri endüstrisinde kullanılır. Bakır sülfatın ana yükü sırasıyla eritrosit, karaciğer ve ardından böbrek tarafından taşınır ve bu da metanoglobinemi, hepatotoksisite ve böbrek yetmezliğine yol açar (Hashimyousif vd., 2019). $CuSO_4$, yemek borusunda kostik yanıklara, mide ve ince bağırsakta yüzeysel veya derin ülserlere neden olur (Al-Sulimani vd., 2018).

Bakır, hayvan ve bitki dokularında geniş yayılımı olan önemli bir eser elementtir (Hashimyousif vd., 2019). Hayvanlarda; demir metabolizması, kollajen ve elastin sistemi, sayısız metaloproteinaz enzimi ve nonmetalloproteinaz enzimleri için bakır çok önemlidir. Yapılan çalışmalar bakırın etkili bağışıklık tepkisi için gerekli temel eser minerallerden biri olduğu görülmüştür (Harrison vd., 2000). Bakır, çeşitli kayalarda ve minerallerde bulunur. Yaygın kullanımı, kalıcı yapısı, birikme eğilimi ve canlı organizmalara olan toksisitesi nedeniyle araştırmacılar tarafından çok ilgi görmüştür (Johnson vd., 2007).

Bakır; madencilik, çiftçilik ve imalat operasyonları ile ve atık sular yoluyla nehirlere ve göllere salınarak çevreye salınır. Ayrıca bakır; yüzey suyu, yeraltı suyu, deniz suyu ve içme suyunda da bulunur (SRCUS, 2004). Su boruları genellikle bakırdan yapılır ve banyo armatürleri bakır içeren pirinç ve bronz alaşımlarından yapılabilir. İçme suyundaki ana bakır kaynağı, bakırın asitli su nedeniyle borulardan ve banyo armatürlerinden süzülmesinden kaynaklanır (Sloman vd., 2006).

Bakır yönünden zengin besin kaynakları arasında kabuklu deniz ürünleri, sakatatlar, kuruyemişler, fasulye ve kakao bulunur. Bakırın absorbsiyonu, metabolizmaya sağlık açısından etkilerini araştıran çalışmalar, absorbe edilen değerin %24-60 arasında değiştiğini bulmuştur. Emilen miktarı etkileyen faktörler arasında diyetteki bakır miktarı, demir ve çinko gibi gıdalarda bulunan diğer metallerle rekabet yer alır (Mahurpawar, 2015). Bakır artışı ve çinko azalması korelasyonu, metalotiyoninin aracılık ettiği enterositler içindeki çinko ve bakırın rekabetçi absorpsiyon ilişkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Melatiyonin ekspresyonu yüksek diyet çinko içeriği ile yukarı regüle edilir ve melatiyonin, çinkodan daha yüksek afinite ile bakırı bağlar (Igic vd., 2002). Bakıra inhalasyon maruziyetini inceleyen herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. Deri yoluyla emilim miktarı da bilinmemektedir, ancak birkaç çalışma bunun çok düşük olduğunu göstermektedir. Bakırın yararlı etkileri, insanda normal metabolik işlevler için gerekli olan çeşitli enzimlerin bir bileşenidir. Yetişkinler için önerilen günlük bakır miktarı 0,9 mg olarak belirtilmektedir. Bakır eksikliğinin etkileri arasında; anemi, düşük sayıda lökosit, bebeklerde ve çocuklarda osteoporoz ve iskelet sorunlarına yol açan bağ dokusunda bozukluklar yer alabilir (Mahurpawar, 2015).

Bakır toksisitesine maruz kalmanın etkileri iki ana başlık altında değerlendirilebilir:

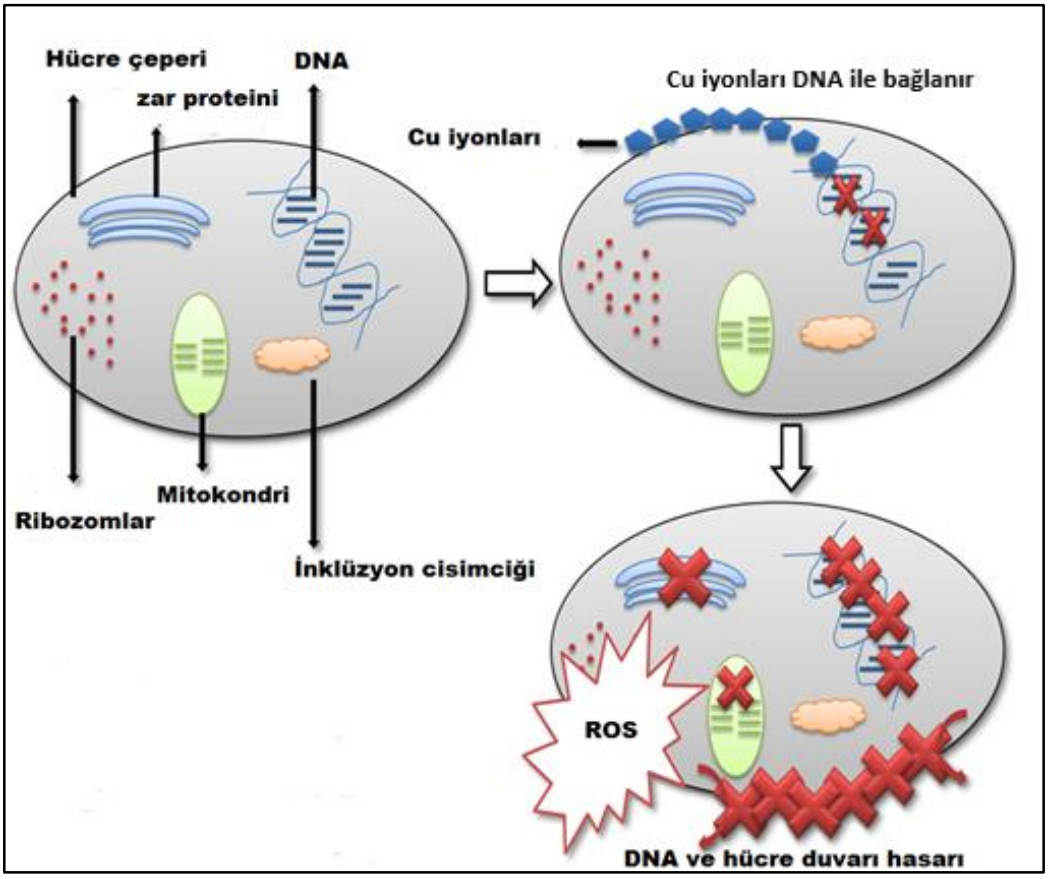
- ✓ *Akut Etkiler:* kısa süreli bakır maruziyeti gastrointestinal belirtilere neden olur. Bakır, diyet bileşenlerine (proteinler, lipitler ve diğerleri) bağlı mideye ulaştığında, mukoza ile etkileşime iyonik bakırdan daha az ulaşılabilir. Çoğu durumda bakır, akut mide bulantısı, kusma ve diyareye neden olur.

- ✓ *Kronik Etkiler:* Memelilerde uzun süreli bakır maruziyeti, vücuttaki bakır depolarını genellikle aşırı diyet bakır seviyelerinden korunacak şekilde düzenlemek için etkili mekanizmalara sahiptir. Yüksek seviyelerde, bakıra maruz kalma karaciğere ve böbreklere zarar verebilir ve ayrıca proflaktik şoka neden olup ölüme sebebiyet verir (Şekil 1.5) (Araya vd., 2007).



Şekil 1.5 Bakır toksisitesinin semptomları

Bakır fazlalığı, hücrelere zararlı olup, protein hasarına ve hücre proliferasyonunun azalmasına yol açar (Zhao vd., 2020). Aşırı miktarlarda varlığı, hücrelerde özellikle DNA hasarı ve lipidlerde yıkıcı etkileri ile iyi bilinen yüksek derecede reaktif oksidatif türlerin (hidroksil radikalleri gibi) oluşumunda rol oynamasına neden olur (Şekil 1.6) (Jan vd., 2015). Pek çok hastalık, hücrelerde bakır birikimi ile ilişkilidir. Ölümle sonuçlanan yeterince yüksek dozlarda karaciğer toksisitesi görülmektedir. Bakıra yüksek düzeyde maruz kalma, kırmızı kan hücrelerinin tahrip olmasına neden olabilir ve muhtemelen anemiye neden olabilir. Wilson hastalığı, bakırın karaciğerde biriktiği kalıtsal (genetik) bir hastalıktır. Karaciğer toksisitesi belirtileri (sarılık, şişlik, ağrı) genellikle ergenlik dönemine kadar görülmez. Bakır, şu anda EPA tarafından D Grubu kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır (Mahurpawar, 2015).



Şekil 1.6 Bakırın hücredeki etkileri

Potasyum ferrisiyanür, $K_3Fe(CN)_6$ formülüne sahip inorganik bir bileşik ve $[Fe(CN)_6]^{3-}$ iyonunun bir potasyum tuzudur. Bakırın molibden cevherlerinden ayrıştırılmasında, kalayın saflaştırılmasında, sitrik asit üretiminde ve fotoğrafçılıkta kullanılmaktadır (Joshi, 2020). Potasyum ferrisiyanür, pigment, hassas malzeme ve

boya yapmak için önemli bir kimyasal malzemedir. Ayrıca ısıl işlem, tabaklama, baskı ve küratöryel çelik endüstride kullanılır. Potasyum ferrisiyanür bitkiler için gübre olarak kullanılabilir (Li vd., 2007). Yol tuzu, sofra tuzu, unlar, kahve ve şeker gibi gıda ürünleri gibi ince parçacıklı katılara, belirli katılarda topaklaşmalarını önlemek için eklenmektedir (Basu vd., 2013).

Potasyum ferrisiyanürün nispeten düşük toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir ancak aşırı potasyum ferrisiyanürün insan vücudu için zararlı olduğu ve ekolojik etkisi belirlenmemiştir. Potasyum ferrisiyanürün sulu çözelti içinde suda yüksek oranda çözünür olduğu bilinmektedir. Potasyum ferrisiyanürden yüksek derecede toksik gaz hidrojen siyanür (HCN) üretilebilir (Hantson vd., 1996). Hidrojen siyanür, siyanürün en toksik şeklidir (Dzombak vd., 2005). HCN, doku hipoksisinden sorumlu kimyasaldır. HCN, hücrelerdeki mitokondriyal elektron taşıma zincirini zehirler ve vücudun oksijenden enerji (adenozin trifosfat-ATP) türetememesine neden olur. Spesifik olarak, sitokrom oksidazın a3 kısmına (kompleks IV) bağlanır ve hücrelerin oksijen kullanmasını önleyerek hızlı ölüme neden olur (Xu vd., 2010). HCN'ye kronik maruz kalma; nörolojik, solunum, kardiyovasküler ve tiroid kusurlarına neden olabilir. Semptomların başlangıcı, maruziyetin dozuna ve süresine bağlıdır (Dhas vd., 2011). HCN akciğerlere veya mideye girdiğinde kan dolaşımına geçer. Bir kısmı daha az zararlı olan ve idrar yolu ile vücudu idrarda bırakan tiyosiyanata (SCN^-) dönüşür. Küçük miktarlarda HCN, nefes alırken akciğerler yoluyla vücudu terk eden karbondioksite dönüştürülür. Düşük seviyelerde maruziyette, HCN ve ürünleri maruz kaldıktan sonraki 24 saat içinde vücudu terk eder (Trana ve Quốca, 2020). Hidrojen siyanüre soluma, oral veya dermal olarak maruz kalınır. HCN, inhalasyon veya oral maruziyetten sonra hızla emilir, ancak dermal maruziyetle daha yavaş emilir.

Soluma maruziyeti, ortam havasından kaynaklanır. İnsanların diyet yoluyla siyanüre maruz kalması; siyanojenik glikozitler, sorgum, badem, keten, bambu filizi, kiraz çekirdeği, filizlenen patates ve manyok içeren birçok gıda mahsulü türü dahil olmak üzere binlerce bitki türünden kaynaklanmaktadır (Ding ve Wang, 2018). Siyanür, bitki hücresi rüptüründen sonra siyanojenik glikozitlerden enzimatik olarak salınabilir (Zelder ve Tivana, 2015). Bu gıda mahsulü türlerinin uygun olmayan işlemlerle tüketilmesi, kronik veya akut siyanür zehirlenmesine neden olarak ve

tüketici için ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Long vd., 2020). HCN, hidrojen siyanür gazının saniyeler içinde ve siyanür tuzunun yutulmasından birkaç dakika sonra hızla ölüme neden olur. İnsanlar için ortalama ölümcül doz olan 1,52 mg/kg siyanür, kasıtlı veya kaza sonucu zehirlenmelerin vaka raporu çalışmalarından hesaplanmıştır. İnsanlarda bildirilen en düşük ölümcül oral doz 0,56 mg/kg siyanür olarak tahmin edilmiştir. Merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve kardiyovasküler sistemler başlıca etkilenen sistemlerdir. Hidrojen siyanür zehirlenmesinin belirti ve semptomları;

- ✓ *Merkezi sinir sitemi:* Baş ağrısı, anksiyete, ajitasyon, kafa karışıklığı, letarji, nöbetler ve koma,

- ✓ *Kardiyovasküler sistem:* Azalmış inotropi, bradikardi, ardından refleks taşikardi, hipotansiyon ve pulmoner ödem,

- ✓ *Diğer:* Akut akciğer hasarı, bulantı ve kusma, kiraz kırmızısı ten rengi,

şeklindedir. Hayatta kalanlar; Parkinson hastalığı, ataksi, optik atrofi ve diğer nörolojik hastalıklardan muzdarip olabilir (Simeonova vd., 2004).

Demir, yer kabuğunda en çok bulunan ikinci geçiş metalidir. Demir, neredeyse tüm canlı organizmaların büyümesi ve hayatta kalması için en önemli unsurdur (Valko vd., 2005). Biyolojik olarak çoğu canlı için en önemli besindir, çünkü birçok hayati protein ve enzim için kofaktördür. Demir aracılı reaksiyonlar, solunum süreçlerinde aerobik organizmaların çoğunu destekler. Düzgün korunmazsa, biyomoleküllere, hücrelere, dokulara ve tüm organizmaya zarar verebilecek radikal oluşumunu içeren reaksiyonları katalize edebilir (Jaishankar vd., 2014).

İnsan vücudunda demir esas olarak proteine (hemoprotein) hem bileşikler (hemoglobin veya miyoglobin), hem enzimler veya hem olmayan bileşikler (flavin-demir enzimleri, transfer ve ferritin) olarak bağlı karmaşık formlarda bulunur. Vücut, oksijen taşıma proteinlerinin sentezi için, özellikle hemoglobin ve miyoglobin, deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi ve hem enzimlerin hem de elektron transferi ve oksidasyon azaltmada rol alan diğer demir içeren enzimlerin oluşumu için demire

ihtiyaç duyar (Abbaspour vd., 2014). Demir, ferro (Fe^{2+}) ve ferri (Fe^{3+}) iyonları arasındaki dönüşümden dolayı çeşitli biyolojik redoks işlemleri için çekici bir geçiş metalidir (Phippen vd., 2008). Vücut demirinin neredeyse üçte ikisi dolaşımdaki eritrositlerde bulunan hemoglobinde bulunur. Kalan kısmı kas dokusunda ve oksidatif metabolizma ve diğer birçok hücre fonksiyonunda rol alan çeşitli enzimlerde miyoglobine bağlanır (Abbaspour vd., 2014).

Yüzey suyundaki demir kaynağı antropojeniktir ve madencilik faaliyetleriyle ilgilidir. Kömür damarlarında yaygın olan demir piritlerin (FeS_2) oksidasyonu nedeniyle sülfürik asit üretimi ve demir (Fe^{2+}) deşarjı gerçekleşir (Valko vd., 2005).

Hemoglobin olmayan demir, gıda olarak bakliyatlar, tahıllar, meyveler, baklagiller ve yeşil sebzelerden elde edilirken, ana hemoglobin kaynağı olan demir balık, kırmızı et ve yumurtadan elde edilen hemoglobin ve miyoglobindir (Parmanand, 2019). Toplam demir alımının kabaca %15-35'ini temsil eden hemoglobin demiri emilimi ile karşılaştırıldığında, hemoglobin olmayan demir emilimi, toplam demir alımının %2-20'si arasında önemli ölçüde daha düşüktür (Hurrell & Egli, 2010). Hemoglobin demiri globin ile tamamlandığından, emilimi diğer diyet faktörlerinden büyük ölçüde etkilenmezken, hemoglobin olmayan demir diğer gıda bileşenlerinin varlığından büyük ölçüde etkilenir (Hurrell, 1997). Düşük biyoyararlanımına rağmen, hemoglobin olmayan demir seviyeleri çoğu öğünde hemoglobin demirinkinden çok daha yüksektir ve bu nedenle genel olarak hemoglobin olmayan demir, demir beslenmesinde hemoglobin demire kıyasla daha büyük bir rol oynar (Parmanand, 2019). Günlük minimum demir gereksinimi tahminleri yaşa, cinsiyete, fizyolojik duruma ve demirin biyoyararlanımına bağlıdır ve yaklaşık 10 ila 50 mg/gün arasında değişir. Ortalama ölümcül demir dozu 200-250 mg/kg vücut ağırlığıdır, ancak 40 mg/kg vücut ağırlığı kadar düşük dozların alınmasını takiben ölüm meydana gelmiştir (WHO, 2003). Demir zehirlenmesi her zaman esas olarak çocuk doktorlarının ilgisini çeken bir konu olmuştur. Çocuklar maksimum düzeyde demir içeren ürünlere maruz kaldıklarından demir zehirlenmesine karşı oldukça hassastır (Albretsen, 2006). Demir toksisitesinin klinik seyri beş aşamaya ayrılmıştır. Aşamadan aşamaya ilerleme çok hızlı olabilir ve her hasta her aşamadan geçmeyebilir.

- ✓ *İlk aşama (0,5 ila 6 saat):* Hasta esas olarak karın ağrısı, kusma, ishal, hematemez ve hematokezi gibi gastrointestinal semptomlar sergiler.

- ✓ *İkinci aşama (6 ila 24 saat):* Hastanın gastrointestinal semptomları toksik miktarlarda demir emilimine rağmen düzelebileceğinden, belirgin bir iyileşme aşamasını temsil eder.

- ✓ *Üçüncü aşama (6 ila 72 saat):* Gastrointestinal semptomlarının tekrarlaması, şok ve metabolik asidoz ile karakterizedir. Demire bağlı koagülopati, hepatik disfonksiyon, kardiyomiyopati ve böbrek yetmezliği de bu aşamada görülür.

- ✓ *Dördüncü aşama (12 ila 96 saat):* Aminotransferaz seviyelerinin yükselmesi ve karaciğer yetmezliğine olası ilerleme ile karakterizedir.

- ✓ *Beşinci aşama (2 ila 8 hafta):* Pilorik veya proksimal bağırsak skar ve tıkanıklığı dahil olmak üzere yaralanan gastrointestinal mukozanın iyileşmesinin sonuçlarını temsil eder.

Tablo 1.1 Demir toksisitesinin aşamaları

Aşama	Kilinik Etki	Zaman
I AŞAMA	Gastrointestinal semptomlar	30 dk- 6 s
II AŞAMA (Latent)	Gastrointestinal semptomların düzelmesi	6-24 s
III AŞAMA (Şok ve metabolik asidoz)	✓ Metabolik asidoz ✓ Dehidrasyon ✓ Laktik asidoz	6-72 s
IV AŞAMA Hepatotoksisite/Hepatik nekroz	Fulminan karaciğer yetmezliği	12-96 s
V AŞAMA (Bağırsak tıkanması)	Gastrointestinal mukoza iyileşmesi yara izine yol açar	2-8 hafta

Bir hasta beş aşamadan herhangi birinde gelebilir veya atlayabilir. Demir toksisite aşamasının belirlenmesi, maruziyet zamanına değil semptomlara ve klinik belirtilere dayanmalıdır. Aşırı demir alımı, gelişmiş ve et tüketen ülkelerde ciddi bir sorundur

ve kanser riskini artırır. Neredeyse %30 demir içeren asbeste yüksek oranda maruz kalan işçiler, akciğer kanserinin en önemli ikinci nedeni olan asbestoz riski yüksektir (Jaishankar vd., 2014). Gevşek hücre içi demir de DNA hasarını artırabilir. Demir, esas olarak DNA moleküllerinin oksidasyonu süreciyle kanseri başlatabilir (Bhasin vd., 2002).

Demir sülfat, demir sülfat monohidrat ve demir sülfat heptahidrat gibi demir tuzlarına maruziyet oral, dermal ve inhalasyon yoluyla olduğunda düşük akut toksisiteye sahiptir ve bu nedenle toksisite kategorisi 3'e yerleştirilmiştir (Ryan ve Aust, 1992). Normal ve patolojik hücre işlenmesi sırasında, serbest radikal olarak kabul edilen süperoksit ve hidrojen peroksit gibi yan ürünler oluşur (Fine, 2000). Bu serbest radikaller aslında süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler tarafından nötralize edilir, ancak süperoksit molekülü ferritinden demiri salma kabiliyetine sahiptir ve serbest demir, gittikçe daha fazla süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek oldukça toksik serbest radikaller oluşturur. Hidroksil radikalleri, belirli enzimleri inaktive edebildikleri, lipid peroksidasyonunu başlatabildikleri, polisakkaritleri depolimerize edebildikleri ve DNA ipliği kırılmalarına neden olabildikleri için tehlikelidir. Bu bazen hücre ölümüne neden olabilir (Jaishankar vd., 2014).

Patojenik bakteriler, hastalığa neden olabilen bakterilerdir, ancak çoğu bakteri zararsızdır veya çoğu zaman yararlıdır, bazıları patojeniktir ve insanlarda bulaşıcı hastalıklara neden olduğu görülen tür sayısı yüzden az olduğu tahmin edilmektedir. Bazı patojenik bakteriler, bir kesik yoluyla deriye girme, cinsel aktivite veya riskli bir bağışıklık işlevi gibi belirli koşullar altında hastalığa neden olur (Ray ve Ryan, 2010). Bazı bakteriler ise zoonotik özellikte olup bazılar hem balıklarda hem insanlarda hastalıklara neden olabilmekte, balık tesislerinin ve balıkların mikrofloralarından izole edilebilmektedirler (Alkhunni vd., 2017).

Staphylococcus aureus, "altın stafil" olarak bilinen, fakültatif anaerobik, Gram pozitif koktur ve mikroskopla bakıldığında üzüm benzeri kümeler olarak görünen ve büyük, yuvarlak, altın sarısı kolonilere sahip olan staphylococcus enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Kanlı agar plakalarında büyütüldüğünde sıklıkla hemoliz pozitif

olarak üremektedir (Ryan ve Ray, 2004). *S. aureus* katalaz pozitiftir (yani enzim katalaz üretebilir), bu nedenle hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya ve oksijene dönüştürebilir, bu da katalaz testini stafilokokları Enterokok ve Streptokoklardan ayırmada faydalanılır. *S. aureus* bakterisinin bazıları, koagülaz testi ile diğer birçok stafilokoktan ayırt edilebilir ve pıhtı oluşumuna neden olan pıhtılaşma pozitiftir (yani enzim koagülazı üretebilir), oysa diğer Staphylococcus türlerinin çoğu koagülaz negatiftir. Deride kolonize olması ve açık ciltle temas etmesi nedeniyle yara enfeksiyonlarında önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. Bu bakteriler, hücre dışı toksinler ve enzimler üretme yetenekleri yoluyla yara dokularında hasara neden olabilir (Matthews vd., 1997). *S. aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonuna, selülite, uzun kemik osteomiyelitine ve mandibular osteomiyelit genellikle neden olur (Kokaz, 2015). *S. aureus*, bir veya daha fazla çeşitli antimikrobiyal direnç tipine sahip olabilir. Bir S. aureus suşu ile bireyleri başka bir suştan koruma aracı olarak doğrudan enfekte etme kavramı nihayet terk edilmişken, farklı *S. aureus* suşlarının rekabet ettiği aynı niş içinde kurulmuştur. Böylece metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) kuramı ortaya çıkmıştır (Regev-Yochay, 2019).

