

Bazı İlaç Gruplarının Su Ortamına Olan Etkilerinin Akut Toksikite Testleri ile Değerlendirilmesi

Süheyla TONGUR^{*1}, Sevil YILDIZ², Rifat YILDIRIM³

^{1,2}Konya Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Konya

¹(ORCID:https://orcid.org/0000-0002-8647-6338)

²(ORCID:https://orcid.org/0000-0003-2873-9328)

³Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Sütçüler Prof. Dr. Hasan Gürbüz MYO, Mülkiyet Koruma ve Güvenliği Bölümü, Isparta

³(ORCID:https://orcid.org/0000-0002-4456-9448)

(Alınış / Received: 20.06.2018, Kabul / Accepted: 04.03.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 11.03.2019)

Anahtar Kelimeler

Analjezik,
Beta-blocker,
Daphnia magna,
Lepidium sativum,
Toksikite,
EC₅₀

Özet: Bu çalışmanın amacı, reçeteli veya reçetesiz olarak satılabilen ve tüketimleri her geçen gün artan analjezik-antiinflamatuvar ve beta-blocker grubu ilaçların laboratuvar ortamında hazırlanan sentetik atıksularının akut toksisitelerinin incelenmesidir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak analiz edilecek olan bu ilaçların *Lepidium sativum* ve *Daphnia magna* toksisite testleri kullanılarak akut toksisitelerinin değerlendirilmesidir. Ayrıca kullanılan farklı biyolojik test metodlarının duyarlılık yönünden karşılaştırılması ve bu atıksuların bitki ve akuatik yaşam için toksisitesinin belirlenmesidir. Çalışmada, ilaç piyasasında kolaylıkla bulunabilen ve bununla birlikte kullanımları gitgide artan üç farklı ilaç türünün *Daphnia magna* ve *Lepidium sativum* toksisite testleri kullanılarak toksisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Test sonuçları incelendiğinde her iki toksisite testi için farklı hassasiyetler gözlenmiştir. Kullanılan yöntemler içerisinde en hassas değerlerin elde edildiği test yönteminin *Daphnia magna* toksisite test metodu olduğu görülmüştür. *Daphnia magna* deneyinde ilaç etken maddelerinin 24 saat ve 48 saat sonraki değerleri hesaplanmıştır. *Daphnia magna* deneyinde sonuçların okunduğu süreler açısından karşılaştırıldığında, 24 saat sonunda okunan değerlere göre 48 saat sonunda alınan değerlerde artış olduğu tespit edilmiştir. Analjeziklerden “Flurbiprofen” etken maddesi için 24 saat ve 48 saat sonraki değerler hesaplandığında Toksik Birim değerinin “çok toksik” olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda farklı toksisite testlerinin hassasiyetlerinin de farklı olduğu görülmüştür. Bu çalışma toksisite testlerinin ilaç atıksuları üzerinde kullanılabilirliği açısından ve sonraki çalışmalara ışık tutması açısından önemlidir.

Assessment of Acute Toxicity of Some Pharmaceuticals Effects in Aquatic Environment by Toxicity Test Methods

Keywords

Analgesics,
Beta-blocker,
Daphnia magna,
Lepidium sativum,
Toxicity,
EC₅₀

Abstract: Purpose of this study, determination of toxicity effects of synthetic drug solutions (Flurbiprofen, Naproxen and Propranolol) by using toxicity test methods. In this study, *Lepidium sativum* and *Daphnia magna* toxicity tests were used as a method to determine potential harms to be caused to microbial ecology in receiver environment by synthetic pharmaceutical solutions were preparing certain concentrations as working samples. When *Lepidium sativum* and *Daphnia magna* toxicity tests results were evaluated, different sensitivities were determined for pharmaceutical wastewater samples of different properties. When *Lepidium sativum* and *Daphnia magna* toxicity test results were compared, *Daphnia magna* toxicity test method result was the most sensitive values. *Daphnia magna* toxicity test method results were compared in terms of times for 24 hours and 48 hours. It was observed that toxic values of pharmaceuticals were increased at 48 hours when compared to the values read at 24 hours. Flurbiprofen showed more toxic than other ingredients (Naproxen and Propranolol) both *Lepidium sativum* and *Daphnia magna*. In this study, for plants and aquatic life toxicity of some pharmaceuticals were determined and were compared in terms of sensitivity by using different toxicity test methods. So these studies, in terms of feasibility toxicity test methods are very important on pharmaceutical wastewaters. Also, looking from the viewpoint of next studies of toxicity will be lightning.

1. Giriş

Dünya nüfusunun gitgide artması ile birlikte nüfusun yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Ayrıca, hızla gelişen teknoloji yaşamı büyük bir oranda etkisi altına alarak tüketimin artmasına neden olmaktadır. Endüstrileşme ile birlikte yerleşim yerleri hızlı bir şekilde gelişmektedir. Dolayısıyla endüstrilerden, kurumlardan ve konutlardan yoğun bir şekilde kaynaklanan atıkların ortaya çıkması kaçınılmaz bir durum değildir. Yeni teknolojik gelişmelerin yaşam için olumlu tarafları olsa da, ekosistem için olumsuz sayabileceğimiz problemleri meydana getirmektedir. Oluşan atıkların miktarı ve özelliklerinin hem değişmesi hem de artması nedeniyle tehlike oluşturmaktadır. Sonuç olarak, bu durum küresel çapta çevresel kirliliği arttırmaktadır [1].