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), tüm β-laktamlara (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar) dirençli kabul edilir. Benzer şekilde, metisilin gibi yeni antimikrobiyallerin piyasaya sürülmesinden sonra, MRSA gelişmesi çok uzun sürmemiştir. Metisilin direnci, değiştirilmiş bir penisilin bağlayıcı proteinin üretimini kodlayan mecA geni tarafından sağlanır. Tüm β-laktam antimikrobiyaller (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler) için düşük afiniteye sahip olan (PBP2a veya PBP2'), stafilokokları bu büyük ve kritik antimikrobiyal sınıfa dirençli hale getirir. Sıklıkla, MRSA izolatları diğer antimikrobiyal sınıflara da dirençlidir ve daha fazla tedavi seçenekleri kısıtlıdır (Weese, 2010). MRSA suşlarının prevalansı sağlık bakım tesislerinde giderek arttığından, toplumla ilişkili enfeksiyonlar dünyanın birçok yerinde giderek artan şekilde endemik hale gelmiştir (Rehm ve Tice, 2010). Genel olarak dünya nüfusunun yaklaşık %30'u burun deliklerinde veya ciltlerinde *S. aureus* taşır. Akut bakım ortamında MRSA taşıma prevalansı %1-12 arasında tahmin edilmekte olup bu durum coğrafi olarak değişmektedir. MRSA ile kolonizasyon, invazif hastalık için bir risk faktörüdür;

bununla birlikte enfeksiyon, önceden kolonizasyon olmadan meydana da gelebilir. Sağlık bakımı ile ilişkili MRSA enfeksiyonları için diğer risk faktörleri arasında, her ikisi de nakil alıcıları arasında yaygın olan uzun süreli hastanede kalma ve antibiyotiklere maruz kalma yer alır (Bert vd., 2000). Sağlıkla ilişkili enfeksiyonların çoğu, kalıcı kateterler gibi invaziv prosedürlerden veya cihazlardan kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2000). Hemodiyaliz ve periton diyalizi, böbrek nakli adaylarında veya alıcılarında MRSA enfeksiyonu için risk faktörleridir. Karaciğer allogreft alan MRSA kolonizasyonu olan karaciğer transplant adayları arasında, transplant sonrası MRSA enfeksiyonu riski artmaktadır (Campos vd., 2008). MRSA, köpekler, kediler, tavşanlar, atlar, sığırlar, domuzlar ve kümes hayvanları da dahil olmak üzere çok çeşitli hayvan türlerinde mevcuttur (Weese, 2010). Çiftlikler dışında insandan insana bulaşma da zoonotik potansiyeli nedeniyle, yani insanlarda zoonotik enfeksiyonlara neden olma kapasitesi nedeniyle rapor edilmiştir (Cuny vd., 2009). Cerrahi alan enfeksiyonları, cerrahi kesiğin etrafında ilerleyici ödem, kızarıklık ve ağrı ile kendini gösterir. MRSA, karaciğer nakli alıcılarında cerrahi alan enfeksiyonlarının %15'inde ve böbrek nakli alıcılarında cerrahi alan enfeksiyonlarının %5'inde nedensel ajan olarak tanımlanmıştır (Asensio vd., 2008; Ramos vd., 2008). MRSA'ya bağlı toplum kökenli pnömoni, özellikle öncül influenza enfeksiyonu ile artan şekilde rapor edilmektedir. Hastanede yatan hastalar arasında *S. aureus*, nozokomiyal ve ventilatörle ilişkili pnömoninin yaygın bir nedenidir. Klinik olarak stafilokokal pnömoni, bakteriyel pnömoninin diğer nedenlerinden ayırt edilemeyebilir, ancak hızlı ilerleme ve akciğer nekrozu ve kavitasyona neden olma eğilimindedir. Komplikasyonlar arasında akciğer apsesi oluşumu ve plevral ampiyemi sayılabilir (Campos vd., 2008). MRSA, sağlıkla ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen nedenidir. Genellikle bu enfeksiyonlar bir intravasküler kateter ile ilişkilidir. Ateş veya sistemik bir enfeksiyonun diğer belirtileri, bağışıklığı baskılanmış konakçıda belirgin olmayabilir. *S. aureus* için pozitif olan tek bir kan kültürü bile antimikrobiyal tedavinin başlatılmasına gerektirir. Kan dolaşımı enfeksiyonları, enfeksiyon metastazı ile komplike hale gelebilir. Kalıcı bakteremi, bir endovasküler enfeksiyon şüphesini (örneğin, endokardit) artırmaktadır (Park vd., 2012). Ayrıca tamponlama ile komplike hale gelen pürülan MRSA perikarditi, bir karaciğer nakli alıcısında tanımlanmıştır (Durão vd., 2008). Akut osteomiyelit genellikle hematojen tohumlamanın bir sonucudur ve

S. aureus baskın patojendir. Semptomlar ateş ve yerel ağrıyı içerir ve transplantasyon hastalarında görülmüştür (Nicholls vd., 1980).

Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) bakteriyemi, insanların yaklaşık %20-30'u taşıyıcı olmasıyla toplumda oldukça yaygındır. Taşıyıcı bölge genellikle cilt, farinks, gastrointestinal sistem ve nazal boşluklardır (Perkins vd., 2018). MSSA'nın neden olduğu enfeksiyonlar MRSA'dan çok daha fazla ve sıktır (Becker vd., 2017). Son araştırmalar, MRSA insidansının 2000'lerin sonlarından beri azaldığını, MSSA enfeksiyonlarının arttığını veya en azından sabit kaldığını bildirmektedir (Chen vd., 2019). Bazı çalışmalar, MRSA kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastaların, MSSA kan dolaşımı enfeksiyonu olan hastalara göre önemli ölçüde daha yüksek mortalite riski altında olduğunu göstermiştir. MRSA bakteremisi geliştiren hastalarda ölüm oranlarının %23-54 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Bennett ve Sharp, 2008). MSSA epidemiyolojisi, metisilin direncini kodlayan stafilokokal kaset kromozomunun alınmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, *S. aureus* suşlarının hastane veya toplum ortamına iyi adapte olmuş ve önemli halk sağlığı endişeleri oluşturan genetik özellikleri vardır (Havaei vd., 2011). MSSA bakteriyemi, %23,3 oranında yüksek bir ölüm insidansına sahiptir (Cosgrove vd., 2003) ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, toksik şok sendromu, endokardit ve osteomiyelit gibi hastalıklara sebep olmaktadır.

Stafilokok grubunun üyeleri olan koagülaz negatif stafilokoklar (CoNS), 45'ten fazla tanınan koagülaz negatif stafilokok (CoNS) türü vardır. CoNS, gram pozitif koklardır ve düzensiz "üzüm benzeri" kümelere bölünen, pıhtılaşan ve tavşan plazması üretememeleri nedeniyle *S. aureus*'tan farklılaşan gram pozitif koklardır ve spor oluşturmazlar, koagülaz negatif olan bu stafilokoklar insanlarda çeşitli enfeksiyonların nedenidir (Crossley vd., 2009). CoNS enfeksiyonlarına yatkınlık oluşturan konakçı faktörler arasında immünosupresyon ve tıbbi bir cihazlar yer almaktadır. Bu koşullardan herhangi biri altında, bu tür enfeksiyonlara herkez maruz kalabilir (Hovelius ve Mårdh, 1984). Ayrıca immünosupresyon veya bir tıbbi cihaz dışında belirli enfeksiyonlarla ilişkili olan bazı koagülaz negatif stafilokok türleri de vardır (Tristan vd., 2006). *Staphylococcus epidermidis* memelilerin deri ve mukoza zarlarını kolonize eden ve en yaygın stafilokok türlerinden olan kommensal bir

bakteridir. Epidemiyolojik çalışmalar, sağlıklı insanların herhangi bir zamanda 10-24 farklı *S. epidermidis* suşu taşıdığını göstermiştir (Fey ve Olson, 2010). *S. epidermidis*, biyofilm oluşturma ve biyomalzemeleri kolonize etme kabiliyetindedir. Biyofilm, tipik olarak polisakkaritlerin, proteinin ve nükleik asidin hücre dışı bir matrisinde bulunan tek hücreli organizmaların karmaşık bir etkileşimi olarak tanımlanır. *S. epidermidis* biyofilmi, antibiyotiklerin zararlı etkisine karşı koyar ve konakçı immün tepkisini engeller (Gill vd., 2005). Klinik hastalıkla ilişkili koagülaz-negatif stafilokokların çoğu, deri ve mukoza zarlarının ortak sakinleridir. *S. epidermidis*, derideki tüm koagülaz negatif Stafilokokların yaklaşık %60-70'ini oluşturan en yaygın türdür. Koagülaz negatif stafilokoklar sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkilidir, bakteriyeminin mevcut olduğunda %41'i ve bunların çoğu çizik enfeksiyonlarıdır (Favre vd., 2005). Zaman içerisinde koagülaz negatif stafilokoklara bağlı bakteriyeminin tedavisi de gelişmiştir. Neredeyse tüm nozokomiyal bakteremiler oksasiline dirençli suşlara bağlı olduğundan, vankomisin tedavinin temel taşı olmuştur (Sakoulas vd., 2007). Koagülaz negatif stafilokoklar konakçı kapak endokarditine neden olabilmesine rağmen, çoğunlukla protez kapak endokarditi veya kalp pili enfeksiyonları ile ilişkilidir (Lalani vd., 2006). Ventriküloperitoneal ve ventriküloatriyal şant enfeksiyonları, koagülaz negatif stafilokoklara atfedilebilen en yaygın merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarıdır (Levitz ve Quintiliani, 1984). Koagülaz negatif stafilokoklar, endoftalminin en yaygın nedenidir (Fass vd., 1986). Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonuna atfedilebilen en yaygın iki osteomiyelit formu, kardiyotorasik cerrahiyi takiben sternal osteomiyelit ve protez eklemi çevreleyen kemik enfeksiyonudur (Chandrasekar ve Brown, 1994). Vasküler greft enfeksiyonlarının insidansı yaklaşık %1,5'tir ve koagülaz negatif stafilokoklar vakaların %15-40'ını oluşturmaktadır (Etienne vd., 1990).

Acinetobacter baumannii, Gram negatif, glukoz fermentatif olmayan kokobasil bakteridir (Lambiase vd., 2012). *Acinetobacter baumannii*, tamamen aerobik, katalaz pozitif, oksidaz negatif, fermente olmayan ve hareketsiz olan uzun pleomorfik kokobasillerde farklı çiftler veya uzun zincirler halinde bulunur (Jung ve Park, 2015).. Acinetobacter, koyun kanlı agar ve triptik soya agarı gibi yaygın olarak tanı amaçlı kullanılan katı ortamda 37 °C'de grimsi beyaz, pürüzsüz, mukoid koloniler

üretir (Peleg vd., 2008). Bu bakterinin enfeksiyon nedeninin patogenezi için çok sayıda bakteriyel zararlı bileşen gereklidir, bunlar birkaç hücre dışı protein, jelatin hidrolizi, kapsül, bakteriyel fosfolipazlar, penisilin bağlayıcı protein, asimilat demir ve biyofilm oluşumunu içerir (Awayid vd., 2017). Acinetobacter grubu bakteriler, düşük zararlı bakteriler olarak kabul edilir (Almasaudi, 2018). Zararlı bileşenler; hidrofobik, zarın ekso proteini, zehirli ince poli şeker ve verotoksinlerdir. Acinetobacter türleri hücre yüzeyine hidrofobik olduğu, bakteriyel yapıştırıcıda rol oynadığı ve makrofaj tarafından öldürülen bakterilerin önlenmesine yardımcı olabileceği kanıtlanmıştır (Doughari vd., 2009). *A. baumannii*, hücre dışı enzimler, sitotoksinler ve salgılanan vasküler geçirgenlik gibi patogenezde önemli bir görevi olan ve özellikle solunum yolu enfeksiyonunda insan dokularına zarar veren birçok faktör üretir (Tomaras vd., 2008). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), *A. baumannii* bakterisini insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturan ve acil olarak yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulan kritik bir öncelikli patojen olarak tanımlamaktadır (Moubareck ve Halat, 2020). *A. baumannii* ile enfeksiyonların çoğu, diğerlerinin yanı sıra idrar ve solunum yolu, periton boşluğunda görülür ve kalıcı cihazlarla bağlantılıdır (Esaa vd., 2016). *A. baumannii*, hastane ortamında taşınmaya yardımcı olan az miktarda besin ile birkaç nemli nesne üzerinde canlı kalabilir. Bakteriler hastane araçlarında toplanabilir ve bu araçlar salgınlara neden olmak için uzun süre taşıyıcı görevi görür (Almasaudi, 2018). Nemli ortamda antimikrobiyal ilaçlara, dezenfektanlara, kuruma ve beslenme açlığına karşı dirençleri dahil olmak üzere hastane ortamında *A. baumannii* bakterisinin hayatta kalmasına katkıda bulunan birkaç ana faktör vardır (Obeidat vd., 2014). *Acinetobacter* türlerinin çoğu, diğer Gram-negatif bakterilerden çok büyük bir süre küçük nemli bir alanda kalır ve 5 aydan fazla yaşayabilir. *Acinetobacter baumannii*, laboratuar inkübasyonla çoğaltılırken diğer yerlerde yirmi yıl boyunca aktif kalabilir ve hem nemli hem de kuru yüzeylerde yaşayabilir. Bu yetenek, bakterileri enfeksiyonları yaymak için sağlıklı yerlerde yaşayabilir hale getirir. Bu bakteri hastane personeli ile yayılım gösterebilmektedir (Lee vd., 2011; Almasaudi, 2018). Epidemiyolojik araştırmalar, hastanelerde ve doktorlarda çalışanlarda üst ekstremite taşıma oranının %4-22 arasında olduğunu ve yaralı cilt durumu dışında genellikle geçici olduğunu göstermiştir (Townsend vd., 2015). Avrupa'da yapılan bir çalışmada, yatak çarşafının hastalığa neden olan kontaminasyon kaynağı olarak iki *Acinetobacter* suşu

olduğu görülmüştür (Weernink vd., 1995). Ayrıca, nemli pedler yaralanmanın taşıyıcısı olarak işaretlenmiş ve yoğun bakım ünitesine kaydedilmiştir (Ebringer, 2015). *A. baumannii* bakterisinin neden olduğu ventilatörle ilişkili pnömoni, kritik hastalarda yüksek ölüm oranının önde gelen nedenidir (Jaruratanasirikul vd., 2019). *A. baumannii*, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde ventilatörle ilişkili pnömoninin %8-14'ünü oluşturur, ancak bu patojen Asya, Latin Amerika ve bazı Orta Doğu ülkelerinde %19->% 50 oranına sahiptir (Lynch vd., 2017). Son araştırmalar, *A. baumannii* ventilatörle ilişkili pnömonide bulaşma insidansının 315,4 vaka/1000 hasta günü olduğunu ve ölüm oranının ise %52-66 arasında değiştiğini göstermiştir (Huang vd., 2019). *A. baumannii*, intravenöz kateter veya sık bir enfeksiyon kaynağı olan solunum yolu ile sağlık hizmeti ortamlarında kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen bir nedeni haline gelmiştir. A. baumannii baktersinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları nedeniyle ölüm oranı %40 civarına yükselmiştir (Wisplinghoff vd., 2012). *A. baumannii* ciddi yanık, yara veya travması olan hastalarda deri ve yumuşak dokudan tekrar tekrar izole edilmiş ve hastalık yapabildiği görülmüştür (Moubareck ve Halat, 2020). *A. baumannii* enfeksiyonları üzerine yapılan araştırmalar esas olarak pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına odaklanmış olsa da, beş *A. baumannii* suşundan birinin üriner bölgelerden izole edildiği görülmüştür (Venanzio vd., 2019). *A. baumannii*, özellikle kalıcı üriner kateterlerde bazen idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Dijkshoorn vd., 2007). *A. baumannii*'ye bağlı nozokomiyal menenjit, özellikle kalıcı ventrikülostomi tüpleri veya serebrospinal fistül kullanan ve ameliyat sonrası antimikrobiyal tedavi gören hastalarda %70'e yaklaşan mortalite ile yoğun bakım nöroşirürji ünitelerinde artan bir tehdit olmaya devam etmektedir (Siegman-Igra vd., 1993).

Pseudomonas aeruginosa, ikincil metabolit üretme kabiliyetine sahip mikroorganizmalardan biridir. Gram negatif, hareketli, aerobik, çubuklar ve sporlardır, ortalama 0,5-0,8 μm uzunluktadır. Genellikle bir ucunda bir veya nadiren daha fazla flagella bulunur ve çok hareketlidirler (Al-Ani vd., 2020). *P. aeruginosa* doğada, toprakta, suda, canlılarda ve dolayısıyla balıklarda yaygındır, beslenme gereksinimi çok basittir (Vahaboğlu ve Akhan, 2002; Alkhunni vd., 2017; Emhemed vd., 2017; Gültepe vd., 2018). Çoğu izolat, kanlı agar üzerinde beta hemoliz gerçekleştirir ve tipik yeşil metalik parlaklık üretir. *Pseudomonas* cinsi, fenazin adı

verilen renkli ikincil metabolitlerin üretimi ile dikkat çekmektedir. *P. aeruginosa* suşlarının yaklaşık %90-95'i, etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olan belirli organizmalarla ilişkili ana fenazin pigmenti olan piyosiyanini üretir (Chakraborty, 2005). Piyosiyanin, redoks-aktif özelliklere sahip fenazin grubuna ait düşük moleküler ağırlıklı, azot içeren heterosiklik bileşiklerin mavi-yeşilimsi bir pigmentidir (Parsons vd., 2007). *P. aeruginosa*, 24-48 saatlik inkübasyondan sonra yeniden üretilebilir ve izole edilebilir (Pollack, 1998). *P. aeruginosa*'nın oksidaz, sitrat ve L-arginin dihidrolaz aktivitesi pozitiftir. Karbonhidratları fermente etmezler. Glikoz ve ksiloz gibi şekerler üzerinde oksidatif etkiye sahipken maltoz ve laktozu etkilemezler (Koneman vd., 1997). L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz aktivitesi negatiftir. Nitrattan gaz üretirler. Bununla birlikte, H_2S ve eskülin negatiftir. *P. aeruginosa*'nın önemli bir metaboliti olan 2-aminoasetofenon bileşiğinin biyolojik önemi henüz bilinmemekle birlikte kültürlerde *P. aeruginosa*'ya özgü tatlı üzüm benzeri bir kokuya neden olmaktadır (Scott-Thomas vd., 2010). *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri arasında; pigment, hemolizinler, eEkzotoksin eksoenzim S gibi yapılar, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adezinleri ve aljinat sayılabilir. Virülans faktörleri, bakterinin konağa yerleşmesine ve konağın hücrelerine zarar vermesine yardımcı olur (May vd., 1991). *P. aeruginosa*, özellikle insan ve hayvan atıklarıyla organik kirlenmiş, materyalleri, su yüzeylerini, toprağı ve bitkileri içeren sıcak nemli yerlerde yaygın olarak bulunur (Kiska vd., 1999) ve onun farklı fiziksel koşullara ve birçok antibiyotiğe ve dezenfektana dirençli olması ona etkili bir fırsatçı patojen özelliği kazandırır (Turgut vd., 2002). *P. aeruginosa* yaygın değildir, ancak sağlıklı insanların normal florasında da bulunur. Doğada olduğu gibi vücudun nemli bölgelerinde kolonileşme eğilimindedir. Kolonizasyon oranı; dışkıda diyetten etkilenmesine rağmen deride %0-2, burun mukozasında %0-3,3, boğaz mukozasında %0-6,6 ve %2,6-24'dür. Hastanedeki kolonizasyon oranı %50'ye kadar çıkmaktadır (Pollack, 1995). Son yıllarda hastane ortamında *Pseudomonas* enfeksiyonları artmaktadır (Tuncer ve Akova, 1997). *Pseudomonas aeroginosa* hastane enfeksiyonlarının %8-25'inden sorumludur. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde ve nötropeni hastalarının bulunduğu hizmetlerde daha yaygındır (Usluer, 2002). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu pnömoninin klasik özelliği, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ortaya çıkması ve akciğerlerde kanama ve nekroza neden olmasıdır. Toplum kökenli *P. aeruginosa* pnömonisinde enfeksiyon kaynağı, üst

solunum yolunda kolonileşen bakterilerdir. Özellikle kistik fibrozlu hastalar ve kronik akciğer hastalığı olanlar ciddi risk altındadır. Hastane kaynaklı pnömoni, bir nebülizör veya mekanik ventilatör kullanımı ile ilişkilidir. Kronik akciğer hastalığı olan hastalarda daha önce kolonizasyon, hastane kaynaklı pnömoniye neden olabilir. Ek olarak, bronkoskopların kontaminasyonu ile ilişkili salgınlar da rapor edilmiştir. Kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde meydana gelen fizyopatolojik değişiklikler, burada *P. aeruginosa* kolonizasyonuna zemin hazırlamaktadır. Bu hastalarda tekrarlayan ve kalıcı akciğer enfeksiyonlarına neden olur (Stapper vd., 2004). *P. aeruginosa* bakterisinin neden olduğu bakteriyemi, hastanede yatan hastalarda, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda görülür. Son yıllarda ölümlerde artış gözlendi. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda, mekanik ventilasyon desteği alanlarda, akut solunum yetmezliği olanlarda, santral venöz kateter bulunan hastalarda ve solunum yolunun kaynağı bakteriyemi olan hastalarda ölüm oranlarında artış gözlenmektedir (Lin ve Chen, 2006). Kateterizasyon, *P. aeruginosa*'ya bağlı idrar yolu enfeksiyonlarının en sık nedenidir. Diğer hazırlayıcı faktörler arasında ameliyat, anatomik kusur, tıkanma ve vezikoüreteral reflü, diabet gibi metabolik bozukluklar, organ nakli ve baskılanmış bağışıklık tepkisi olan hastalar yer alır. *P. aeruginosa* bakteriyemileri %40 gibi yüksek bir oranda üriner sistemden kaynaklanır ve başka bir birincil odaktan gelen bakteriyemi ile idrar yolu enfeksiyonu gelişebilir (Mittal vd., 2009). Penetran travma sonrası veya kontamine damlaların yerleştirilmesi ile göze yabancı cisim konjunktivit, keratit, dakriyosistit, blefarit ve panoftalmi gibi göz enfeksiyonları ve bazen de görme kaybı ile gelişebilir. Bunlar endoftalmiye neden olabilen enfeksiyonlardır. Kontamine kozmetik ürünler, kontakt lensler ve lens solüsyonları sağlıklı bir gözde bile bu tür enfeksiyonlara neden olabilir ve yenidoğanlarda damlacık enfeksiyonları bu şekilde sonuçlanabilir. *P. aeruginosa* bakterisinin neden olduğu kornea enfeksiyonu, körlük ve görme bozukluğunun önemli bir nedenidir (Sun vd., 2012). *P. aeruginosa*, kanserli hastalarda *Listeria monocytogenes* kanserinden sonra menenjitin ikinci en sık nedeni ve *Escherichia coli*'den sonra beyin apsesinin ikinci en yaygın nedeni olarak bildirilmektedir. Farklı şekillerde enfeksiyona neden olabilir. Birincisi kafa travması, ameliyat, invazif teşhis prosedürleri ve subaraknoid boşluğa veya beyne doğrudan aşılamadır. Diğeri kulak, mastoid veya paranazal sinüs gibi komşu kaynaklar yoluyla veya üriner sistem, endokardiyum ve akciğer gibi uzak bir kaynaktan bakteriyemi

sırasında yayılabilir. Pseudomonal menenjit, yüksek ölüm oranlarına sahip olduğu için önemlidir (Juhi vd., 2009). *P. aeruginosa*, akut yaygın otitis eksternal veya yüzücü kulağı olarak adlandırılan hastalığın en önemli patojenidir. *P. aeruginosa* dış kulak kanalının normal florasında nadir olarak bulunur. Yaralanma, maserasyon, iltihaplanma veya sabit nem, dış kulak iltihabı adı verilen kendiliğinden iyileşme tablosuna neden olabilir. Özellikle diabet hastalarında gelişen ve hayatı tehdit etme potansiyeli olan kötü huylu dış kulak iltihabının en yaygın nedenidir. *P. aeruginosa* ayrıca kronik bir orta kulak iltihabının amilidir (Liu vd., 2012).

Escherichia coli tipik olarak Gram negatif, çubuk şeklinde (2,0-6,0 mm uzunluğunda ve 1,1-1,5 mm genişliğinde basil) uçları yuvarlatılmış bakterilerdir. Bununla birlikte, bu bakterilerin gerçek şekli küresel (cocci) hücrelerden uzun veya ipliksi çubuklara kadar değişir. *Escherichia coli* spor oluşturmaz ve genellikle peritrichous flagellanın etkisiyle hareketlidir. *Escherichia coli* fakültatif anaerobiktir ve 37-44 ºC'de laktozdan asit ve gaz üretimi ile görüldüğü gibi karbonhidratların fermantasyonundan gaz üretir. Çoğu *E. coli*, pozitif bir orto-nitrofenil-β-D-galaktozid (ONPG) reaksiyonu verir ve bu, β-galaktosidaz aktivitesini gösterir. Metil kırmızısı reaksiyonu da *E. coli* için pozitiftir, bu da glikozun karışık asit fermentasyonunu gösterir, ancak Voges-Proskauer reaksiyonu (asetoin üretimi) negatiftir. *Escherichia coli* ayrıca jelatinaz aktivitesi yoluyla jelatin sıvılaşmasını indüklemez. Suşların çoğu, dekarboksilat lizini kullanır, sodyum asetat kullanır, ancak sitratın tek karbon kaynağı olduğu Simmons'ın sitrat agarında büyümez (Percival ve Williams, 2014). Birçok *E. coli* hücresi kapsüllenir veya mikrokapsüllenir ve bu kapsüller asidik polisakkaritlerden oluşur. *E. coli* bakterisinin mukoid suşları, ya belirli K antijen özelliklerine sahip bir polisakkaritten veya kolanik asitten oluşan ortak bir asit polisakkaritinden (genellikle M antijeni olarak tanımlanır) oluşan hücre dışı balçık üretir (Jiménez vd., 2012). *Escherichia coli*, değişen yapı ve antijenik özgüllükte fimbriya (veya pili) sergiler ve bu fimbriyalar hidrofobik olduğundan, konakçıya veya organa özgü yapışma özellikleri sağlarlar. *E. coli*'nin yapı taşı yaklaşık %55 protein, %25 nükleik asit, %9 lipid, %6 hücre duvarı, %2,5 glikojen ve %3 diğer metabolitlerden oluşur (Kim, 2016). Tüm enterovirulent *E. coli*, doğrudan veya dolaylı olarak insan veya hayvan taşıyıcılarından elde edilir. Bu nedenle, içme suyundan kaynaklanan risk, yalnızca kaynağın dışkı yoluyla kontaminasyonunu izler.

E. coli'nin klor ve diğer dezenfektanlara duyarlılığı göz önüne alındığında, organizmalar kaynağı kirletse bile, yeterli klorlama genellikle herhangi bir sağlık riskini etkili bir şekilde ortadan kaldırır. Enterovirulent *E. coli*'nin kişiden kişiye bulaşması yaygın görünmemektedir ve sporadik hastalığın bulaşmasının çoğu gıda ve su kaynakları yoluyla olmaktadır (Rosenberg vd., 1977). Enteroagregatif *Escherichia coli* bir patojen olarak kabul edilmesine rağmen, enteroagregatif *Escherichia coli* hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde Enterovirulent *E. coli*'den sonra gezginlerin ishalinin en yaygın ikinci nedenidir. Enteroagregatif *Escherichia coli* ayrıca dünya çapında yaygın olarak endemik ve salgın ishalin bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Enteroagregatif *Escherichia coli*'nin neden olduğu ishal genellikle sudur, ancak buna mukus veya kan eşlik edebilir. Enteroagregatif *Escherichia coli* kolonizasyonu, hem ince hem de kalın bağırsakların mukozasında meydana gelebilir ve bu, kolonda hafif inflamasyona yol açabilir (Nataro ve Kaper, 1998). *Escherichia coli*'nin birçok türü zararlı değildir. Aslında bağırsaktaki bu komensal suşlar, önemli bir pıhtılaşma faktörü olan vitamin K_2 vitamini sentezi için gereklidir (Bentley ve Meganathan, 1982). Bununla birlikte, patojenik suşlar vardır ve bu suşlar, varsa veya varsa daha büyük bir tehdit haline gelebilir. Patojenik *E. coli* suşları, enfeksiyon bölgesine bağlı olarak intestinal patojenik *E. coli* ve ekstraintestinal patojenik *E. coli* olarak ikiye ayrılabilir. Her ikisi de, belirli patojenik özelliklere sahip tek bir türün suşları grubu olarak tanımlanan farklı patotipler olarak alt kategorilere ayrılmıştır. Patotip sınıflandırması, hastalığın klinik tezahürüne, ilgili virülans faktörlerine ve filogenetik arka plana dayanmaktadır (Crossman vd., 2010). Potansiyel olarak patojenik intestinal tabanlı diyareye neden olan *E. coli*'nin altı suşu vardır. Bunlar; yapışık *E. coli*, enteroagregatif *E. coli*, enterohemorajik *E. coli*, enteroinvazif *E. coli*, enteropatojenik *E. coli* ve enterotoksijenik *E. coli* suşlarıdır. Ayrıca, bir ekstraintestinal üropatojenik *E. coli* patojenik suşu da mevcuttur. Menenjit ile ilişkili *E. coli* suşu olan ikinci bir ekstraintestinal suşun var olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. Bunun hakkındaki bulgular, enfeksiyonun bir kan enfeksiyonu olarak başladığını ve daha sonra merkezi sinir sistemine erişim kazandığını göstermektedir. Menenjit ile ilişkili *E. coli* suşu K_1 kapsüler antijenine sahiptir ve menenjit nedeni ile yüksek oranda ölüme sebep olur (Kim, 2016). *E. coli*'nin tüm patojenik suşları, aynı tip potansiyel virülans faktörleri ile donatılmıştır. Bu faktörler arasında bir kapsül (bazı suşlarda), flagella, lipopolisakkarit (LPS) hücre duvarı, fimbriae, dış zar

proteinleri (OMP), bir hemolizin, sitolizinler ve sideroforlar bulunur. Bu virülans faktörlerinin bazılarının spesifik tipleri artı diğer toksinlere ve efektörlere sahip olması ile, her bir patojenik suş ile değişebilirler (Kaper vd., 2004). *Escherichia coli,* altta yatan bir sorunu olan hastaların bağırsaklarından yayılmanın ardından çeşitli enfeksiyonlar ile ilişkilidir. *E. coli*'ye bağlı idrar yolu enfeksiyonları genellikle rektumdan üretraya doğrudan yayıldıktan sonra ortaya çıkar. Diğer vücut bölgelerindeki enfeksiyonlar, küçük bebeklerde menenjit oluşumu ile örneklendiği gibi genellikle hematojen yayılma yoluyla ortaya çıkar. *Escherichia coli* ayrıca, yaranın doğrudan kontaminasyonunun veya hastanın parmaklarının fekal kontaminasyonu yoluyla dolaylı kontaminasyonun ortaya çıkabileceği postoperatif yara enfeksiyonunun yaygın bir nedenidir. *Escherichia coli*, hastaları sağlık ekibinin kolonize üyeleri ve diğer hastalar aracılığıyla da kontamine edebilir (Percival ve Williams, 2014). Enterohemorajik *E. coli*, belki de en çok klinik endişe kaynağı olan *E. coli* serogrupudur. Bu organizmaların, akut böbrek yetmezliği ile karakterize edilen ve genellikle 5 yaşın altındaki çocuklarda görülen hemolitik üremik sendroma neden olduğu bilinmektedir. Enterohemorajik *E. coli* 0157 ile enfekte olanların tahminen %10'unda hemolitik üremik sendrom, hemolitik anemi veya trombositopeni geliştirebilir. Enterohemorajik *E. coli* vakalarının yaklaşık %5'inde hemorajik kolit gelişir ve bu, ölüm oranlarının %10'a kadar çıkabildiği hemolitik üremik sendroma dönüşebilir (Spinale vd., 2013).

Zebra balığı (*Danio rerio*), Güney Asya'dan, özellikle Bangladeş, Hindistan, Nepal ve Pakistan'an gelen Cyprinid bir tropikal tatlı su balığıdır. "Zebra balığı" adı, vücutlarının her iki tarafındaki yatay mavi çizgilerden gelir (Şekil 1.7). Zebra balığı, ilk olarak George Streisinger (Oregon Üniversitesi) tarafından biyolojik bir model olarak 1970'lerde kullanılmıştır. Çünkü genetik olarak manüpule etmek için kullanımı ve yetiştirilmesi fareden daha basit ve kolaydır (Kanungo vd., 2014). Zebra balığının model organizma olarak kullanılması, 1990'lardan itibaren iki büyük genetik mutant geliştirme çalışması için kullanıldığında ivme kazanmıştır. Bunlardan biri Nobel Ödülü sahibi Christiane Nusslein-Volhard tarafından Almanya Tübingen'de, diğeri ise Wolfgang Driever ve Mark Fishman tarafından Amerika Bileşik Devletleri Boston yapılmıştır. Mutantların belirlenmesi, biyolojinin çeşitli alanlarında çalışma için en önemli stratejilerden biridir (Weinstein, 2002). Zebra

balığı, ağırlıklı olarak gelişim biyolojisi ve moleküler genetikte kullanılmıştır, ancak bunların toksikolojideki ve ilaç keşfindeki değeri kabul edilmiştir. Bir kimyasalın toksisitesini değerlendirmek için, toksisitenin uç noktalarını ve bunların doz-tepki ilişkilerini belirlemek, toksisite mekanizmalarını aydınlatmak ve kimyasalın toksikodinamiğini belirlemek önemlidir (Hill vd., 2005). Bu balık, kimyasalların bütünleştirici risk değerlendirmesinde bir dizi ileriye dönük uygulama ile gelişim biyolojisi, toksikoloji ve genetik çalışmalarda ve çevre bilimlerinde omurgalı model bir organizma haline gelmiştir (Shi vd., 2008). Dişiler, yumurtaları barındıran daha büyük karınlarından tanınabilir. Erkekler, dişi zebra balıklarına göre daha kırmızımsı olma eğilimindedir (Teame vd., 2019). Beslenme alışkanlıklarına göre zebra balığı omnivorlar olarak sınıflandırılırlar.



Şekil 1.7 Zebra balığı (Danio rerio)

Deneysel çalışmalar sırasında, bilim adamları farklı türde ve seviyelerde diyet yemleri kullanırlar. Yetişkin ve larva zebra balığı için aynı miktarda içerik kullanılır. Dahası, bazı laboratuvarlar tarafından zebra balığı yetiştirmek için uygulanan yemler ve beslenme rejimleri çeşitlidir ve bazı durumlarda resmi değerlendirme yapılmadan uygulanır (Castranova vd., 2011).

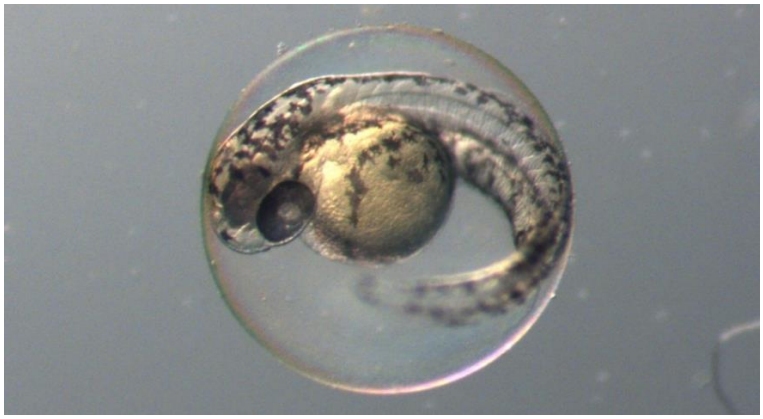


Şekil 1.8 Erkek (♂) ve dişi (♀) zebra balığı (Danio rerio)

Laboratuvarda, makul araştırma sonuçları elde etmek için zebra balığı, uygun türde ve düzeyde diyet besinleri almalıdır. Çoğu zaman araştırmacılar, zebra balığı için farklı ticari diyetler kullanırlar, ancak bazı ticari diyetler tanımlanmamış besinsel bileşime sahiptir ve deneysel sonuçlar üzerinde bir etkiye sahip olabilir (Gonzales ve Law, 2013). Yem miktarı, balığın farklı büyüme aşamalarına göre değişir ve büyüme aşamasına bağlıdır. Döllenme sonrası 5 günden itibaren zebra balığı larvaları çoğunlukla paramecium ve rotiferler gibi zooplanktonlarla beslenir ve genç larvalar 100 μm boyutuna kadar suni yiyeceklerle veya canlı yemle beslenebilir. Yetişkin balıklar için, kuru yemlerin boyutu 300 ila 400 μm arasında değişebilir (Avdesh vd., 2012). Kuru yemin boyutu, balığın boyutu arttıkça artabilir. Zebra balığının yaygın olarak uygulanan beslenme oranı, vücut ağırlığının yaklaşık %4'ü kadardır. Aşırı besleme sudaki nitrat konsantrasyonunu artırabilir ve balığın fizyolojisini etkileyebilir. Ayrıca aşırı yemek, balığın ölümüne neden olabilir (Teame vd., 2019).

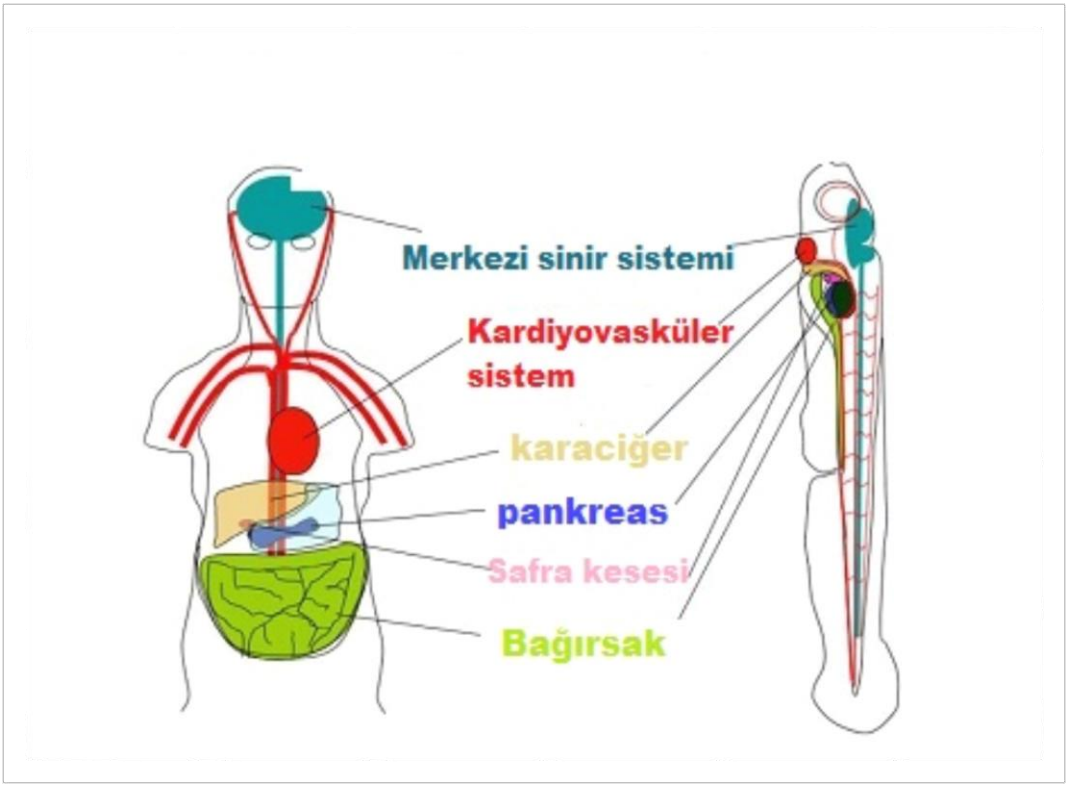
Zebra balığını çalışmalarda model organizma olarak kullanmanın bir çok avantajı vardır. Bunlar; yetişkinleri yalnızca yaklaşık 2,5-4 cm uzunluğunda olması nedeni ile stok alanını büyük ölçüde azaltır, tür olarak dayanıklıdır, düşük bir maliyetle kolayca bakımı yapılır, tüm genomu dizilenmiş ve kullanıma açıktır (Howe vd., 2013). Fizyolojik yaşam döngüleri kısadır (3-4 ay) ve haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilirler, bu da onları çeşitli araştırmalar yapmak için faydalı ve avatajlı

kılmaktadır (Nowik vd., 2015). Zebra balığı yumurtalarının ve embriyolarının şeffaflığı (Şekil 1.9), zebra balığını erken gelişimi incelemek için ideal kılar çünkü birçok vücut yapısı, hatta kan damarları mikroskopta kolayca gözlemlenir (Laale, 1977).



Şekil 1.9 Zebra balığı (Danio rerio) yumurtası ve embriyosu

Yumurtaları dışarıda döllenir, embriyo dışarıda çok hızla gelişir, optik olarak berraktır ve bu nedenle deney ve gözlem için kolayca erişilebilir (Brand vd., 2002). Zebra balığı larvaları döllenmeden sonraki 5. güne kadar yumurta sarısı ile beslenir ve henüz kendilerini aktif olarak besleyemezler. Yetişkin zebra balığı optimum koşullarda tutulduğunda, cinsel olgunluğa çok çabuk ulaşır ve ayrıca iyi bir fertilizasyon oranına sahiptir (Carpio ve Estrada, 2006). Zebra balığı larvalarında (>3 dpf), organların ve lokomotor tepkilerinin çoğunluğu, davranış işlevlerinin yerinde olduğunu düşündüren gelişimlerdir (Kimmel vd., 1995). Zebra balığı, beyin, sindirim sistemi, kas sistemi, damar sistemi ve doğuştan gelen bağışıklık sistemi dahil olmak üzere insanlarla birçok fizyolojik ve genetik benzerliğe sahiptir. (Şekil 1.10) (Zhao vd., 2015; Teame vd., 2019).



Şekil 1.10 Benzerlik gösteren zebra balığı (Danio rerio) ve insan organ sistemeleri

Ayrıca, insan hastalık genlerinin %70'i zebra balığı ile işlevsel benzerliklere sahiptir (Santoriello ve Zon, 2012). Protein kodlayan genlerde 10.000'den fazla mutant oluşturulmuş ve insan hastalıklarını incelemek için zebra balıklarının birkaç transgenik dizisi yapılmıştır. Dünyada birden fazla zebra balığı türünün bulunması, bu türün bir başka önemli avantajıdır (Teame vd., 2019). Zebra balığı genomu tamamen dizilenmiştir, bu nedenle moleküler ve genetik analizler için kullanılabilir. Zebra balığı sinir sistemi günler içinde işlevsel hale gelir ve beynin tüm ana bileşenleri 5 dpf süresinde bulunur, bu özellikler bu türün ilaç ve kimyasalların değerlendirilmesi için standartlaştırılmış test protokollerinde yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır (Haq, 2013).

Zebra balığını diğer omurgalı model organizmalardan ayıran iki ana embriyolojik özelliğe sahiptir. Bu özellikler, çok hızlı bir erken gelişme ve gelişiminin kolaylıkla ayrıntılı olarak gözlemlenebildiği gerçeğidir. Embriyogenez yaklaşık 2 gün sürer. Döllenme sonrası 0 saatten itibaren embriyo gelişimi başlar, hemen sonra tek hücreli aşamada zigot büyük bir yumurta sarısı yumağının üzerine oturur ve yetişkin bir zebra balığı haline gelir.

- ✓ Döllenmeyi takip eden 4 hpf ardından; hücreler yumurta sarısının tepesinde bulunan bir hücre kütlesi oluşturmak için birkaç tur bölünme geçirmiştir,

- ✓ 6 hpf; gastrulasyon, hücrelerin epibolisi ile başlar. Bu aşamada ön-arka ve dorsoventral eksenler belirlenebilir,

- ✓ 8 hpf; baş bölgesinde kalınlaşmanın başlar,

- ✓ 18 hpf; ilk somit formları ve vücut planı tanınır hale gelir, ilk istemli kas kasılmaları kuyruk hareketleri olarak gözlemlenir,

- ✓ 24 hpf; bölmelere ayrılmış beyin, gözler, kulaklar ve tüm iç organlar dahil, omurgalıya özgü vücut özelliklerinin ve organlarının çoğu tanınabilir, fakat organların çoğu henüz işlevsel değildir. Kuyruk, yumurta sarısı etrafındaki önceki konumundan ayrılmış ve embriyonun hızla uzaması devam eder. Gövde ve kuyrukta kendiliğinden yan yana kasılmalar sergilenir ve genellikle dakikada 8 episod meydana gelir,

- ✓ 48 hpf; çok sayıda hücre türü farklılaşır ve organlar kademeli olarak işlev görmeye başlar. Kalp tam olarak gelişir ve dolaşımdaki kan vücutta görülebilir. Yaklaşık 48 hpf'den itibaren embriyo kuluçka dönemine ulaşır ve yumurtadan çıkma düzensiz olarak gerçekleşir,

- ✓ 72 hpf; larvalar morfogenezlerini neredeyse tamamlamışlardır ve yavaşça daha aktif hareket etmeye başlarlar. Yüzgeçlerin, çenelerin ve gözlerin kademeli olarak hareketi, hızlı tepki ve av arama davranışının gelişimine uyum sağlar,

- ✓ 5 dpf; larvalar iyi yüzerler ve bağımsız olarak yiyecek ararlar. Zebra balığı gelişiminin hızı sıcaklığa bağlıdır. Zebra balığı, yaklaşık 18-32 ºC arasında değişen sıcaklıklarda gelişir. Sıcaklık ne kadar yüksekse, gelişme o kadar hızlıdır. Normalde, zebra balığı 25-28,5 ºC arasında değişen sıcaklıklarda tutulur (Kimmel vd., 1995; Haffter vd., 1996).

Zebra balıklarının embriyonik ve larva aşamaları, yaşam döngüsünün en hassas aşaması olarak kabul edilir ve toksik maddelerden kaynaklanan bozulma, hayatta kalma oranının düşmesine neden olabilir (Laale ve Lerner, 1981).

Aktif yüzme, yumurtadan çıktıktan sonraki erken larva döneminde ortaya çıkmaya başlar ve daha da geliştirilmiş arka beyin ve omuriliğin mümkün kıldığı ikincil motor nöron fonksiyonunu gerektirir (Saint-Amant ve Drapeau, 1998). Yüzme davranışı, yumurtadan çıktıktan kısa bir süre sonra dokunsal uyarı ile tetiklenebilir, ancak larva normalde döllenmeden 4 gün sonrasına kadar oldukça hareketsizdir. 4 dpf'de larvalar dört tip motor davranış rutini sergileyebilir, kaçış-dönüşleri ve yavaş-hızlı yüzmeleri yapabilir (Saint-Amant, 2006).

Zebra balığı larvalarının, değişen aydınlatma koşullarına hareket hareketindeki değişikliklere yanıt verdiği doğrulanmıştır (Burgess ve Granato, 2007). On dakikalık aralıklarla değişen karanlıkta (kızılötesi ışık) ve ışık koşullarında (görünür ışık) zebra balığı davranışının kaydedilmesi, larvaların karanlıkta daha yüksek bir toplam yüzme aktivitesi ve ışıkta daha düşük yüzme aktivitesi sergilediğini göstermiştir. Erken larvalar ani karanlıktan irkilir ve larvalar toksik maddelere (etanol) maruz kalırsa davranış önemli ölçüde etkilenebilir. Zebra balığı larvalarının daha uzun süre aydınlık ve karanlık koşullarda normal davranışı, karanlığa kıyasla aydınlık koşullarda önemli ölçüde daha aktif bir durumdur (MacPhail vd., 2009).

Su kaynaklı bakıra maruz kalmanın, balık davranışında geniş kapsamlı etkileri olan duyusal sistem işlevinin bozulması da dahil olmak üzere balıklarda çeşitli fizyolojik etkiler ortaya çıkarmaktadır. Balık larvalarının geliştirilmesinde, bakırın hayatta kalma ve büyüme gibi anahtar parametreleri etkilediği bilinmektedir ve son zamanlarda yanal sisteme müdahale ettiği görülmüştür (Johnson vd., 2007).

Zebra balığı embriyolarında, $ZnCl_2$ maruziyeti için belirlenen karşılık gelen ortalama letal konsantrasyon (LC_{50}) değeri 1,36 mg/L olarak bulunmuştur. 1,0 mg/L dozunun ise yumurtadan çıkma süresini 4 günden 7 güne çıkardığı ve embriyoların çoğunun 11-12. günlerde yumurtadan çıkmadan koryonda öldüğü görülmüştür (Küçükoğlu vd., 2013). Su ortamlarında aşırı çinko, balıkların biyolojik süreçleri üzerinde toksik

etkilere, özellikle anormal embriyogenez, düşük yumurtadan çıkma gibi gelişimsel deformitelere, gecikmiş ya da yumurtadan çıkma süresinin uzamasına, yeni yumurtadan çıkan larvaların boyutlarının küçük olmasına, embriyonik-larva aşamasında büyüme performansı ve hayatta kalma oranının azalmasına neden olabilir. Çinko eksikliği memelilerde açıkça teratojeniktir, aşırı miktarda çinko klorür ise daha az teratojeniktir. Bu, maternal karaciğerin ve metaloenzimlerin koruyucu mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. Yumurtlayan sucul organizmalarda böyle bir koruyucu mekanizma yoktur ve bu nedenle sucul organizmaların aşırı miktarda çinko klorüre karşı çok hassas olmaları ve gelişimlerinin anormal olması oldukça doğaldır. Kurşuna maruz bırakılan zebra balıklarında; kuluçka süresinin uzadığı, embriyonik nöronda karyopiknosis, hücresel ödem, organlarda hasar, nörotoksisite ve omurga deformasyonları görülmüştür (Zhang vd., 2012).

Yeraltı sularında yaygın olarak yüksek konsantrasyonlarda Demir (Fe) metalinin bulunması nedeni ile yapılan bir çalışmada; zebra balıkları 30 gün boyunca 0,8 mg/L ve 1,3 mg/L dozunda demire maruz bırakılmış, çalışma sonucunda balıkların karaciğerlerinde metallerin daha yüksek biyoakümülasyonu, kaslarında önemli ölçüde değişim, düşük konsantrasyonda AChE aktivitesinin arttığı fakat yüksek konsantrasyonda düştüğü ve tüm dokularda DNA hasarına neden olduğu görülmüştür (Marins vd., 2019).

Bakır nanopartiküllerin ve iyonlarının zebra balığındaki retina gelişimsel kusurları indüklediğini ve embriyonik retina hücrelerinde apoptoza yol açtığı bilinmektedir. Bakır, retina hücrelerini azaltarak ve retina genlerini regüle ederek, retina hücrelerindeki endoplazmik retikulum ve mitokondri yapılarına zarar vermektedir (Zhao vd., 2020).

Sips vd. (2018) tarafından yapılan araştırmaya göre, döllenmeden sonraki ilk 3 gündeki zebra balığı embriyolarının siyanüre karşı oldukça dirençli olduğu ve sonrasında giderek daha duyarlı hale geldiği bildirilmiştir. Zebra balıklarında birkaç saat nihai olarak ölümcül siyanür dozlarına yanıt olarak gen ifadesinin analizi, yaşa bağlı siyanür direnci ile ilişkili demirle ilgili proteinlerde değişiklikler ortaya çıkarmıştır.

Escherichia coli O78 suşu K46'nın patojenitesinin zebra balığı embriyosunda patojenik etki gösterdiği ve öldürücü olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Fakat komensal *E. coli* suşu, zebra balığı embriyolarında hiçbir patolojik etki göstermemiştir (Kjelstrup vd., 2017)

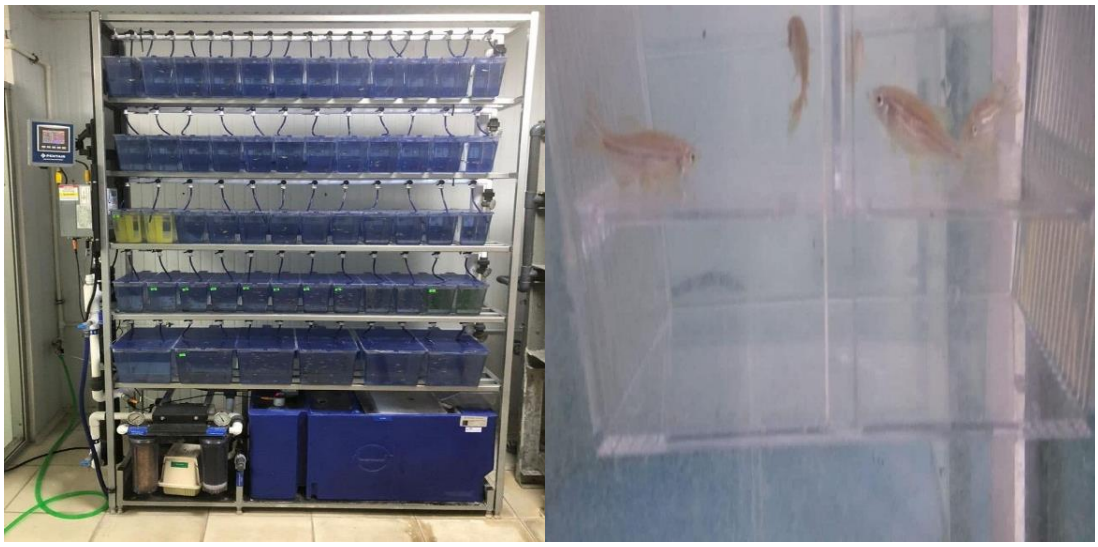
Zebra balığının davranışsal sinirbilimde kullanılması çalışmaları son yıllarda yeni başlamıştır. Teknoloji ilerledikçe, mutant zebra balığı, morfolinos, yüksek verimli tarama ve zebra balıklarında toksik ve terapötik son noktalar için yeni biyo-deneyler daha yaygın hale gelecektir. Toksikoloji için, bu ilerlemeler, genetik ve genomik altyapının birikmesine ek olarak, nihayetinde kimyasalların toksisite mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi sağlayacak ve insan hastalıklarını tedavi etmek için yeni ilaçların keşfedilmesine yardımcı olacaktır.

Bu bilgiler ışığında, zebra balıklarının embriyolojik gelişim aşamasında su ortamına hayatın her aşamasında karşımıza çıkabilecek; bazı ağır metaller (FeClOH, $K_3Fe(CN)_6$, KCN ve $CuSO_4$) ve bazı insan patojenleri (metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) bakterileri eklenerek model organizma olan zebra balığının (*Danio rerio*) embriyolojik gelişimi incelenmiştir.

2. YÖNTEM

2.1 Zebra Balığı (*Danio rerio*) ve Yumurta Alımı

Çalışma Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi'nde yapılmıştır. Zebra balığı (*Danio rerio*) ve onlardan elde edilen yumurtalar erkek ve dişi balıklar ayrılarak, kuluçkalama ünitesinde tutulmuş ve yumurta alımı gerçekleştirilmiştir. Akvaryumların su sıcaklığı 28 ºC de tutularak standart fotoperyot uygulaması ile yumurta alınmıştır. Yumurtalar dikkatle akvaryumdan çıkarılıp yıkanmış daha sonra petri kaplarına aktarılmıştır (Aksakal ve Çiltaş, 2018). Kuluçka ve üretim sistemi Şekil 2.1'de verilmiştir.



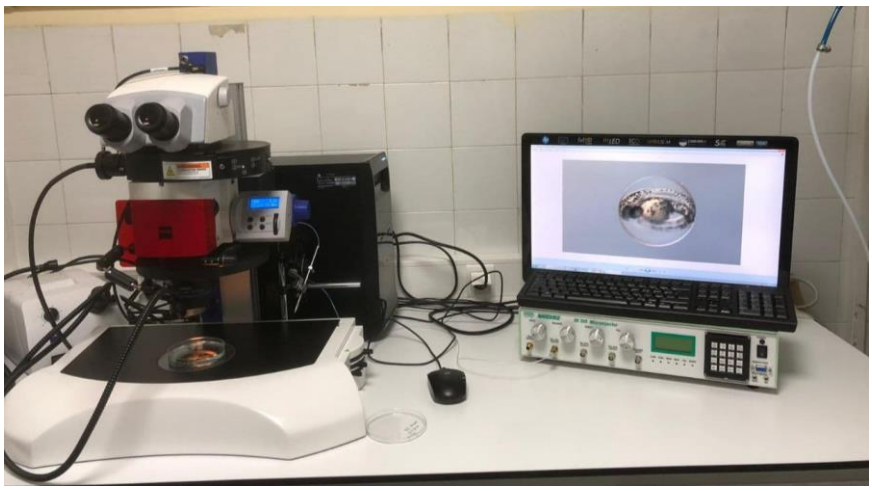
Şekil 2.1 Zebra balığı (Danio rerio) üretim sistemi

2.2 Kullanılan Ağır Metaller ve İnsan Patojenleri

Normal hayat içerisinde insanların her zaman maruz kalabileceği; FeClOH (demirhidroksil klorür), $K_3Fe(CN)_6$ (potasyum ferri siyanür), KCN (potasyum siyanür) ve $CuSO_4$ (bakır sülfat) ağır metal olarak kullanımıştır. Ayrıca Atatürk Üniversitesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'dan temin edilen; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter*

baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri insan patojeni olarak çalışmada kullanılmıştır.

2.3 Görüntüleme Sistemleri



Şekil 2.2 Ağır metal çalışması görüntüleme sistemi



Şekil 2.3 İnsan patojeni çalışması görüntüleme sistemi

Ağır metal toksisite testlerinde; Zeiss marka Discovery V12 model stereo mikroskop ile Axio Vision SE64 Rel. 4.8 görüntüleme yazılımı kullanılarak 40x büyütme ile görüntüleme yapılmıştır (Şekil 2.2).

İnsan patojeni toksisite testlarinde; SOIF marka BK5000 model Trinoküler mikroskop ile MshOt dijital görüntüleme yazılımı kullanılarak 40x büyütme ile görüntüleme yapılmıştır (Şekil 2.3).

2.4 Toksisite Testleri

Ağır metal toksisite testlerinde; zebra balığı yumurtaları FeClOH, $K_3Fe(CN)_6$, KCN ve $CuSO_4$ kimyasallarının 0,5 mg/L dozu ile her bir grupta 50 adet yumurta olacak şekilde petri plaklarında 96 saat boyunca takip edilmiş ve kayıt altına alınmıştır (Aksakal ve Çiltaş, 2019).

İnsan patojeni toksisite testlerinde; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerinin 37 ºC'de 24 s inkübasyonla üretilmiş olan genç kültürlerinden McFarland 0.5 satndardına göre hazırlanmış $1x10^6$ CFU/mL dozu ile her bir grupta 60 adet yumurta olacak şekilde petri plaklarında 110 saat boyunca takip edilmiş ve kayıt altına alınmıştır (Gültepe ve Aydın, (2009).

Çalışma süresinde inkübasyon sıcaklığı 28 ºC olarak ayarlanmıştır. Gözlem sırasında ölü embriyolar veya anomali görülen bireyler ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2.5 İstatistiksel Analizler

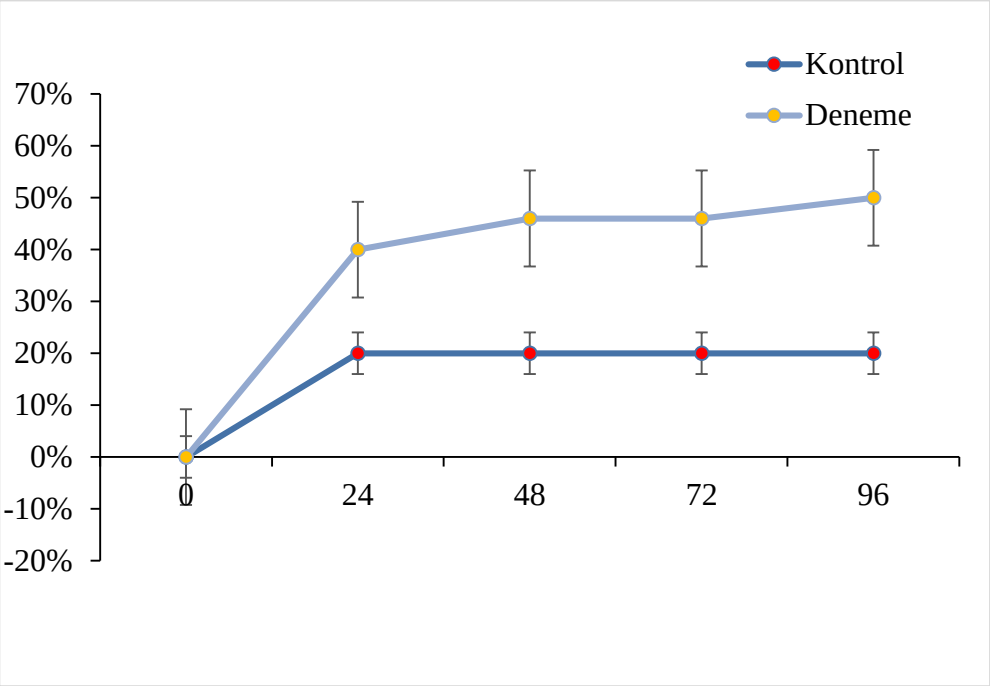
Ölüm oranı, yumurtadan çıkma, malformasyon oranlarının karşılaştırmasında SPSS 20,0 paket programı kullanılmış ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. İstatistiksel olarak önemli farklılık bulunan gruplar Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak $p < 0,05$ hata seviyesinde analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Ağır Metal Toksisite Sonuçları

3.1.1 FeClOH Toksisitesi

Yumurtalarda görülen mortalite oranları 24 hpf'de kontrol grubuna göre artmıştır. 96 hpf'de ölü mortalite oranında önemli bir fark ($p<0,05$) bulunmuş ve çalışma sonunda ölüm oranı %50 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). FeClOH ile muamele edilen grupta 96 hpf sonunda mortalite oranı %50 olarak tespit edilmiştir.

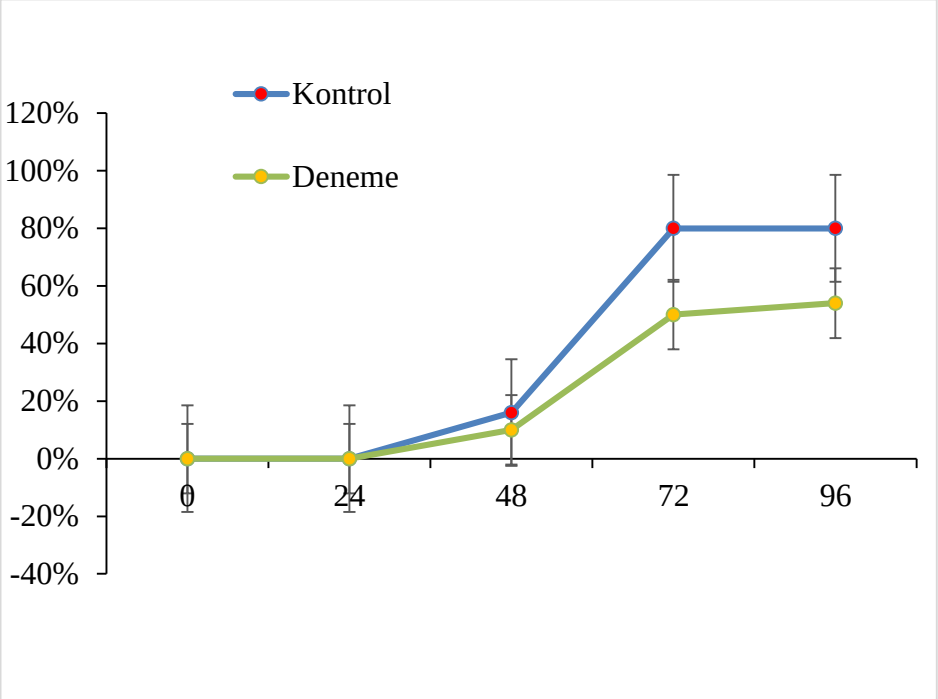


Şekil 3.1Grupların FeClOH mortalite oranları

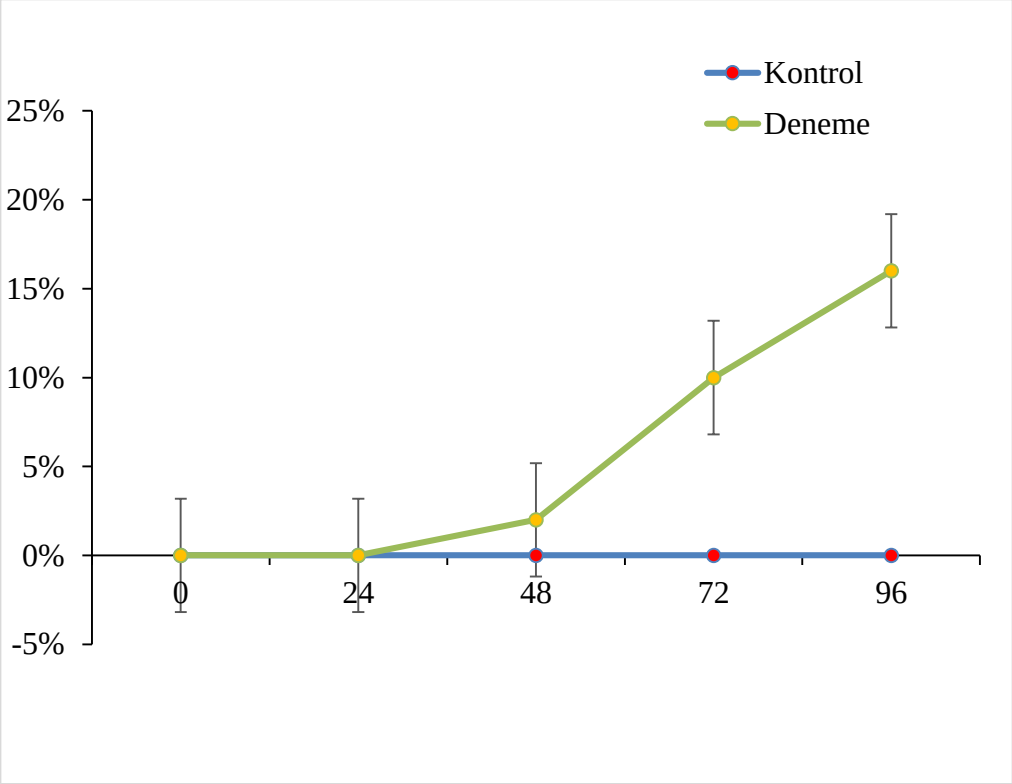
Kontrol grubundaki tüm embriyoların koryondan çıkışı 72 hpf'de tamamlanmış olmasına rağmen FeClOH embriyoların koryondan çıkış süresi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu görülmüştür (Şekil 3.2). Embriyoların yumurtadan çıkış oranı %54 olmuştur.

Grupların ≤48 hpf'deki erken gelişim safhasında gözlenen anomali oranları Şekil 3.3'te verilmiştir. FeClOH uygulanan grupta peteşiyal kardiyak ödem, göz anomalisi, omurga malformasyonları gibi çeşitli defekteler görülmüştür (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

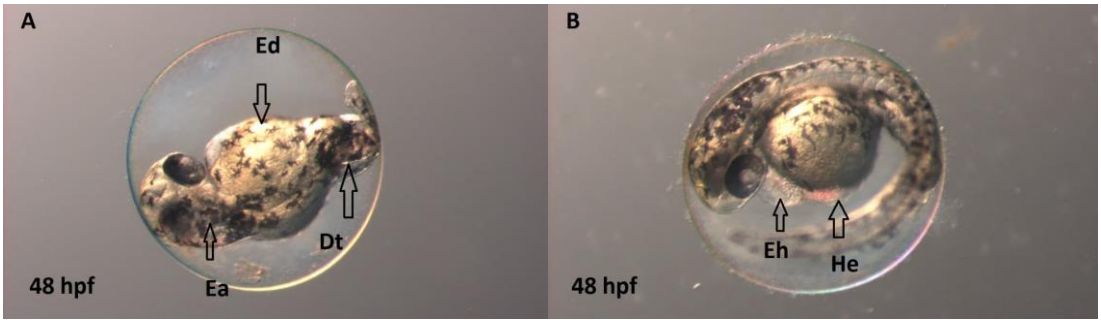
96 hpf sonunda FeClOH uygulanan grupta sağlıklı birey oranının %34 olduğu görülmüştür.



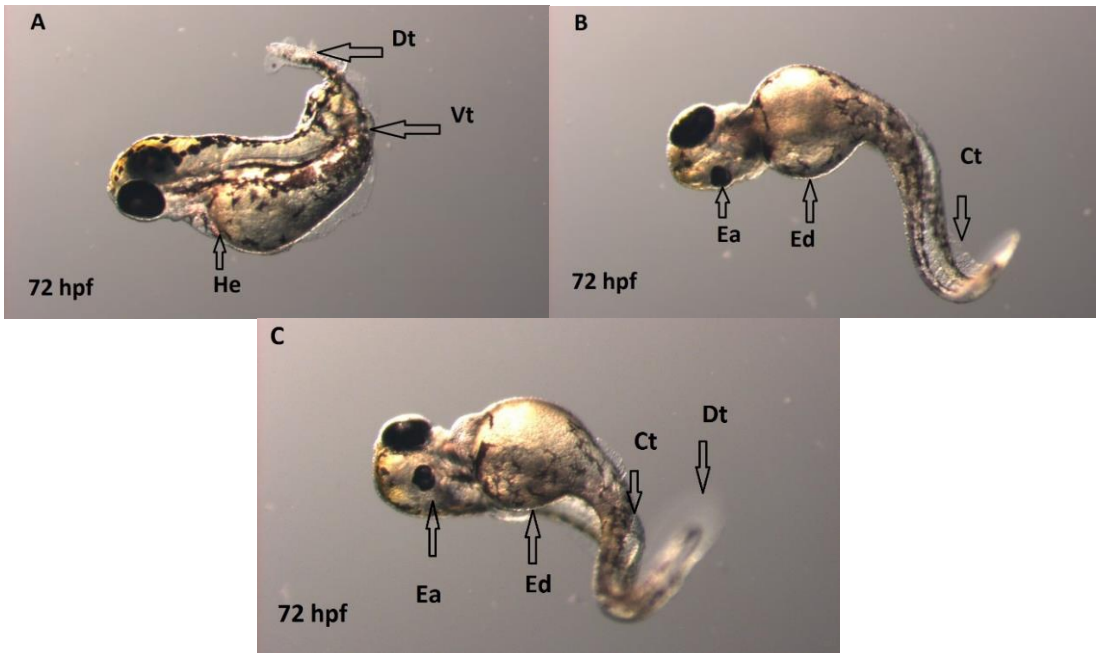
Şekil 3.2 Yumurtaların FeClOH açılma oranları



Şekil 3.3 Emriyolardaki FeClOH anomali oranları



Şekil 3.4 FeCIOH uygulanan zebra balığı embriyolarında 48 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Dt, kuyruk deformasyonu; Ea, göz anomalisi; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji).



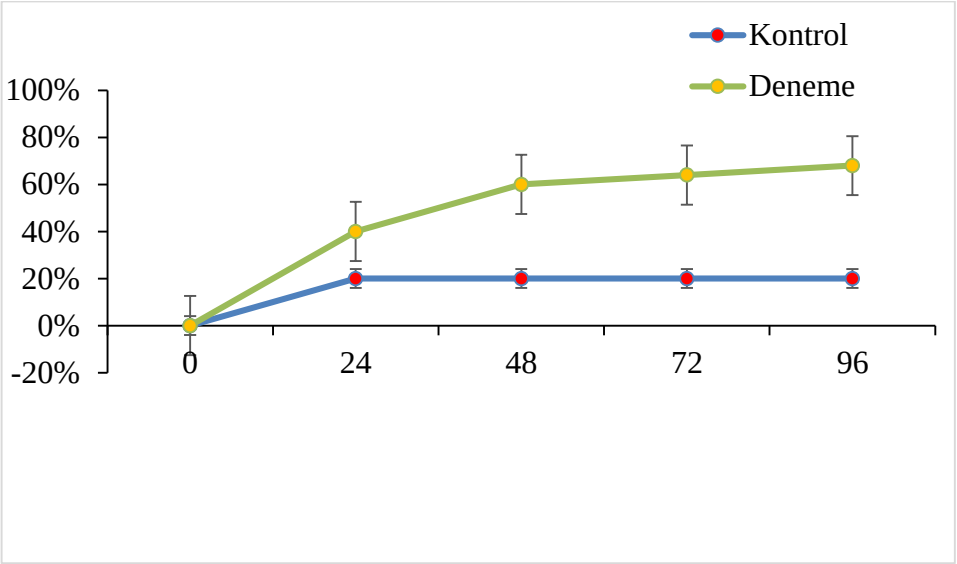
Şekil 3.5 FeCIOH uygulanan zebra balığı embriyolarında 72 hpf'de görülen anomaliler (Vt, vertebral defromasyon; Ct, çarpık kuyruk).

3.1.2 $K_3Fe(CN)_6$ Toksisitesi

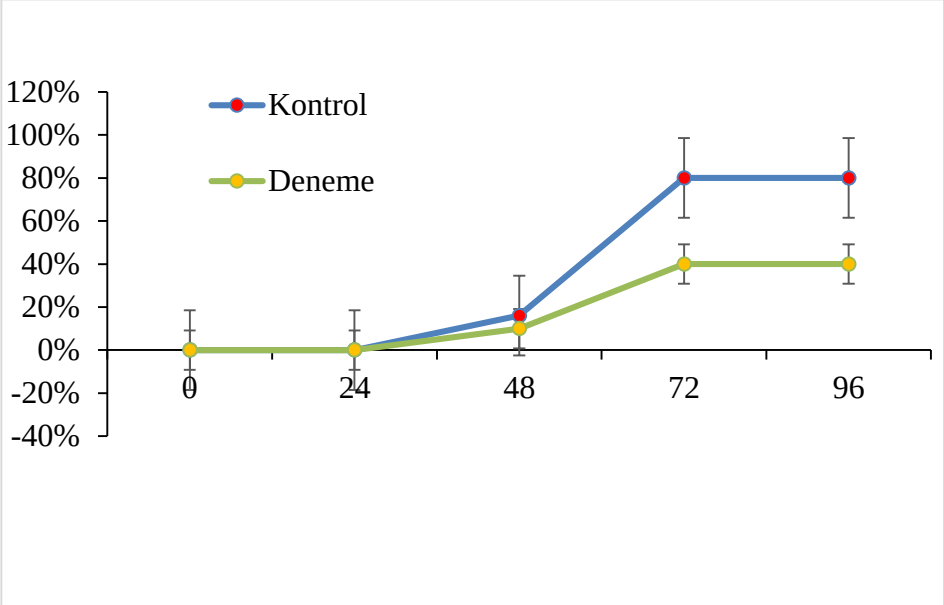
Yumurtalarda görülen mortalite oranları 24 hpf'de kontrol grubuna göre artmıştır. 72 hpf ve 96 hpf'de ölü mortalite oranında önemli bir fark ($p<0,05$) bulunmuş ve çalışma sonunda ölüm oranı %50 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.6). $K_3Fe(CN)_6$ ile muamele edilen grupta 96 hpf sonunda mortalite oranı %68 olarak belirlenmiştir.

Kontrol grubundaki emriyolar 72 hpf zamanında yumurtadan çıkışını tamamlamıştır. Aynı sürede $K_3Fe(CN)_6$ uygulanan grup ile kontrol grubu arasında emriyoların çıkış oranı arasında öenmli farklılık görülmüştür ($p<0,05$). $K_3Fe(CN)_6$ uygulamasının

embriyoların koryon zarında çıkışı üzerine engelleyic etkisi olduğu görülmüştür. 96 hpf sonunda yumurtadan çıkış oranı %40 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).

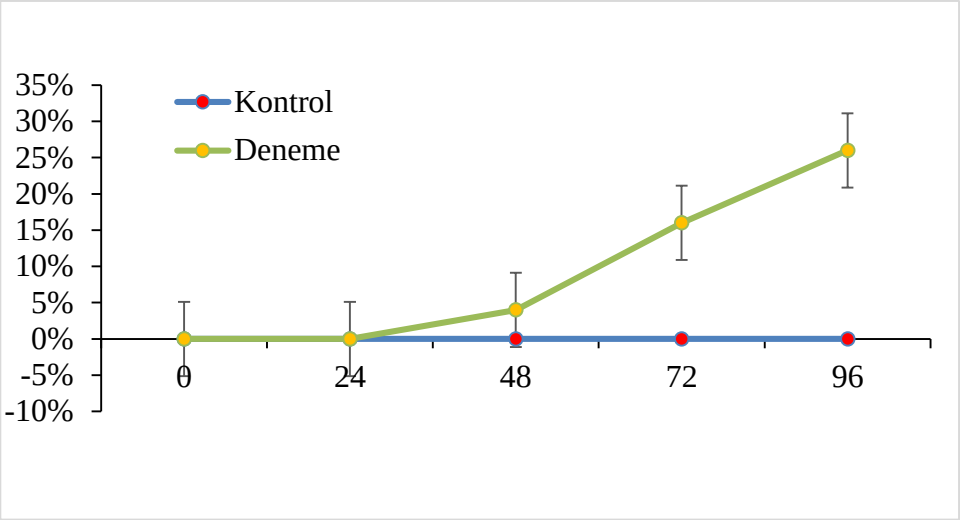


Şekil 3.6 Grupların K3Fe(CN)6 mortalite oranları

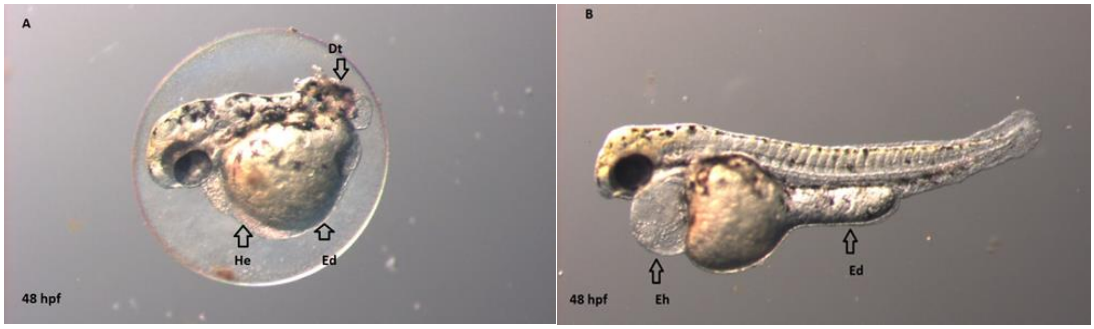


Şekil 3.7 Yumurtaların K3Fe(CN)6 açılma oranları

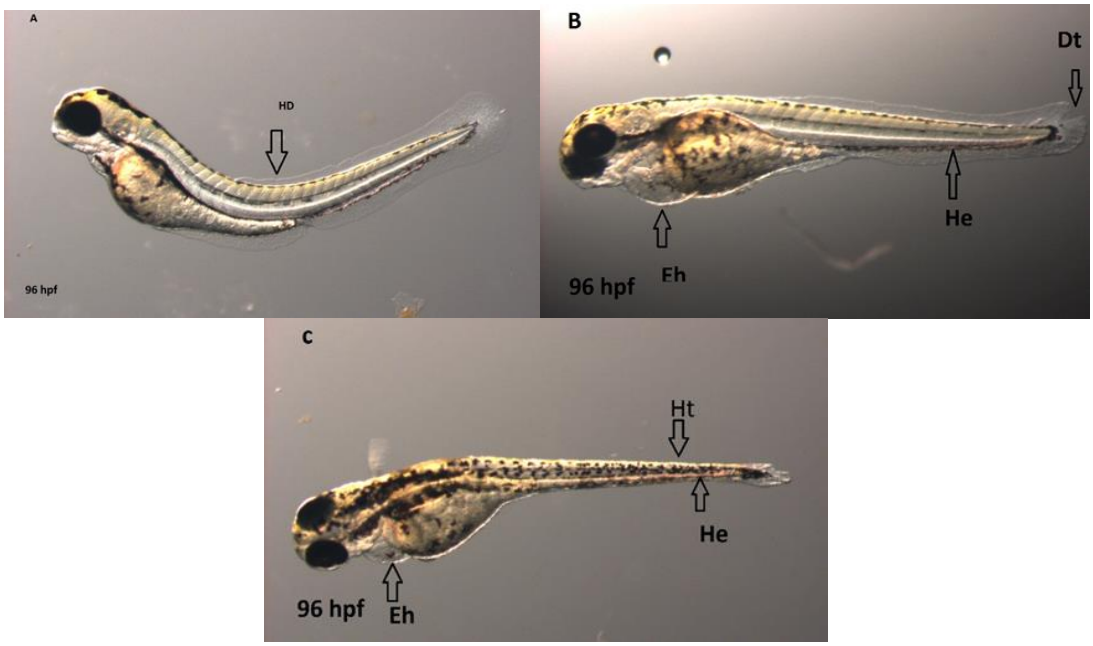
Grupların ≤48 hpf'deki erken gelişim safhasında gözlenen anomali oranları Şekil 3.8'de verilmiştir. $K_3Fe(CN)_6$ uygulanan grupta kardiyak ödem, hemoraji, omurga ve kuyruk malformasyonları ve pigmentasyon eksikliği görülmüştür (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). 96 hpf sonunda $K_3Fe(CN)_6$ uygulanan grupta sağlıklı birey oranının %26 olduğu görülmüştür.



Şekil 3.8 Emriyolardaki K3Fe(CN)6 anomali oranları



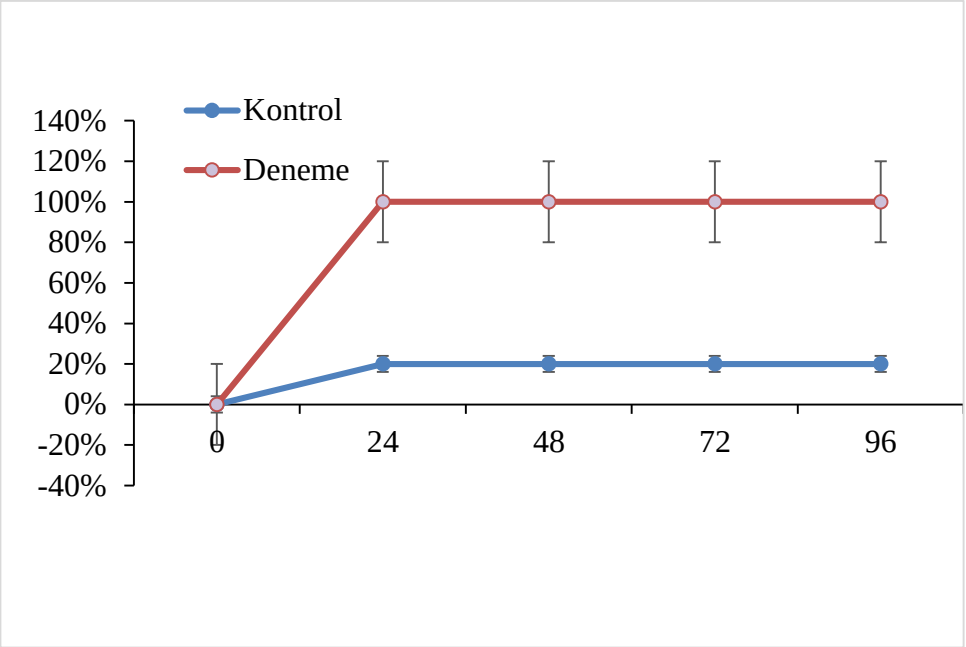
Şekil 3.9 K3Fe(CN)6 uygulanan zebra balığı embriyolarında 48 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Dt, kuyruk defromasyonu; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji).



Şekil 3.10 K3Fe(CN)6 uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Dt, kuyruk defromasyonu; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; He, hemoraji; Ht, kanca kuyruk; HD, Helesial vücut).

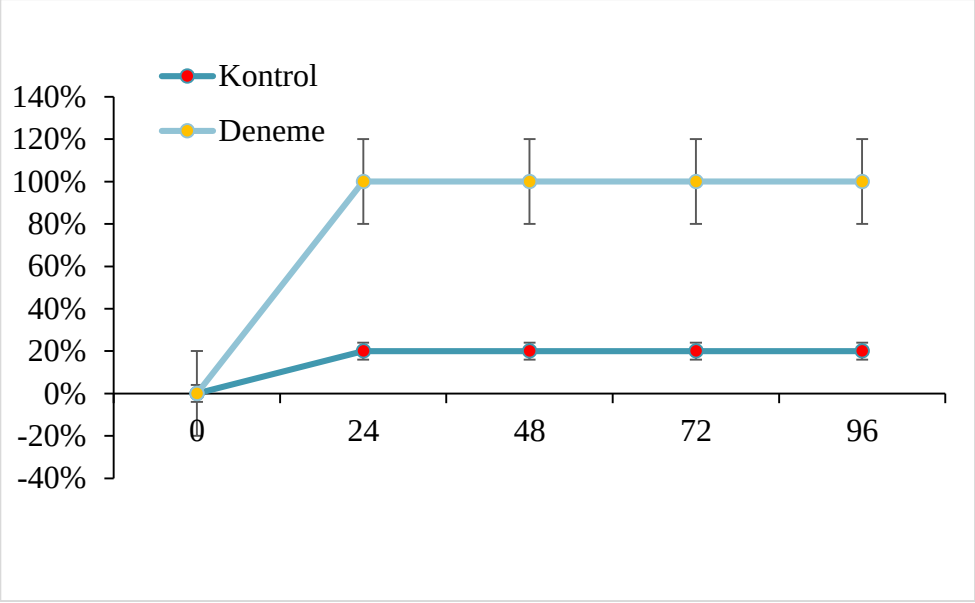
3.1.3 KCN Toksisitesi

KCN uygulanan gruptaki yumurtaların tamamı 24 hpf'de ölmüş ve mortalite oranı %100 olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.11). Bu nedenle herhangi bir anomali kaydı olmamıştır.



Şekil 3.11 Grupların KCN mortalite oranları

3.1.4 $CuSO_4$ Toksisitesi



Şekil 3.12 Grupların CuSO4 mortalite oranları

$CuSO_4$ uygulanan gruptaki yumurtaların tamamı 24 hpf'de ölmüş ve mortalite oranı %100 olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.12). Bu nedenle herhangi bir anomali kaydı olmamıştır.

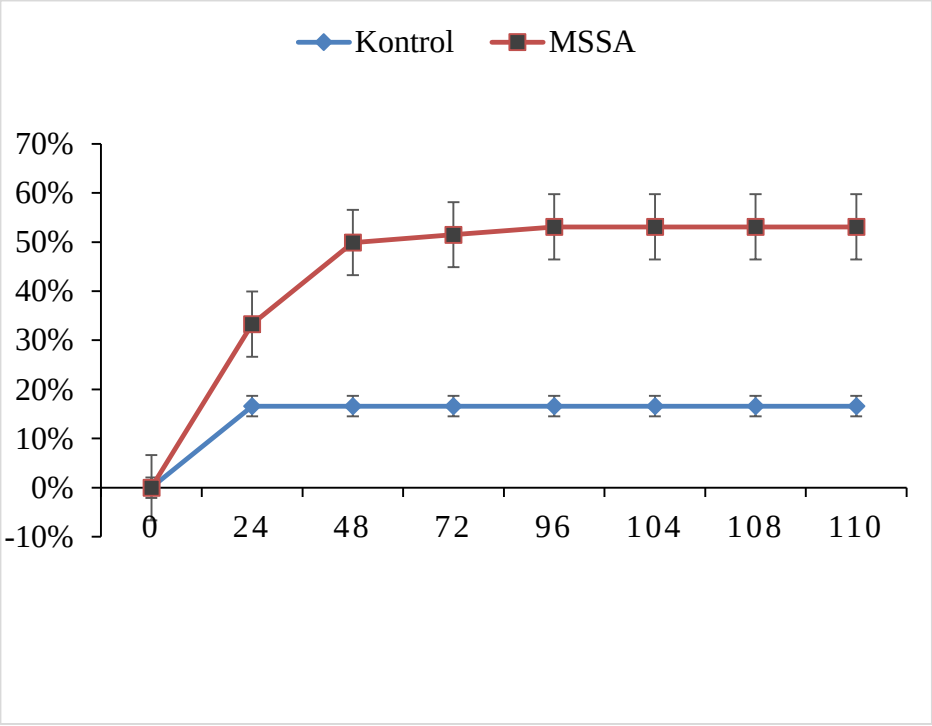
Ağır metal toksisite çalışma sonuçlarının özeti Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Ağır metal çalışması özet tablosu

Kimyasal	24hpf	48hpf	72hpf	96hpf	Toplam
FeClOH	20 ölüm	3 ölüm 5 çıkış (1 anomali)	20 çıkış (5 anomali)	2 ölüm 2 çıkış (2 anomali)	**50**
$K_3Fe(CN)_6$	20 ölüm	10 ölüm 5 çıkış (2 anomali)	2 ölüm 15 çıkış (6 anomali)	2 ölüm 5 anomali	**50**
KCN	50 ölüm	-	-	-	**50**
$CuSO_4$	50 ölüm	-	-	-	**50**
Kontrol	10 ölüm	8 hatched	32 çıkış	-	**50**

3.2 İnsan Patojeni Toksisite Sonuçları

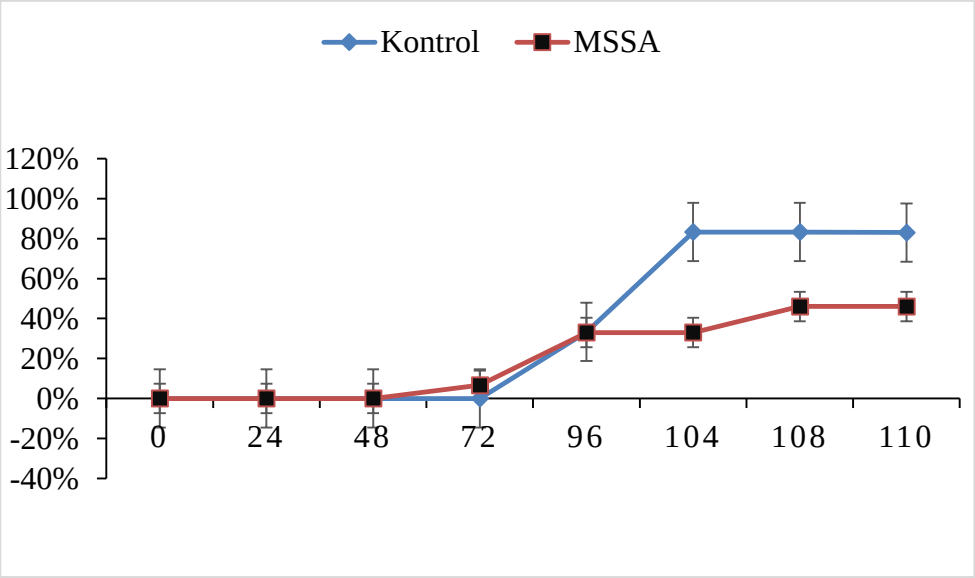
3.2.1 Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) Toksisitesi



Şekil 3.13 Grupların MSSA mortalite oranları

Yumurtalarda görülen mortalite oranları tüm örnekleme zamanlarında önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve çalışma sonunda mortalite oranı %53 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).

MSSA, embriyoların koryon zarından çıkma süreleri üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki tüm embriyolar 104 hpf'de yumurtadan çıkışlarını tamamlamışken, MSSA uygulanan gruptaki embriyolar 108 hpf'de aynı pozisyona gelmiştir. MSSA uygulanan grupta herhangi bir anomali görülmezken deneme sonunda embriyoların yumurtadan çıkış oranı %46 olarak kayıt edilmiştir (Şekil 3.14).



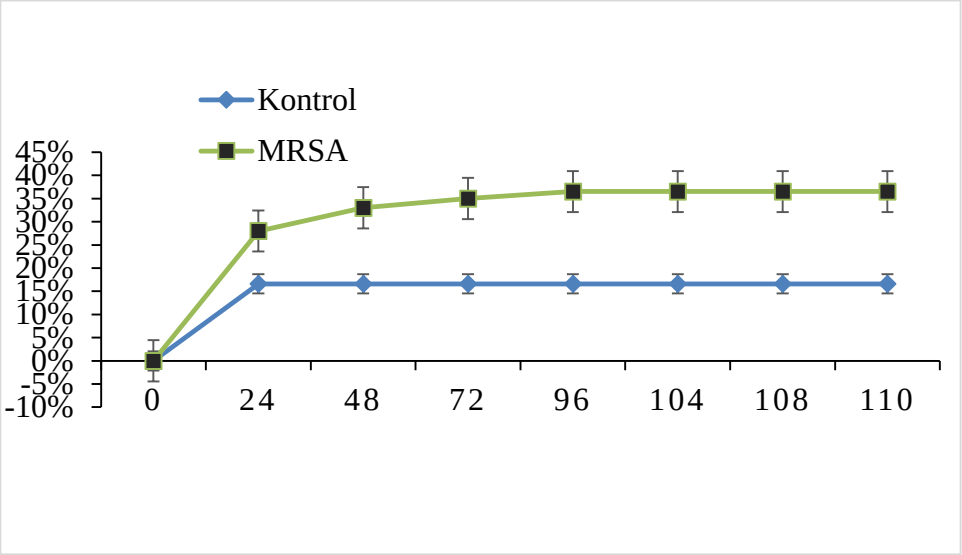
Şekil 3.14 Yumurtaların MSSA açılma oranları

3.2.2 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Toksisitesi

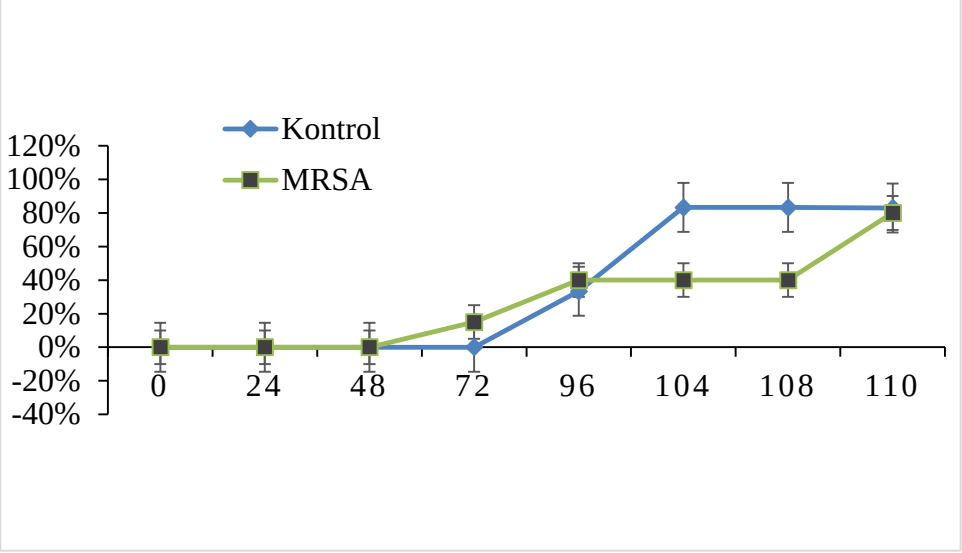
Yumurtalarda görülen mortalite oranları tüm örnekleme zamanlarında önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve çalışma sonunda mortalite oranı %37 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.15).

MRSA, embriyoların koryon zarından çıkma süreleri üzerinde 72 hpf'de olumlu etki gösterirken 96 hpf'de kontrol grubu ile aynı seviyeye gelmiştir. Kontrol grubunda 104 hpf'de tüm yumurtalar açılırken, 96 hpf'den 108 hpf'ye kadar olan aralıkta yumurta açılımı üzerine önemli düzeyde inhibe edici özellik göstermiş ($p<0,05$) ve

110 hpf'de MRSA uygulanan gruptaki yumurtalarında tamamı açılmıştır. Yumurtaların açılma oranları Şekil 3.16'da verilmiştir. MRSA uygulanan gruptaki embriyolarda yumurtadan çıkış oranı %80 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.15 Grupların MRSA mortalite oranları



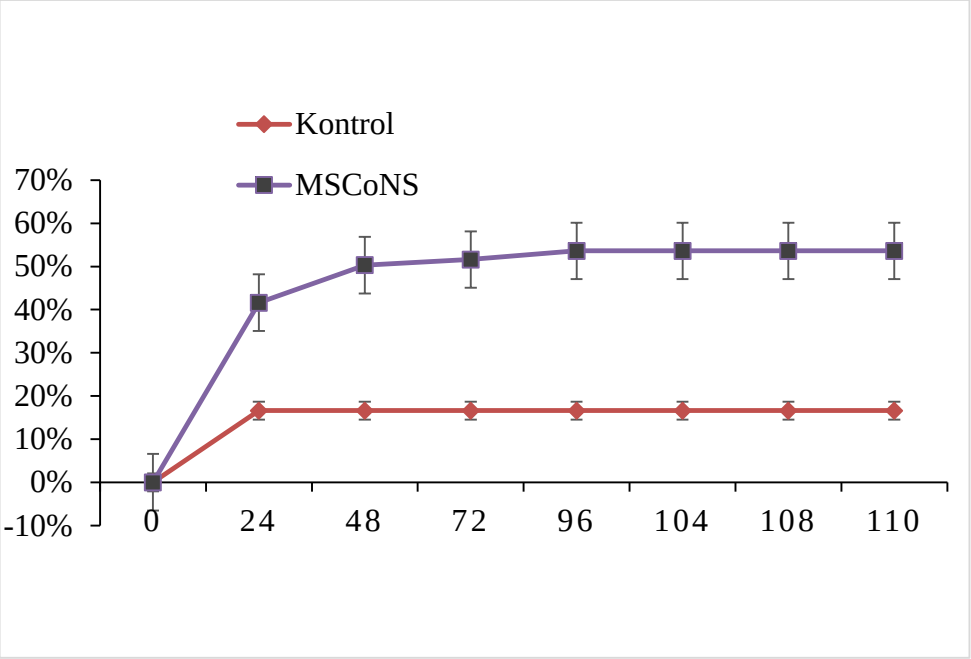
Şekil 3.16 Yumurtaların MRSA açılma oranları

3.2.3 Metisiline Duyarlı Koagülaz Negatif *Staphylococcus epidermidis* (MSCoNS) Toksisitesi

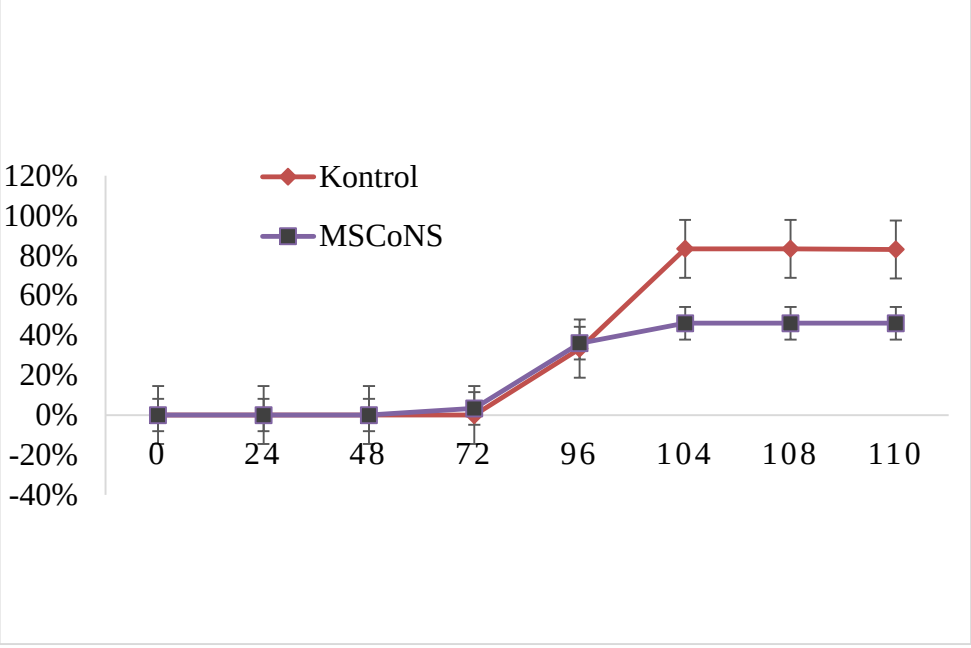
Yumurtalarda görülen mortalite oranları tüm örnekleme zamanlarında önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve 96 hpf sonunda mortalite oranı %54 olarak

gözlemlenmiştir (Şekil 3.17). MSCoNS, uygulanan gruptaki embriyoların yumurtadan çıkış oranı %46 olarak belirlenmiştir.

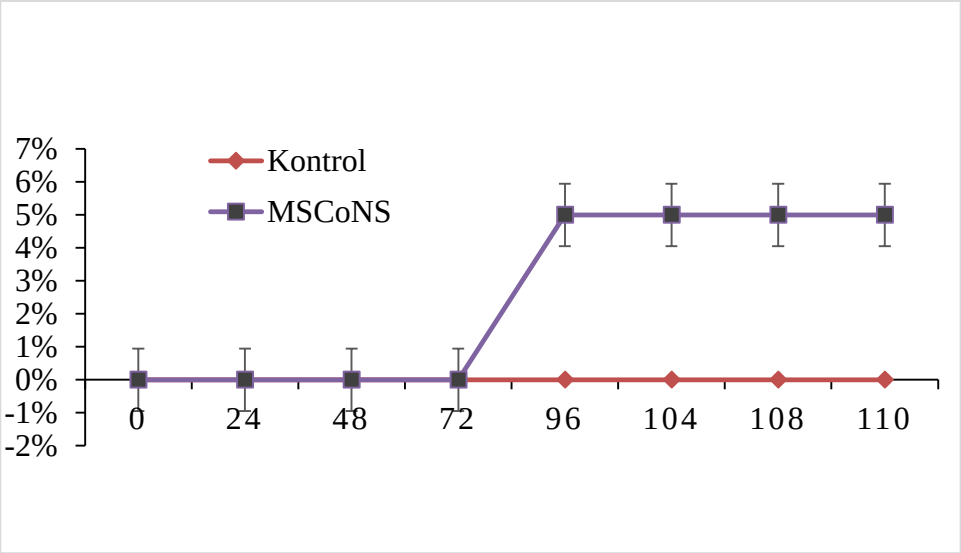
Embriyolarda 96 hpf'de anomaliler ve deformasyonlar görülmeye başlanmıştır. Deneme sonu anomali oranı %5 olmuştur (Şekil 3.19). Defekt olan embriyolarda ödem, kuyruk dejenerasyonu ve omurga deformasyonu görülmüştür (Şekil 3.20).



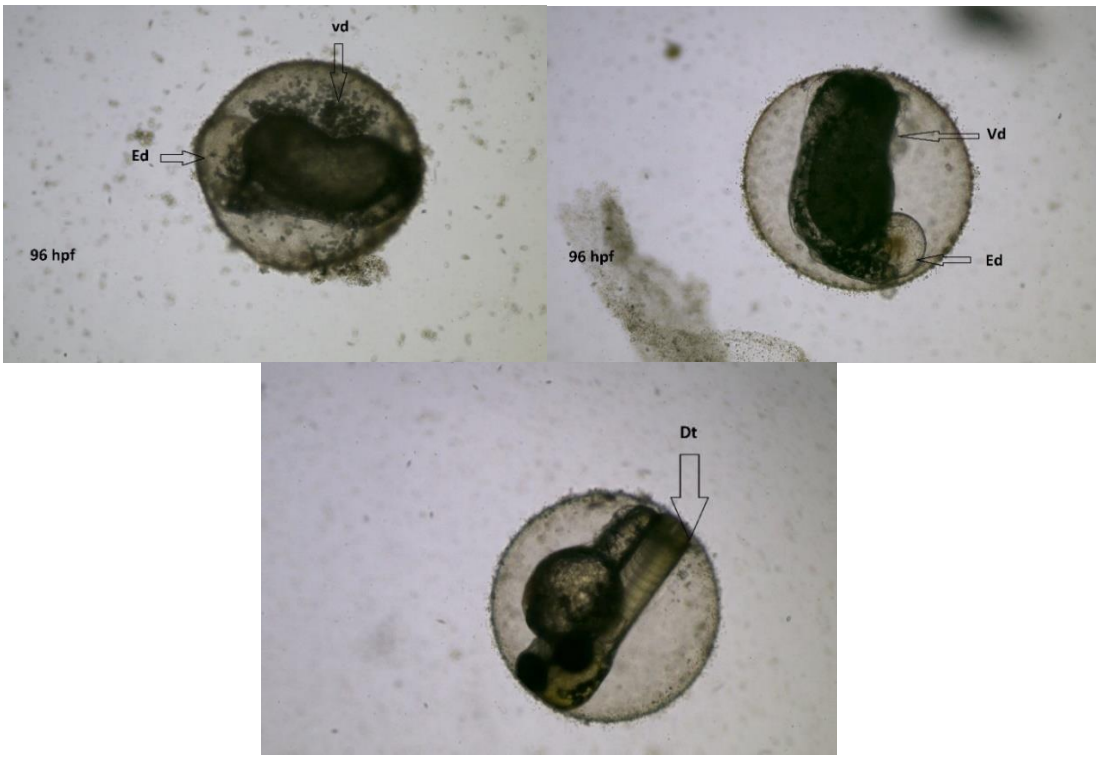
Şekil 3.17 Grupların MSCoNS mortalite oranları



Şekil 3.18 Yumurtaların MSCoNS açılma oranları



Şekil 3.19 Embriyolardaki MSCoNS anomali oranları



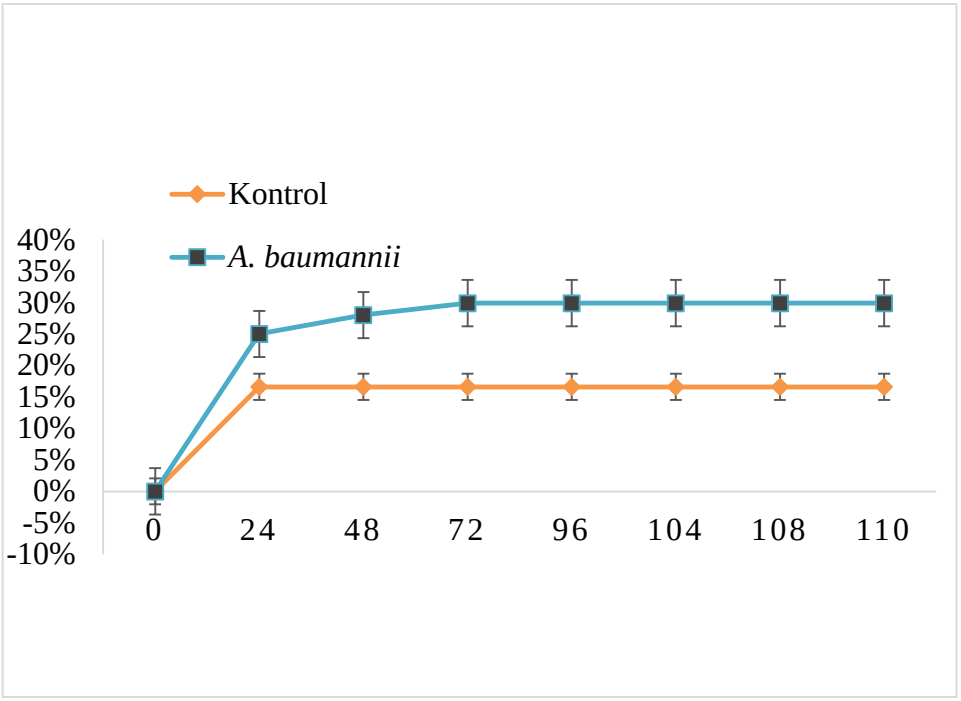
Şekil 3.20 MSCoNS uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Ed, ödem; Vd, omurga deformasyonu; Dt, kuyruk deformasyonu).

3.2.4 *Acinetobacter baumannii* Toksisitesi

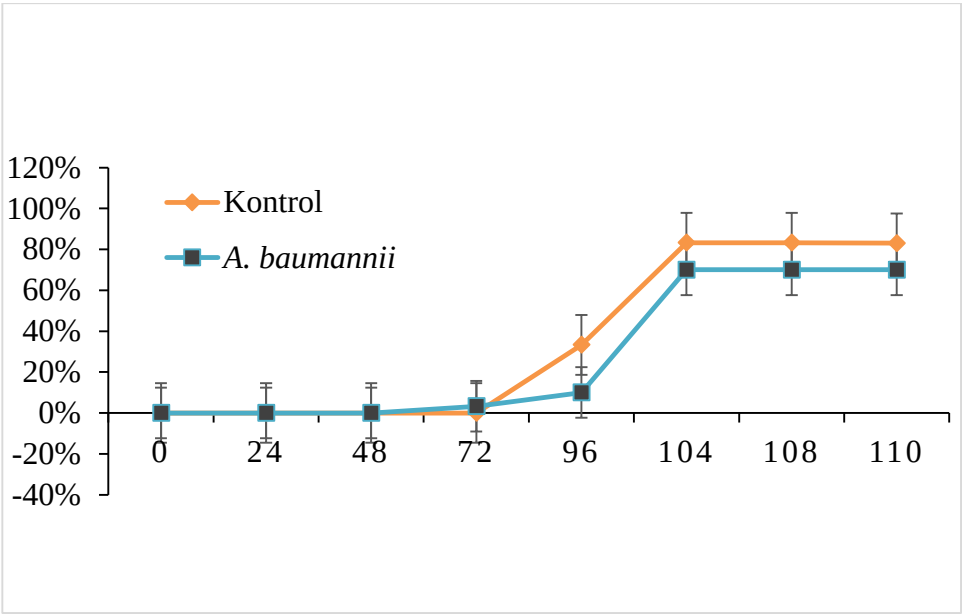
Yumurtalarda görülen mortalite oranları tüm örnekleme zamanlarında önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve 72 hpf'den 110 hpf sonuna kadar mortalite oranı %30 olarak değişmemiştir (Şekil 3.21). Yumurtadan çıkış oranlarında *A.baumannii*

uygulanan grup kontrol grubuna göre %13 eksik oranla 104 hpf sonunda %70 oranla çıkış sağlamıştır (Şekil 3.22).

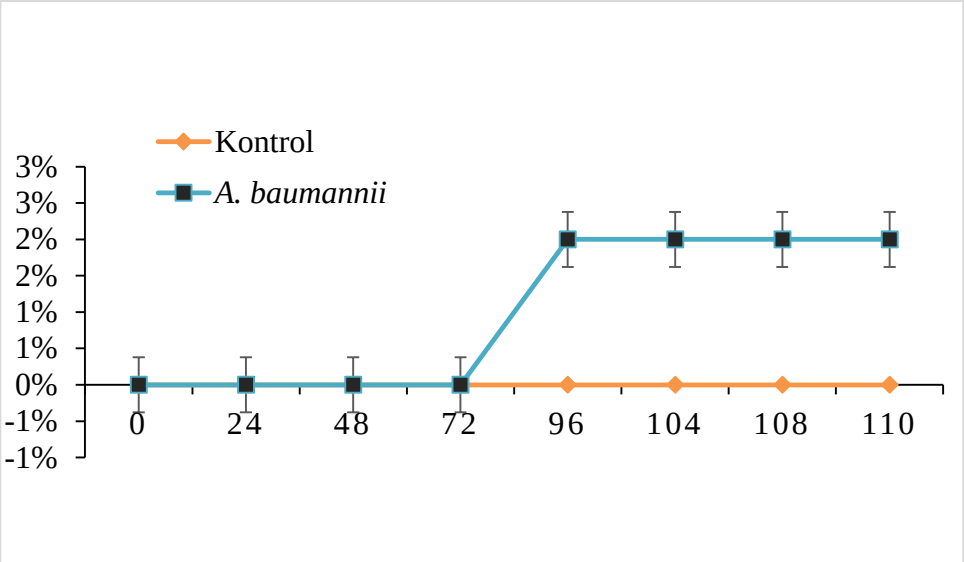
Acinetobacter baumannii uygulanan grupta deformasyon oranı %2 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.23). 96 hpf sonunda görülen sadece omurga deformasyonu olmuştur (Şekil 3.24).



Şekil 3.21 Grupların A. baumannii mortalite oranları



Şekil 3.22 Yumurtaların A. baumannii açılma oranları



Şekil 3.23 Embriyolardaki A. baumannii anomali oranları



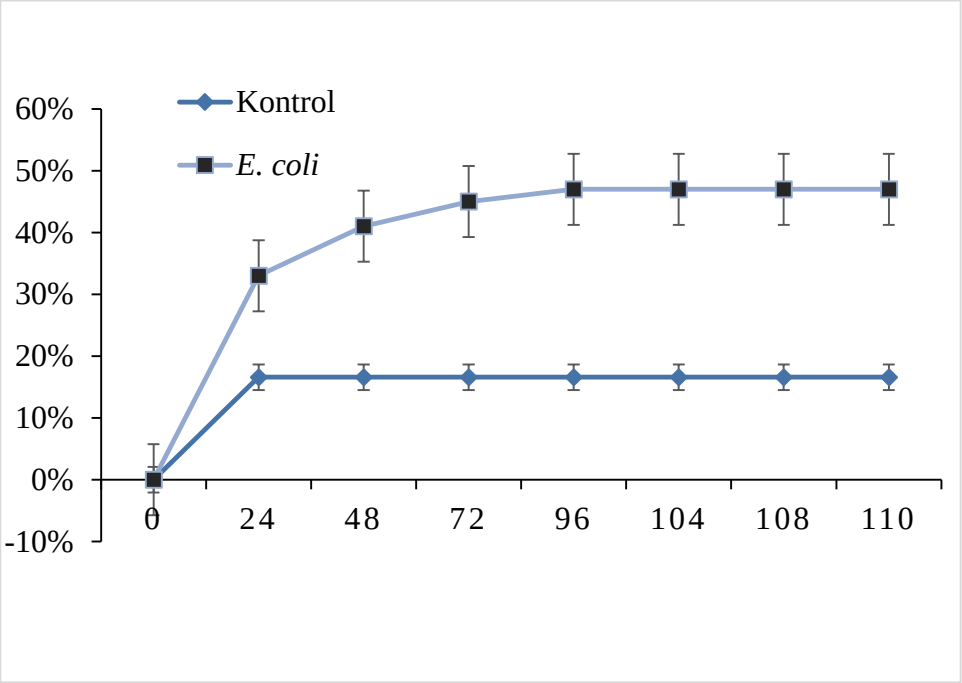
Şekil 3.24 baumannii uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Vd, omurga deformasyonu).

3.2.5 *Escherichia coli* Toksisitesi

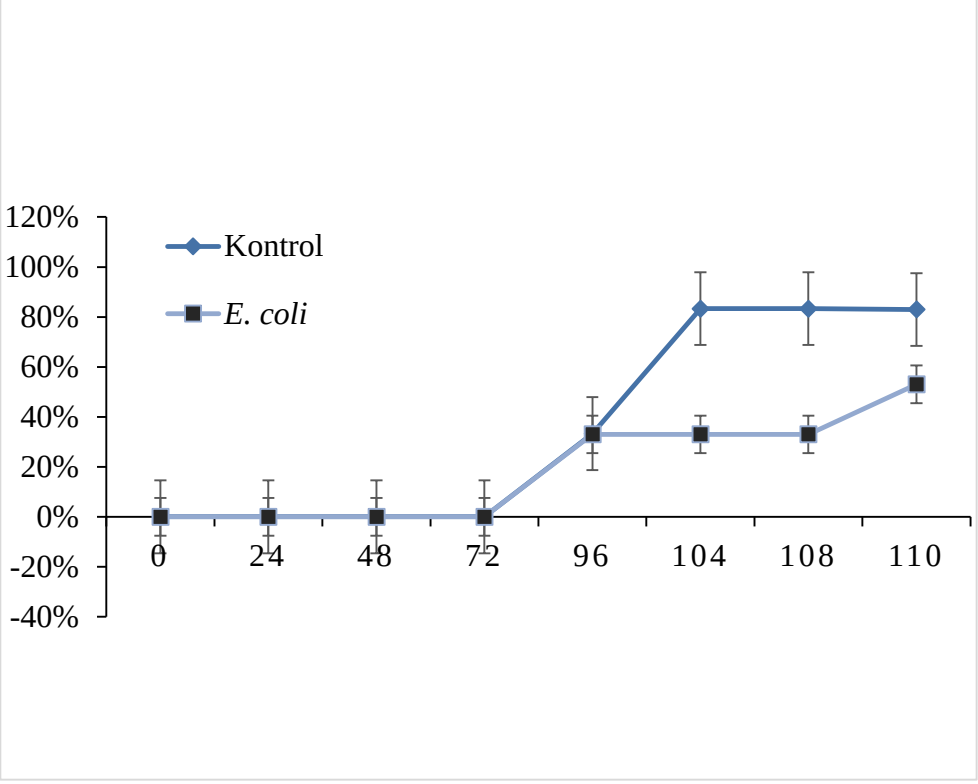
Yumurtalarda görülen mortalite oranları 24 hpf'den itibaren önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve 96 hpf'den 110 hpf sonuna kadar mortalite oranı %47 olarak değişmemiştir (Şekil 3.25).

E. coli embriyoların koriyon zarından çıkışlarını inhibe edici özellik göstermiştir. Yumuratdan çıkış oranı 96-108 hpf aralığında %33 olurken 110 hpf sonunda %53 ile tamamlanmıştır (Şekil 3.26).

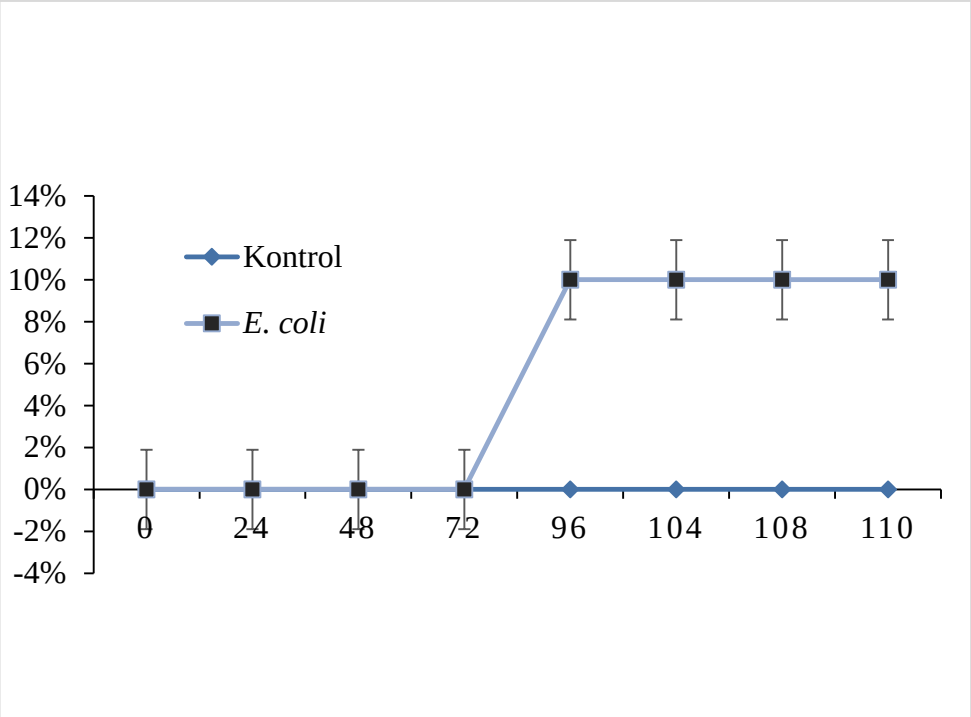
E. coli uygulanan grupta 96 hpf sonunda %10'a ulaşan anomali oranı çalışma sonuna kardar değişmemiştir (Şekil 3.27). Anomali olarak; skoliyosis, peteşiyal kardiyak ödem ve ödemler görülmüştür (Şekil 3.28).



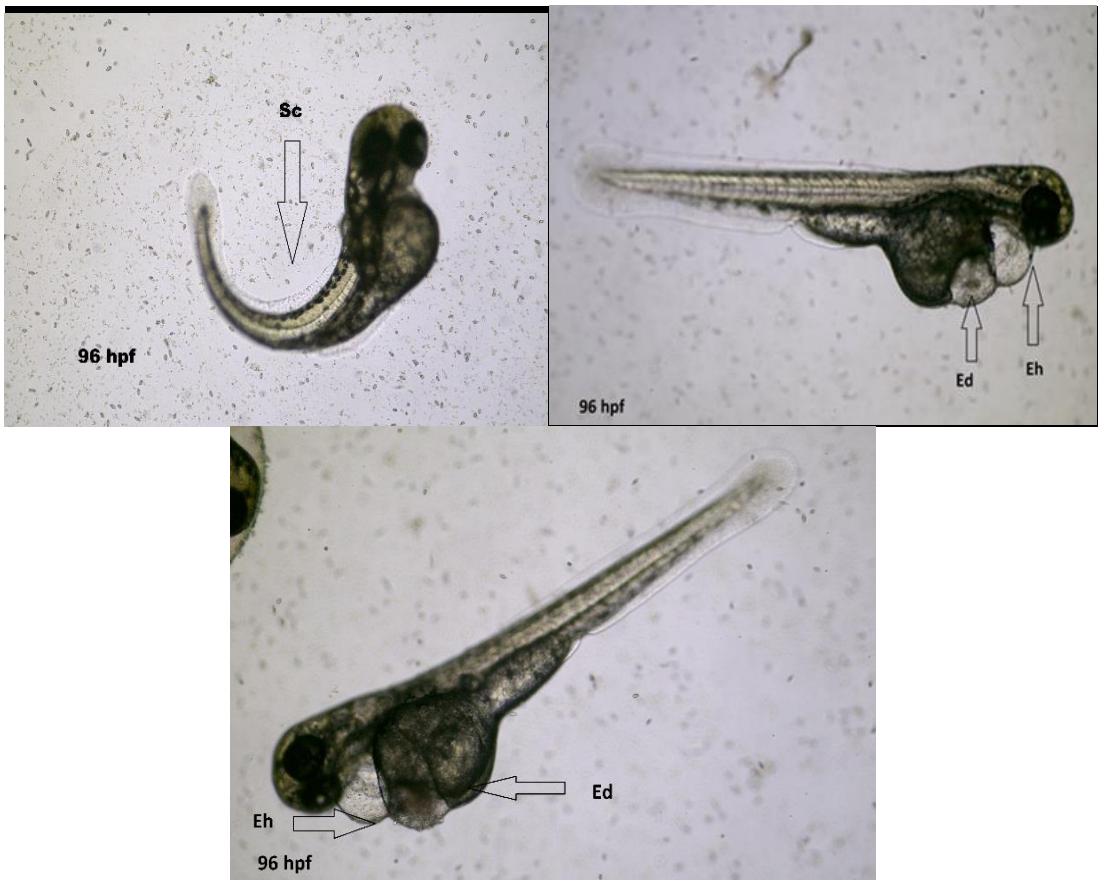
Şekil 3.25 Grupların E.coli mortalite oranları



Şekil 3.26 Yumurtaların E.coli açılma oranları



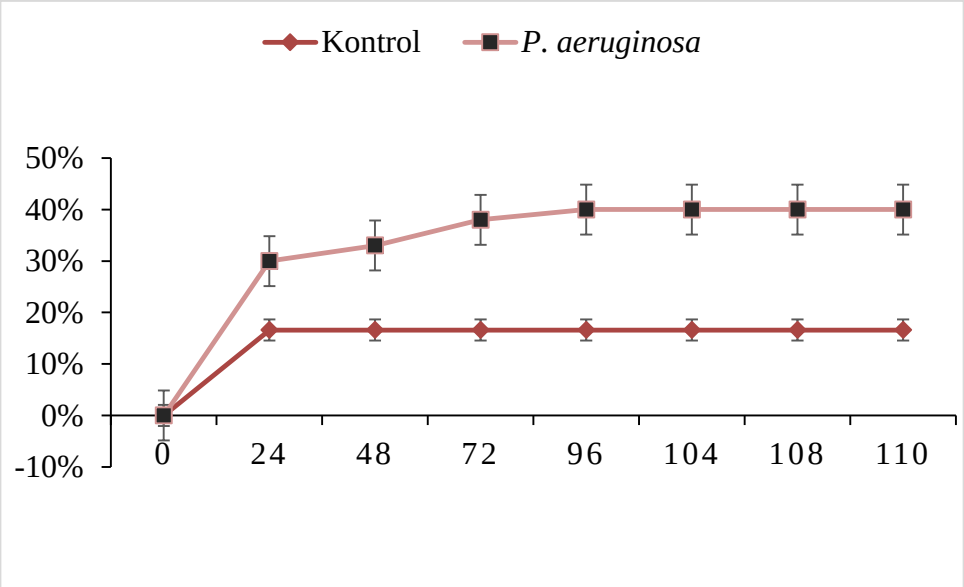
Şekil 3.27 Embriyolardaki E. coli anomali oranları



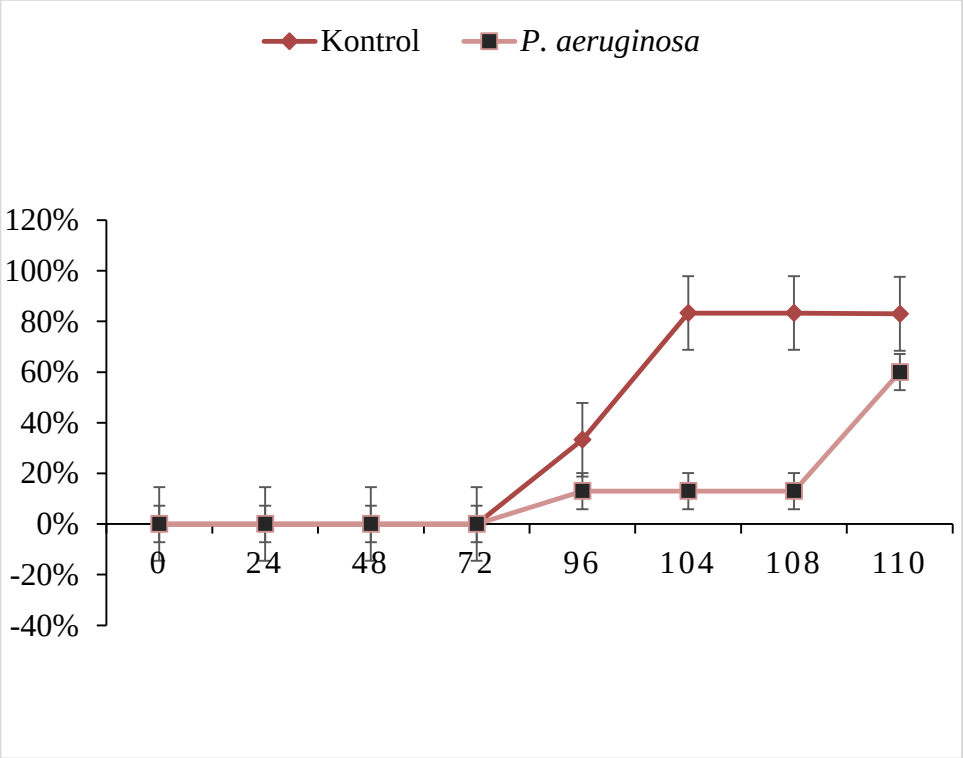
Şekil 3.28 *E. coli* uygulanan zebra balığı embriyolarında 96 hpf'de görülen anomaliler (Sc, skoliyosis; Eh, peteşiyal kardiyak ödem; Ed, ödem omurga deformasyonu).

3.2.6 *Pseudomonas aeruginosa* Toksisitesi

Yumurtalarda görülen mortalite oranları tüm örnekleme zamanlarında önemli ölçüde yüksek olmuş ($p<0,05$) ve deneme sonunda mortalite oranı %40 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29 Grupların P. aeruginosa mortalite oranları



Şekil 3.30 Yumurtaların P. aeruginosa açılma oranları

P. aeruginosa embriyoların koriyon zarından çıkışlarını inhibe edici özellik göstermiştir. Yumuratdan çıkış oranı 96-108 hpf süresinde %13 olurken 110 hpf sonunda %60 ile tamamlanmıştır (Şekil 3.30).

P. aeruginosa uygulanan grupta herhangi bir anomali gözlemlenmemiştir.

İnsan patojeni toksisite çalışma sonuçlarının özeti Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 İnsan patojeni çalışması özet tablosu

Bakteri	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Diğer	Toplam
MSSA	20 ölüm	10 ölüm	10 ölüm 16 çıkış	1 ölüm 16 çıkış	8 çıkış (108 hpf)	**60**
MRSA	17 ölüm	3 ölüm	1 ölüm 9 çıkış	1 ölüm 15 çıkış	24 çıkış (110 hpf)	**60**
MSCoNS	25 ölüm	5 ölüm	1 ölüm 2 çıkış	1 ölüm 20 çıkış (3 anomali)	6 çıkış (104 hpf)	**60**
A. baumannii	15 ölüm	2 ölüm	1 ölüm 2 çıkış	4 çıkış (1 anomali)	36 çıkış (104 hpf)	**60**
E. coli	20 ölüm	5 ölüm	2 ölüm	1 ölüm 20 çıkış (6 anomali)	12 çıkış (110 hpf)	**60**
P. aeruginosa	18 ölüm	2 ölüm	3 ölüm	1 ölüm 8 çıkış	28 çıkış (110 hpf)	**60**
Kontrol	10 ölüm	-	-	20 çıkış	30 çıkış (104 hpf)	**60**

Zebra balığının (*Danio rerio*) embriyonik gelişimi birkaç çalışmada anlatılmıştır. Zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, faringula ve kuluçka dönemleri olarak yedi geniş embriyogenez dönemini tanımlanmıştır. Normal olarak gelişen embriyo gelişimini dört günlük bir süre boyunca gösterir. Zebra balığı genetik bir model organizmadır (Kimmel vd., 1995). Zebra balığı embriyotoksisite testinde, birkaç ölümcül, yarı öldürücü ve teratojenite uç noktaları gözlenmiştir. OECD kimyasalları test etme yönergesine göre, balık embriyoları koagüle edildiğinde, somit oluşumu olmadığında, kuyruğun ayrılmadığında ve kalp atışı olmadığında ölü olarak kabul edilir. Balıkların embriyo aşaması kimyasallara ve kirleticilere karşı oldukça hassastır. Embriyolar yarı geçirgen koruyucu membran koryon ile kaplandığından

dolayı bu zar embriyoyu tüm kimyasal penetrasyonlara karşı tam olarak koruyamamaktadır (Abdelkader vd., 2012).

Bu çalışma, su ekosistemlerinde yaygın olarak bulunan konsantrasyonlarda ağır metallere kısa süreli maruz kalmanın, zebra balığı embriyolarında önemli değişikliklere yol açtığını ve FeCIOH'in zebra balığı embriyoları üzerindeki toksisite olduğunu göstermiştir. Bu toksik etkiler; çeşitli anomaliler, kuluçkalanma süresinde uzama ve yumurta çıkış oranında düşüş ve mortalitenin artmasıdır. Bu durum Herrmann (1993)'ünde bildirdiği gibi, koryonun henüz sertleşmediği erken yaşam evrelerinde özellikle su kaynaklı kirletici maddelere duyarlı olduğunu göstermiştir. Yumuradan çıkış oranındaki düşüşünde yine koryon zarı ile ilişkili olduğu değerlendirilmiştir (Hassan ve Kwong, 2020). Koryonun iç zonunu bozan yumurtadan çıkma enzimi olan korionazın salgılanması veya aktivitesinin engellenmesi, daha yumuşak zonu ozmotik ve mekanik süreçlerle parçalanmak üzere dışarıda bırakmaktadır (Yamamoto ve Yamagami, 1975; Schoots vd., 1982). Çalışmamızda, Fe maruziyetinin, yumurtadan çıkma oranında azalma dahil olmak üzere embriyoların fizyolojik koşullarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Azalan yumurtadan çıkma oranının, Fe'nin koryona bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalarda, embriyonik ve larva balıklarında metal maruziyetini takiben yumurta kesesi ödemi, yumurta sarısı şeklindeki değişiklikler ve yumurta sarısı ile yumurta kesesi arasındaki boşluk olduğu bildirilmiştir (Cheng vd., 2000). Bu çalışmada ise embriyolarda 48 hpf'de ödem, anormal göz, kuyruk dejenerasyonu ve peteşiyal kardiyak ödem görülmüştür. 72 hpf'de Şekil 3.5'de görüleceği gibi anormal göz, kuyruk dejenerasyonu, peteşiyal kardiyak ödem, hemoraji ve omurga deformasyonu olmuştur. Bazı embriyolar tüm anormallikleri gösterirken, bazıları yalnızca 1 veya 2 anormallik göstermiştir.. Bu tür anomaliler, zebra balığı üzerinde demir oksit nanopartiküllerinin kullanıldığı diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (Oliveira vd., 2020). Fe, balıklar da dahil olmak üzere tüm omurgalılar için temel bir eser metaldir, ancak fazlasıyla zararlı olabilir. Fe'nin emilimi ve homeostazı, iki değerlikli metal taşıyıcı-1 (DMT1), Fe ile düzenlenmiş taşıyıcı-1 (IREG1) ve ferritin dahil olmak üzere bir Fe taşıma ve depolama proteinleri grubu tarafından düzenlenir (Hassan ve Kwong, 2020). Çalışmada gözlemlenen anormallikler, aşırı Fe seviyesinin bir sonucu olarak protein ve enzim

inhibisyonuna neden olan DNA sentezine bağlanabilir. Başka bir çalışmada, zebra balıklarının ağır metallere uzun süre maruz kalması, tüm dokularda DNA hasarına neden olduğuda bildirilmiştir (Marins vd., 2019).

Bu çalışmada, $K_3Fe(CN)_6$'ya maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında, mortalite oranında artma, yumurtadan çıkış oranında azalma ve anomaliler görülmüştür. Yumurtadan çıkış genellikle biyokimyasal (enzimatik), biyofiziksel (mekanik) ve ozmotik mekanizmalar kombinasyonunun bir sonucudur (Yamagami, 1981). Bu nedenle gözlenen inhibisyon $K_3Fe(CN)_6$ bileşiğinin bu mekanizmaların birden fazlası veya tümü üzerindeki etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir. Alternatif olarak yumurtadan geç çıkma, daha yavaş bir gelişim hızına bağlanabilir. Yumrutadan çıkış oranındaki azalma ise embriyolarda meydana gelen anormalilerle ilişkilendirilebilir. Şekil 3.10'da 48-72-96 hpf gözlemlerinde birçok anomalinin olduğu görülmüştür. Ayrıca görülen anomaliler zamana bağlı olarak artmıştır.

Bunun yanısıra yapısında CN bulunan KCN'nin de 0,5 mg/L dozunun zebra balıkalrı için aşırı düzeyde toksik olduğu görülmüş, 24 hdf süresinde uygulama yapılan grupta %100 ölüm tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda, 3 dpf süresinde zebra balığı embriyolarının 50±100 μM KCN'ye karşı oldukça dirençli olduğu ve daha sonra giderek daha duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (Sips vd., 2018). Zebra balığı embriyolarında siyanür uygulamasının etkileri, anoksi sırasında gözlemlenen etkilere çok benzerdir (Mendelsohn vd., 2008).

Zebra balığı yumuratalarında 0,5 mg/L $CuSO_4$ uygulanan grup 24 hpf süresinde %100 oranında ölmüştür. Çeşitli araştırmacılar tarafından balık gelişiminde 24 hpf dönemi "kritik pencereler" olarak adlandırılmaktadır (Schilling, 2002; Chow ve Cheng, 2003). $CuSO_4$ birçok alanda etkili bir dezenfektan olarak kullanılsa da çalışma sonuçları bakır sülfatın zebra balığı embriyoları üzerinde aşırı düzeyde toksik olduğu göstermiştir. Benzer olarak, CuO nanopartiküllerinin zebra balığı embriyolarında ölüm oranını ve malformasyon oranını artırırken, kuluçka ve kalp atış hızını düşürdüğü ve ayrıca embriyo ve larvalar üzerinde gelişimsel toksisiteye yol açtığını görülmüştür (Aksakal ve Çiltaş, 2019).

Duggan ve Mostowy (2018) tarafından, zebra balıklarına ile çeşitli patojen bakterilerin uygulandığı zebra balığı enfeksiyon hastlık modelleri geliştirilmiştir. $1x10^6$ CFU/mL dozunda MSSA uygulanan grupta 24 hpf süresinde mortalitenin arttığı ve zamana bağlı olarak kuluçka oranının düştüğü görülmüştür. Yumurtadan çıkma, zebra balığı embriyolarının gelişiminde çok önemlidir ve toksik maddelerin balıklar üzerindeki etkisini değerlendirmek için önemli bir nokta olarak kabul edilir (Sun ve Liu, 2017). $1x10^6$ CFU/mL MRSA uygulanan grupta 24 hpf süresinde mortalitede artışa neden olduğu fakat yumrutadan çıkma oranının yüksek olduğunu ve yumurtadan çıkan tüm embriyoların diğer patojenik bakterilere kıyasla anomali göstermediği tespit edilmiştir. Zebra balığı, memeli bağışıklık sistemine benzer iyi gelişmiş bir bağışıklık sistemine sahiptir (van der Sar vd., 2003). Bu durum MRSA'ya karşı savunmada doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin rolü olduğu kanaatini oluşturmuştur. *Staphylococcus aureus* bakterisi ile yapılan bir çalışmada embriyolarının tamamının 48 hpf süresi sonunda %100 oranında öldüğü bildilrilmiştir (Prajsnar vd., 2008). Ayrıca MRSA ve MSSA bakterilerinin patolojik etkileri, gelişmekte olan embriyonun 48 ve 73 dpf süresinde gözlenmiş fakat fenotipik deformite görülmemiştir (Rajaretinam ve Vincent, 2010).

Zebra balığı embriyolarına $1x\ 10^6$ CFU/mL dozunda MSCoNS uygulanan grupta mortalite oranının zamana bağlı olarak yüksek oranda arttığı ve yumurtadan çıkma oranının azaldığı görülmüştür. Bu durumun, MSCoNS bakterisinin büyüme hormonlarını inhibe ettiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Enfekte embriyoların 96 hpf süresinde baş, yumurta kesesi ve kuyruk bölgesinde anormal doku oluşumu görülmüşütür. Bu uygulama MSCoNS bakterisi ile zebra balığı üzerinde yapılan ilk kapsamlı çalışmadır.

Acinetobacter baumannii hastalığının yaşamı en çok tehdit eden formlarından biri kan dolaşımı enfeksiyonudur (Peleg vd., 2008). *A. baumannii* zebra balığında doğal bir patojeni olduğu bilinmediğinden dolayı deneysel olarak yapılan başka bir çalışmada 300 CFU miktarının bile balıkları yüksek oranda hasta ettiği ve öldürdüğü bildirilmiştir (Bhuiyan vd., 2016). Bu çalışmada *A.baumannii* uygulanan grupta 96 hpf süresinde görülen anomali oranı MSCoNS ve *E.coli* uygulanan gruplardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Escherichia coli K46 suşunun, zebra balığı embriyosunda oldukça ölümcül olmasının nedeni enfeskiyon mekanizmasında kan dolaşım sistemini kullanabilmesinden kaynaklanmaktadır (Kjelstrup vd., 2017). Bu çalışmada *E. coli* bakterisinin $1x10^6$ CFU/mL dozunun zebra balığında ölüm oranını artırdığı görülmüştür. Ayrıca, 96 hpf süresinde görülen malformasyon, ödem, peteşiyal kardiyak ödem ve skoliyois oranı MSCoNS ve *A.baumannii* uygulanan gruplardan daha yüksek olmuştur. Skoliyosis, bozulmuş iyonik regülasyondan (Khayatzadeh ve Abbasi, 2010) veya vertebral kolon hasarından (Jezierska vd., 2000) kaynaklanmış olabilir.

Pseudomonas aeruginosa, kistik fibrozlu hastalarda önemli bir ölüm nedenidir, 30 CFU/embriyo dozunda bile zebra balığı için öldürücü olmuştur (Kumar vd., 2018) Bu çalışmada, $1x10^6$ CFU/mL *P. aeruginosa* dozu zebra balığı embriyoları için öldürücü olmuştur. Bakteri uygulamasını müteakip 24hpf süresinden itibaren embriyoların yaşama oranı kademeli olarak azalmıştır. Bu durum zebra balığı embriyolarında *P. aeruginosa* bakterisine karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin rolü olduğunu düşündürmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zebra balığı model organima olarak, bir kimyasalın toksisitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ağır metal toksisite testlerinde; zebra balığının embriyolojik gelişimi aşamasında FeCIOH ve $K_3Fe(CN)_6$ bileşiklerinin; embriyolarda toksisiteye neden olduğu, yumurtadan çıkış süresini uzattığı ve/veya birçok farklı malformasyonlara neden olduğu görülmüştür.

İnsan patojeni toksisite testlerinde; MRSA, MSSA ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin toksisiteye neden olduğu ve yumurtadan çıkış süresine etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca MSCoNS, *Acinetobacter baumannii*, ve *Escherichia coli* bakterilerinin ise toksisiteye neden olduğu ve yumurtadan çıkış süresine etkili olmasının yanısıra birçok farklı malformasyonlara neden olduğu da görülmüştür. İnsan patojeni toksisite testlerinde elde edilen bulgular bazı bakterilere karşı zebra balığının doğuştan bağışıklığa sahip olabileceği yönünde ibareler karşımıza çıkarmıştır.

Çalışmanın geneli değerlendirildiğinde; zebra balığı (*Danio rerio*) yumrutalarında embriyonun erken gelişim safhalarında ağır metallerin insan patojeni olan bakterilerden daha fazla toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*, *19*(2), 164-174.

Abdelkader, T.S., Seo-Na, C., Tae-Hyun, K., Juha, S., Dongso, K., & Park, J.H. (2012). Teratogenicity and brain aromatase-induction of monosodium glutamate in estrogen-responsive mosaic transgenic zebra fish *Danio rerio*. *African Journal of Biotechnology*, *11*(48), 10816-10823.

Aksakal, F.I. & Çiltaş, A. (2018). Developmental toxicity of penconazole in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 200, 8-15.

Aksakal, F.I. & Çiltaş, A. (2019). Impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) exposure on embryo development and expression of genes related to the innate immune system of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 223, 78-87.

Akyıldız, B.N., Kurtoğlu, S., Kondolot, M. & Tunç, A. (2010). Cyanide poisoning caused by ingestion of apricot seeds. *Annals of Tropical Paediatrics*, *30*(1), 39-43.

Al-Ani, L.M., Ghreeb, M.R., Mahmood, H.M. & Aldahham, B.J.M. (2020). Teratogenicity of pyocyanin pigment ısolated from local *Pseudomonas aeruginosa* isolates on mice neural tube defects (NTDs) and other abnormities. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(7), 600-604.

Albretsen, J. (2006). The toxicity of iron, an essential element. *Veterinary Medicine-Bonner Springs then Edwardsville-*, 101(2), 82.

Alkhunni, S.B.A., Gaballah, M.S.M. & Gültepe, N. (2017). Pathogenic bacteria for human and fish isolated from fish farm in Kastamonu, Turkey. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, *6*(3), 00157.

Almasaudi, S.B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(3), 586-596.

Al-Sulimani, M.M., Kelany, A.M., Ahmad, W., Omar, A.M.S. & ElShazly, H. (2018). Structural destabilization in renal and hepatic cells and tissues subjected to $CuSO_4$ toxicity in male mice. *Journal of Medical and Biomedical Discoveries: JMBD-106*, doi, 10.29011/JMBD-106.100006.

Araya, M., Olivares, M. & Pizarro, F. (2007). Copper in human health. *International Journal of Environment and Health*, *1*(4), 608-620.

Asensio, A., Ramos, A., Cuervas- Mons, V., Cordero, E., Sánchez- Turrión, V., Blanes, M., vd. (2008). Effect of antibiotic prophylaxis on the risk of surgical site infection in orthotopic liver transplant. *Liver Transplantation*, *14*(6), 799-805.

Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., vd. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 69, e4196.

Awayid, H.S., Esaa, R.H., Naji, E.N. & Jasem, M.A. (2017). The innovative method for vaccine preparation against multidrug resistant and virulence *Acinetobacter baumannii* Iraqi isolates. *Baghdad Science Journal*, *14*(4), 717-726.

Basu, A., Biswas, D. & Mukherjee, A. (2013). Genotoxicity testing of two anticaking agents: Sodium and potassium ferrocyanide in vitro. *International Journal of Human Genetics*, *13*(1), 21-25.

Baud, F.J., Borron, S.W., Mégarbane, B., Trout, H., Lapostolle, F., Vicaut, E., vd. (2002). Value of lactic acidosis in the assessment of the severity of acute cyanide poisoning. *Critical Care Medicine*, *30*(9), 2044-2050.

Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A.W. & Köck, R. (2017). *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *International Journal of Medical Microbiology*, *307*(1), 21-27.

Bennett, K. & Sharp, S.E. (2008). Rapid differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from blood cultures by use of a direct cefoxitin disk diffusion test. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(11), 3836-3838.

Bentley, R. & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, *46*(3), 241.

Bert, F., Galdbart, J.O., Zarrouk, V., Mée, J.L., Durand, F., Mentré, F., vd. (2000). Association between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and infection in liver transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, *31*(5), 1295-1299.

Bhasin, G., Kauser, H. & Athar, M. (2002). Iron augments stage-I and stage-II tumor promotion in murine skin. *Cancer Letters*, *183*(2), 113-122.

Bhuiyan, M.S., Ellett, F., Murray, G.L., Kostoulias, X., Cerqueira, G.M., Schulze, K.E., vd. (2016). *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(34), 9599-9604.

Brand, M., Granato, M. & Nüsslein-Volhard, C. (2002). *Keeping and raising zebrafish*. In Zebrafish: A Practical Approach, IRL Press.

Burgess, H.A. & Granato, M. (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *Journal of Experimental Biology*, *210*(14), 2526-2539.

Campos, S., Caramori, M., Teixeira, R., Afonso J.J., Carraro, R., Strabelli, T., vd. (2008). Bacterial and fungal pneumonias after lung transplantation. *Transplantation Proceedings*, *40*(3), 822-824.

Carpio, Y. & Estrada, M. P. (2006). Zebrafish as a genetic model organism. *Biotecnología Aplicada*, *23*(4), 265-270.

Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D.P., Best, J., Coscolla, J., vd. (2011). The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, *8*(3), 141-146.

Chakraborty, P. (2005). *A Textbook of Microbiology*. New Central Book Agency.

Chandrasekar, P.H. & Brown, W.J. (1994). Clinical issues of blood cultures. *Archives of Internal Medicine*, *154*(8), 841-849.

Chen, Y.J., Chen, P.A., Chen, C.J. & Huang, Y.C. (2019). Molecular characteristics and clinical features of pediatric methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in a medical center in northern Taiwan. *BMC Infectious Diseases*, *19*(1), 402.

Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. & Wu, R.S.S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium- induced deformities in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *19*(12), 3024-3031.

Chow, E.S.H. & Cheng, S.H. (2003). Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicological Sciences*, *73*(1), 149-159.

Cosgrove, S.E., Sakoulas, G., Perencevich, E.N., Schwaber, M.J., Karchmer, A.W. & Carmeli, Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *36*(1), 53-59.

Crossman, L.C., Chaudhuri, R.R., Beatson, S.A., Wells, T.J., Desvaux, M., Cunningham, A.F., vd. (2010). A commensal gone bad: Complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of Bacteriology*, *192*(21), 5822-5831.

Crossley, K.B., Jefferson, K.K., Archer, G.L., & Fowler J.V.G. (2009). *Staphylococci in Human Disease*. John Wiley & Sons.

Cuny, C., Nathaus, R., Layer, F., Strommenger, B., Altmann, D. & Witte, W. (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PloS One*, *4*(8), 6800.

Daya, S., Walker, R.B. & Anoopkumar-Dukie, S. (2000). Cyanide-induced free radical production and lipid peroxidation in rat brain homogenate is reduced by aspirin. *Metabolic Brain Disease*, *15*(3), 203-210.

Dhas, P.K., Chitra, P., Jayakumar, S. & Mary, A. R. (2011). Study of the effects of hydrogen cyanide exposure in Cassava workers. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *15*(3), 133-136.

Dijkshoorn, L., Nemec, A. & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(12), 939-951.

Ding, M. & Wang, K. (2018). Determination of cyanide in bamboo shoots by microdiffusion combined with ion chromatography–pulsed amperometric detection. *Royal Society Open Science*, *5*(4), 172128.

Dube, P.N., Alavandi, S. & Hosetti, B.B. (2013). Effect of exposure to sublethal concentrations of sodium cyanide on the carbohydrate metabolism of the Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *33*(7), 914-919.

Durão, D., Fernandes, A.P., Marum, S., Marcelino, P., & Mourão, L. (2008). Cardiac tamponade secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pericarditis. *Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology*, *27*(7-8), 953-958.

Duggan, G.M. & Mostowy, S. (2018). Use of zebrafish to study Shigella infection. *Disease Models & Mechanisms*, *11*(2), dmm032151.

Durão, D., Fernandes, A. P., Marum, S.

Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C. & Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences, 2*(5), 112-118.

Dzombak, D.A., Ghosh, R.S. & Wong-Chong, G.M. (2005). *Cyanide in Water and Soil: Chemistry, Risk, and Management*. CRC, Taylor & Francis Group.

Ebringer, A. (2015). *An Ante-Mortem Test for Bovine Spongiform Encephalopathy Involving "Myelin-Acinetobacter-Neurofilaments"(MAN) Tested in 12 Strains of Acinetobacter Bacteria. In Multiple Sclerosis, Mad Cow Disease and Acinetobacter*. Springer.

Emhemed, A.M.A., Gaballah, M.S.M. & Gültepe, N. (2017). Microbiological and physicochemical characteristics of Karaçomak Dam Lake in Kastamonu. *Advances in Ecological and Environmental Research,* 2(10), 395-403.

Esaa, R.H., Naji, E.N.N., Awayid, H.S. & Al-Kadmy, I.M.S. (2016). Comparison of three diagnostic methods for *Acinetobacter baumannii* hospitals. *Advances in Environmental Biology*, *10*(8), 87-93.

Etienne, J., Renaud, F., Bes, M., Brun, Y., Greenland, T. B., Freney, J., & Fleurette, J. (1990). Instability of characteristics amongst coagulase-negative staphylococci causing endocarditis. *Journal of Medical Microbiology*, *32*(2), 115-122.

Favre, B., Hugonnet, S., Correa, L., Sax, H., Rohner, P., & Pittet, D. (2005). Nosocomial bacteremia clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *26*(8), 697-702.

Fass, R.J., Helsel, V.L., Barnishan, J. & Ayers, L.W. (1986). In vitro susceptibilities of four species of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *30*(4), 545-552.

Fey, P.D. & Olson, M.E. (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, *5*(6), 917-933.

Fine, J.S. (2000). Iron poisoning. *Current Problems in Pediatrics*, *30*(3), 71-90.

Flora, S.J.S., Mittal, M. & Mehta, A. (2008). Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, *128*(4), 501-523.

Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., DeBoy, R.T., Ravel, J., vd. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2426-2438.

Gültepe, M.İ., Bulut, M. & Gültepe, N. (2018). Inter-species compatibility of the microbial flora of three trout species on the same culture condition. *Asian-Pacific Aquaculture 2018*, 23-26 April 2018, Taipei, Taiwan.

Gültepe, N. & Aydın, S. (2009). *Pseudomonas elongata* infection in scattered mirror carp (*Cyprinus carpio*): Bacteriology, gross pathology and treatment. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(5), 835-838.

Gonzales J.J.M. & Law, S.H.W. (2013). Feed and feeding regime affect growth rate and gonadosomatic index of adult zebrafish (*Danio rerio). Zebrafish*, *10*(4), 532-540.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., vd. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development, 123*(1), 1-36.

Hantson, P., N'Geye, P., Laforge, M., Clemessy, J.L. & Baud, F. (1996). Suicide attempt by ingestion of potassium ferricyanide. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, *34*(4), 471-473.

Haq, M.U. (2013). The toxicity of perfluoroalkyl acids in zebrafish (*Danio rerio*). *Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden*.

Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M. & Dameron, C.T. (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(1), 29-32.

Hashimyousif, E., Obaid, H.M., Karim, A.J., Hashim, M.S. & Naimi, R.A. (2019). Toxico pathological study of copper sulfate modulate by zinc oxide and *Coriandrum sativum* plant treatment in mice. *Plant Archives, 19*(1), 299-308.

Hassan, A.T. & Kwong, R.W.M. (2020). The neurophysiological effects of iron in early life stages of zebrafish. *Environmental Pollution*, 267, 115625.

Havaei, S.A., Vidovic, S., Tahmineh, N., Mohammad, K., Mohsen, K., Starnino, S. & Dillon, J.A.R. (2011). Epidemic methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages are the main cause of infections at an Iranian university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(11), 3990-3993.

Hawk, M.A., Ritchie, G.D., Henderson, K.A., Knostman, K.A.B., Roche, B.M., Ma, Z.J., vd. (2016). Neurobehavioral and cardiovascular effects of potassium cyanide administered orally to mice. *International Journal of Toxicology*, *35*(5), 604-615.

Herrmann, K. (1993). Effects of the anticonvulsant drug valproic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicology in Vitro*, *7*(1), 41-54.

Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, *86*(1), 6-19.

Hovelius, B. & Mårdh, P.-A. (1984). *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. *Reviews of Infectious Diseases*, *6*(3), 328-337.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., vd. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498-503.

Huang, Y., Zhou, Q., Wang, W., Huang, Q., Liao, J., Li, J., vd. (2019). *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: Clinical efficacy of combined antimicrobial therapy and in vitro drug sensitivity test results. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 92.

Hurrell, R. & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *91*(5), 1461-1467.

Hurrell, R F. (1997). Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition. Supplement*, 51(1), 4-8.

Igic, P.G., Lee, E., Harper, W. & Roach, K.W. (2002). Toxic effects associated with consumption of zinc. *Mayo Clinic Proceedings*, *77*(7), 713-716.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B. & Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, *7*(2), 60-72.

Jan, A.T., Ali, A. & Haq, Q.M.R. (2011). Glutathione as an antioxidant in inorganic mercury induced nephrotoxicity. *Journal of Postgraduate Medicine*, *57*(1), 72-79.

Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I. & Haq, Q.M. (2015). Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter

defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 29592-29630.

Jaruratanasirikul, S., Nitchot, W., Wongpoowarak, W., Samaeng, M. & Nawakitrangsan, M. (2019). Population pharmacokinetics and Monte Carlo simulations of sulbactam to optimize dosage regimens in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 136, 104940.

Jezierska, B., Lugowska, K., Witeska, M. & Sarnowski, P. (2000). Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, *3*(2), #01.

Jiménez, N., Senchenkova, S.N., Knirel, Y.A., Pieretti, G., Corsaro, M.M., vd. (2012). Effects of lipopolysaccharide biosynthesis mutations on K1 polysaccharide association with the *Escherichia coli* cell surface. *Journal of Bacteriology*, *194*(13), 3356-3367.

Johnson, A., Carew, E. & Sloman, K.A. (2007). The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, *84*(4), 431-438.

Joshi, M.R. (2020). Densities, refractive indices and specific refraction of potassium ferricynate (III) in acidic media at 29°C. *Research Review International Journal of Multidisciplinary*, 5(3), 2455–3085.

Juhi, T., Bibhabati, M., Archana, T., Poonam, L., & Vinita, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* meningitis in post neurosurgical patients. *Neurology Asia*, *14*(2), 95-100.

Jung, J. & Park, W. (2015). Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(6), 2533-2548.

Kanungo, J., Cuevas, E., Ali, S.F. & Paule, M.G. (2014). Zebrafish model in drug safety assessment. *Current Pharmaceutical Design*, *20*(34), 5416-5429.

Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123-140.

Khanam, S. (2014). Heavy metal contamination and health hazards: a review. *Trends Biotechnology and Biological Sciences*, 1, 5-8.

Khayatzadeh, J. & Abbasi, E. (2010). The effects of heavy metals on aquatic animals. *The 1st International Applied Geological Congress*, Department of Geology, Islamic Azad University–Mashad Branch, Iran, 1, 26-28.

Kim, K.S. (2016). Human meningitis-associated *Escherichia coli*. EcoSal Plus, *7*(1), doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., & Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, *203*(3), 253-310.

Kiska, D.L., Gilligan, P.H., Murray, P.R., Baron, E.J. & Pfaller, M.A. (1999). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM, Washington, DC.

Kjelstrup, C.K., Barber, A.E., Norton, J.P., Mulvey, M.A. & L'Abée-Lund, T.M. (2017). *Escherichia coli* O78 isolated from septicemic lambs shows high pathogenicity in a zebrafish model. *Veterinary Research*, *48*(1), 1-8.

Knoblauch, A.M., Farnham, A., Ouoba, J., Zanetti, J., Müller, S., Jean-Richard, V., vd. (2020). Potential health effects of cyanide use in artisanal and small-scale gold mining in Burkina Faso. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119689.

Kokaz, O.F. (2015). Detection of mec A gene in *Staphylococcus aureus* from osteomyelitis infections. *Al-Qadisiyah Medical Journal*, *11*(20), 184-189.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. & Winn, W.C. (1997). *Diagnostic microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli*. Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Kumar, S.S., Tandberg, J.I., Penesyan, A., Elbourne, L.D.H., Suarez-Bosche, N., Don, E., vd. (2018). Dual transcriptomics of host-pathogen interaction of cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa* PASS1 with zebrafish. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 406.

Küçükoğlu, M., Binokay, U.S. & Pekmezekmek, A.B. (2013). The effects of zinc chloride during early embryonic development in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Turkish Journal of Biology*, *37*(2), 158-164.

Laale, H.W. (1977). The biology and use of zebrafish *D. rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10, 121-173.

Laale, H.W. & Lerner, W. (1981). Teratology and early fish development. *American Zoologist*, *21*(2), 517-533.

Lalani, T., Kanafani, Z.A., Chu, V.H., Moore, L., Corey, G.R., Pappas, P., vd. (2006). Prosthetic valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: findings from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *25*(6), 365-368.

Lambiase, A., Piazza, O., Rossano, F., Del-Pezzo, M., Tufano, R., & Catania, M.R. (2012). Persistence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. *New Microbiologica*, *35*(2), 199-206.

Leavesley, H.B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L. & Isom, G.E. (2008). Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological Sciences*, *101*(1), 101-111.

Lee, K., Yong, D., Jeong, S.H. & Chong, Y. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Medical Journal*, *52*(6), 879-891.

Levitz, R. E., & Quintiliani, R. (1984). Trimethoprim-sulfamethoxazole for bacterial meningitis. *Annals of Internal Medicine*, *100*(6), 881-890.

Li, Y., Liu, Z., Xie, L., Kong, L. & Liu, S. (2007). Determination of potassium ferrocyanide in foods by resonance rayleigh scattering method with double-charged triaminotriphenylmethane dyes. *Chinese Journal of Chemistry*, *25*(7), 947-952.

Lin, M.F. & Chen, Y.L. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Treatment and outcome-An analysis of 56 episodes. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, *14*(3), 150-153.

Liu, P.Y., Shi, Z.Y. & Sheu, W.H.H. (2012). Malignant otitis externa in patients with diabetes mellitus. *Formosan Journal of Endocrinology and Metabolism*, *3*(1), 7-13.

Liu, Q., Zhang, G., Ding, J., Zou, H., Shi, H., & Huang, C. (2018). Evaluation of the removal of potassium cyanide and its toxicity in green algae (*Chlorella vulgaris*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *100*(2), 228-233.

Long, L., Han, Y., Yuan, X., Cao, S., Liu, W., Chen, Q., Wang, K., & Han, Z. (2020). A novel ratiometric near-infrared fluorescent probe for monitoring cyanide in food samples. *Food Chemistry*, 331, 127359.

Lynch III.J.P., Zhanel, G.G. & Clark, N.M. (2017). Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *38*(3), 311-325.

MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., & Padilla, S. (2009). Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, *30*(1), 52-58.

Mahurpawar, M. (2015). Effects of heavy metals on human health. *International Journal of Research - GRANTHAALAYAH*, 530, 1-7.

Manjunatha, B., Tirado, J.O. & Selvanayagam, M. (2015). Sub-lethal toxicity of potassium cyanide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Biochemical response. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *7*(3), 379-382.

Marins, K., Lazzarotto, L.M.V., Boschetti, G., Bertoncello, K.T., Sachett, A., Schindler, M.S.Z., vd. (2019). Iron and manganese present in underground water promote biochemical, genotoxic, and behavioral alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(23), 23555-23570.

Matthews, K.R., Roberson, J., Gillespie, B.E., Luther, D.A. & Oliver, S.P. (1997). Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, *60*(6), 686-688.

May, T.B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J.D., vd. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology Reviews*, *4*(2), 191-206.

Mendelsohn, B.A., Kassebaum, B.L. & Gitlin, J.D. (2008). The zebrafish embryo as a dynamic model of anoxia tolerance. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *237*(7), 1780-1788.

Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S. & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *Journal of Infection and Public Health*, *2*(3), 101-111.

Morais, S., Costa, F.G. & Pereira, M.L. (2012). Heavy metals and human health. *Environmental Health–Emerging Issues and Practice*, 10, 227-246.

Moubareck, C.A. & Halat, D.H. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, *9*(3), 119.

Nataro, J.P. & Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(1), 142-201.

Nicholls, A., Edward, N. & Catto, G. R. (1980). Staphylococcal septicaemia, endocarditis, and osteomyelitis in dialysis and renal transplant patients. *Postgraduate Medical Journal*, *56*(659), 642-648.

Obeidat, N., Jawdat, F., Al-Bakri, A.G. & Shehabi, A.A. (2014). Major biologic characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environmental and patients' respiratory tract sources. *American Journal of Infection Control*, *42*(4), 401-404.

Okolie, N.P. & Audu, K. (2004). Correlation between cyanide-induced decreases in ocular Ca^{2+}-ATPase and lenticular opacification. *Journal of Biomedical Sciences*, *3*(1), 37-41.

Oliveira, E.M.N., Selli, G.I., von Schmude, A., Miguel, C., Laurent, S., Vianna, M.R.M. & Papaléo, R.M. (2020). Developmental toxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings in zebrafish larvae. *Journal of Nanoparticle Research*, 22, 1-16.

Park, Y.K., Jung, S.I., Park, K.H., Kim, D.H., Choi, J.Y., Kim, S.H., & Ko, K.S. (2012). Changes in antimicrobial susceptibility and major clones of *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* complex isolates from a single hospital in Korea over 7 years. *Journal of Medical Microbiology*, *61*(1), 71-79.

Parmanand, B. (2019). The impact of iron on the function and composition of the human gut microbiota. *Faculty of Medicine and Health Sciences, Norwich Medical School, University of East Anglia, UK*.

Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H. & Ladner, J.E. (2007). Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, *46*(7), 1821-1828.

Peleg, A.Y., Seifert, H. & Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*(3), 538-582.

Percival, S.L. & Williams, D.W. (2014). *Legionella. In Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier.

Perkins, D.R., Hall, J.A., Lopez, L.M. & Cahuayme-Zuniga, L.J. (2018). Disseminated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Medical Microbiology*, *67*(1), 83-86.

Phippen, B., Horvath, C., Nordin, R. & Nagpal, N. (2008). *Ambient Water Quality Guidelines for Iron: Overview*. Ministry of Environment Province of British Columbia.

Prajsnar, T.K., Cunliffe, V.T., Foster, S.J. & Renshaw, S.A. (2008). A novel vertebrate model of *Staphylococcus aureus* infection reveals phagocyte-

dependent resistance of zebrafish to non- host specialized pathogens. *Cellular Microbiology*, *10*(11), 2312-2325.

Pollack, M. (1998). *Pseudomonas aeruginosa Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 978-0-323-40181-4, Elsevier.

Porgo, M. & Gokyay, O. (2017). Environmental impacts of gold mining in Essakane site of Burkina Faso. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *23*(3), 641-654.

Rajaretinam, R.K. & Vincent, S.G.P. (2010). Isolation of a novel bioactive compound from Rhizophora mucronata for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and compound toxicity assessment in zebra fish embryos. *Journal of Pharmacy Research*, *3*(8), 2000-2003.

Ramos, A., Asensio, A., Muñez, E., Torre-Cisneros, J., Montejo, M., Aguado, J. M., vd. (2008). Incisional surgical site infection in kidney transplantation. *Urology*, *72*(1), 119-123.

Ray, C.G. & Ryan, K.J. (2010). *Sherris Medical Microbiology* (Vol. 6). McGraw-Hill.

Regev-Yochay, G. (2019). Are methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriers protected from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections*? Clinical Microbiology and Infection*, *25*(1), 4-5.

Rehm, S.J. & Tice, A. (2010). *Staphylococcus aureus*: Methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(2), 176-182.

Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R. & Bonan, C.D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*, *32*(1), 116-122.

Rosenberg, M.L., Koplan, J.P., Wachsmuth, I.K., Wells, J O.Y.G., Gangarosa, E.J., vd. (1977). Epidemie diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*: A large waterborne outbreak. *Annals of Internal Medicine*, *86*(6), 714-718.

Ryan, T.P. & Aust, S.D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critical Reviews in Toxicology*, *22*(2), 119-141.

Ryan, K.J. & Ray, C.G. (2004). *Medical Microbiology*. McGraw-Hill.

Sabourin, P.J., Kobs, C.L., Gibbs, S.T., Hong, P., Matthews, C.M., Patton, K.M., Sabourin, C.L. & Wakayama, E.J. (2016). Characterization of a mouse model of oral potassium cyanide intoxication. *International Journal of Toxicology*, *35*(5), 584-603.

Saint-Amant, L. (2006). Development of motor networks in zebrafish embryos. *Zebrafish*, *3*(2), 173-190.

Saint- Amant, L. & Drapeau, P. (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of Neurobiology*, *37*(4), 622-632.

Sakoulas, G., Golan, Y., Lamp, K.C., Friedrich, L.V. & Russo, R. (2007). Daptomycin in the treatment of bacteremia. *The American Journal of Medicine*, *120*(10), 21-27.

Santoriello, C. & Zon, L.I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(7), 2337-2343.

Schilling, T.F. (2002). *The morphology of larval and adult zebrafish. In Zebrafish: A Practical Approach* (The Practical Approach Series, 261). Oxford University Press.

Schoots, A.F.M., Stikkelbroeck, J.J.M., Bekhuis, J.F. & Denucé, J.M. (1982). Hatching in teleostean fishes: Fine structural changes in the egg envelope during enzymatic breakdown in vivo and in vitro. *Journal of Ultrastructure Research*, *80*(2), 185-196.

Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Pattemore, P.K., Epton, M., Laing, R., Pearson, J. & Chambers, S.T. (2010). 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Medicine*, *10*(1), 56.

Shi, X., Du, Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S. & Zhou, B. (2008). Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *230*(1), 23-32.

Shwetha, A. & Hosetti, B.B. (2009). Acute effects of zinc cyanide on the behaviour and oxygen consumption of the Indian major carp *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *World Journal of Zoology*, *4*(3), 238-246.

Siegman-Igra, Y., Bar-Yosef, S., Gorea, A. & Avram, J. (1993). Nosocomial *Acinetobacter meningitis* secondary to invasive procedures: Report of 25 cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, *17*(5), 843-849.

Simeonova, F.P., Fishbein, L. & WHO. (2004*). Hydrogen Cyanide And Cyanides: Human Health Aspects*. World Health Organization.

Singh, N., Paterson, D.L., Chang, F.Y., Gayowski, T., Squier, C., Wagener, M.M., & Marino, I. R. (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The other emerging resistant gram-positive coccus among liver transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, *30*(2), 322-327.

Sips, P.Y., Shi, X., Musso, G., Nath, A.K., Zhao, Y., Nielson, J., vd. (2018). Identification of specific metabolic pathways as druggable targets regulating the sensitivity to cyanide poisoning. *PloS One*, *13*(6), e0193889.

Sloman, K.A., Wilson, R.W. & Balshine, S. (2006). *Fish Physiology: Behaviour and Physiology of Fish* (Vol. 24). Gulf Professional Publishing.

Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., vd. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, *53*(7), 679-690.

Sun, G. & Liu, K. (2017). Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 192, 165-170.

Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P.R., Rietsch, A. & Pearlman, E. (2012). ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *The Journal of Immunology*, *188*(4), 1884-1895.

Syracuse Research Corporation., United States (SRCUS). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2004). *Toxicological Profile for Copper*. Update. [Atlanta, Ga.]: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., vd. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, *9*(3), 68-77.

Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., McQueary, C. & Actis, L.A. (2008). *Molecular Basis of Acinetobacter Virulence and Pathogenicity. Acinetobacter Molecular Biology*. Norfolk, Caistr Academic Pres, UK.

Townsend, J., Park, A.N., Gander, R., Orr, K., Arocha, D., Zhang, S. & Greenberg, D.E. (2015). *Acinetobacter* infections and outcomes at an academic medical center: A disease of long-term care. *Open Forum Infectious Diseases*, *2*(1), ofv023.

Trana, B.Q. & Quốca, T.B. (2020). The effect of HCN emissions from tailing storage facilities of a gold mine on public health: findings from a major case study in Thailand. *DTU Journal of Science and Technology*, *4*(41), 86-93.

Tristan, A., Lina, G., Etienne, J. & Vandenesch, F. (2006). *Biology and Pathogenicity of Staphylococci other than Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. In Gram-Positive Pathogens,* Second Edition (pp. 572–586). American Society of Microbiology, US.

Tuncer, S. & Akova, M. (1997*). Pseudomonas aeruginosa* İnfeksiyonları. *Flora*, 1, 61-65.

Turgut, H., Turhanoğlu, M., Çetin, Ç. & Yalçın, A.N. (2002). Hastane infeksiyonu etkeni *P. aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfeksiyon Dergisi*, *16*(1), 63-66.

Usluer, G. (2002). Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, *7*(3), 135-141.

Vahaboğlu, H. & Akhan, S.Ç. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 2, 1608.

Valko, M., Morris, H. & Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1161-1208.

van der Sar, A.M., Musters, R.J.P., van Eeden, F.J.M., Appelmelk, B.J., van den Broucke-Grauls, C.M.J.E. & Bitter, W. (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cellular Microbiology*, *5*(9), 601-611.

Venanzio, G.D., Flores-Mireles, A.L., Calix, J.J., Haurat, M.F., Scott, N.E., Palmer, L.D., vd. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nature Communications*, *10*(1), 1-13.

Warnakula, I.K., Ebrahimpour, A., Li, S.Y., Ralalage, R.D.G., Hewa-Rahinduwage, C.C., Kiss, M., vd. (2020). Evaluation of the long-term storage stability of the cyanide antidote: Dimethyl trisulfide and degradation product identification. *ACS Omega*, *5*(42), 27171-27179.

Weernink, A., Severin, W.P.J., Tjernberg, I. & Dijkshoorn, L. (1995). Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *Journal of Hospital Infection*, *29*(3), 189-199.

Weese, J.S. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR Journal*, *51*(3), 233-244.

Weinstein, B.M. (2002). Vascular cell biology *in vivo*: A new piscine paradigm? *Trends in Cell Biology*, *12*(9), 439-445.

WHO (World Helath Organization). (2003). *Iron in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*, WHO/SDE/WSH/03.04/08, World Health Organization, Geneva.

Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P. G., Edmond, M.B., vd. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, *64*(3), 282-290.

Xu, Z., Chen, X., Kim, H.N. & Yoon, J. (2010). Sensors for the optical detection of cyanide ion. *Chemical Society Reviews*, *39*(1), 127-137.

Yamagami, K. (1981). Mechanisms of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzymatic choriolysis. *American Zoologist*, *21*(2), 459-471.

Yamamoto, M. & Yamagami, K. (1975). Electron microscopic studies on choriolysis by the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*. *Developmental Biology*, *43*(2), 313-321.

Zelder, F. & Tivana, L. (2015). Corrin-based chemosensors for the ASSURED detection of endogenous cyanide. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *13*(1), 14-17.

Zhang, X.J., Jia, C.C., Lin, L., Bai, C.L. & Huang, C.P. (2012). Toxic effects of lead on embryonic development of zebrafish. Acta Anatomica Sinica, 43, 662–666.

Zhao, G., Sun, H., Zhang, T. & Liu, J.X. (2020). Copper induce zebrafish retinal developmental defects via triggering stresses and apoptosis. *Cell Communication and Signaling*, *18*(1), 1-14.

Zhao, S., Huang, J. & Ye, J. (2015). A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *34*(1), 80.

URL-1. Farlex, I. (2005). Definition: environment, the free dictionary. Farlex Inc. Publishing, USA. http://www.thefreedictionary.com/. Erişim Tarihi: 15.10.2020.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı	: Riyam Ghazi Kareem AL-SARRAY
Doğum Yeri ve Yılı	: Kût'ül-Amâre, 21.10.1993
Medeni Hali	: Bekar
Yabancı Dili	: Tükçe, İngilizce

Eğitim Durumu

Lise	: Al-Manahel Lisesi, 2012
Lisans	: Al- Qassim Green Üniversitesi, Biyoteknoloji Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, 2016