Fiziki özelliklerine göre atıklar; katı ve sıvı atıklar olmak üzere sınıflandırılabilir. Üretim birimlerinden oluşan atık sular bununla birlikte hastaneler, bakımevleri, çeşitli işyerleri ve konutların kanalizasyon suları sıvı atıklar; bunun dışındaki atıklar da katı atıklar olarak değerlendirilebilir. Atıkların bir kısmı doğal ortamda hızlı bir şekilde biyodegradasyona uğrayarak çevreye zarar vermeyen bileşenlere dönüşebilirken, ağır metaller ve bazı organik yapıdaki bileşikler ise, uzun yıllar bozunuma uğramadan yapılarını doğada koruyabilmektedirler. Bu durumla birlikte, insan ve ekosistem üzerinde zarar verici ve olumsuz etkilerini sürdürmelerine yol açmaktadır [2].

İlaç ve kişisel bakım ürünleri sektörü, son 40 yılda hızla gelişme gösteren bir endüstri haline gelmiştir. Fakat ilaçların üretildiği veya tüketildiği alanlarda oluşan ilaç-kaynaklı atıklar, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, atık yönetimi konusunda gerektiği önemi kazanamamıştır. İlaçlar, kolay içilebilmeleri ve uzun süre depolanabilmeleri amacı ile mümkün olduğu kadar dayanıklılığı yüksek ve sıvı fazda hareketlilikleri yüksek olacak şekilde üretilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı, ilaç içerisinde bulunan aktif maddeler ve biyotransformasyon ürünleri, ekosistemde birikerek çevreye olumsuz diyebileceğimiz çeşitli etkilere neden olmaktadır. Antibiyotikler, antibakteriyel ilaçlar, ağrı kesiciler, betablockerler, kolesterol ilaçları, sitostatik ilaçlar, sentetik steroidler vb. çeşitli araştırmalarla son yıllarda ekosistemde tespit edilen ilaçlardır [3].

İlaçların, ilaç üretim aşamasında kullanılan veya sentezlerde yan ürün olarak elde edilen birtakım kimyasalların atık olarak çevreye geçtiklerinde ortaya çıkabilecek olası zararlı etkilerinin değerlendirilmesi, bu maddelerin yerüstü ve yeraltı su kaynaklarına geçen miktarlarının izlenmesi yakın gelecekte ciddi problemlerin önlenmesi açısından önem verilmesi gereken bir konu haline almıştır [4]. Çünkü kullanılmayan veya raf ömrü dolmuş ilaçlar

çöp kutusuna ya da tuvaletlere dökülerek; topikal kullanılan ilaçlar banyo yapılırken yıkama suyuna karışarak; ağızdan alınan ilaçların bir kısmı ise, bağırsaklardan emilmeden; emilen ilaçların kendileri veya metabolitleri de idrar ya da feçes ile kanalizasyon suyuna karışarak ekosistem açısından tehlikeli bir çevresel kontaminasyon kaynağı haline alır.

Toksik madde içeren atıksular, verildikleri alıcı ortama yansıtıkları zararlı etkilerin yanı sıra bu tip atıksuları arıtan biyolojik arıtma tesislerindeki mikroorganizmaları da olumsuz etkileyerek solunum hızlarının değişmesine ve substrat kullanım hızının azalmasına ve dolayısıyla arıtma veriminin düşmesine neden olmaktadır [5].

Su kirlenmesi kontrolünde toksisite testleri; su hayatı çevre koşullarının uygunluğunu, atık toksisitesi üzerinde çevresel faktörlerin etkisini, test türü üzerine atığın toksisitesini, atıksu arıtım metodlarının etkisini, su kirliliği kontrolü çalışmalarında gerekli arıtım derecesini ve izin verilebilir atıksu deşarj oranlarının belirlenmesinde ekotoksikite testleri kullanılır. Ülkemizde ise, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliğine göre sadece endüstri kuruluşları için izin verilebilir atık madde deşarj miktarını ve su kalite standartlarına uygunluğunun belirlenmesi amacıyla toksisite testleri uygulanmaktadır [6]. Toksikite testlerinin, çevreye toksik deşarjların verilmesinin kontrol edilmesinde ve denetlenmesinde kimyasal analizler ve biyolojik analizler ile birlikte kullanılmasının gerektiği EPA tarafından önerilmektedir [7].

Atıksu kalitesini ve atıksu deşarjını izlemede zehirliliğin tespit edilmesi amacı ile atıksuyun toksik seviyesinin bilinmesi gerekir. Bazı durumlarda endüstrilerin atıksuları kimyasal parametreler açısından deşarj standartlarını sağlarken, toksisite test sonuçları atıksuyun potansiyel olarak toksik olduğunu göstermektedir. Atıksuyun toksisitesinin bilinmesi arıtma tesislerinin randımanlı bir şekilde işletilebilmesi, alıcı ortamın korunması için oldukça önemlidir. Çevresel risk değerlendirmeleri ve su kalite kontrol uygulamalarında ekotoksikitenin tespit edilebilmesi için biyoanalizlerin yapılması önem taşımaktadır ve gereklidir [8]. Biyolojik izleme sistemleri biyosensör olarak kullanılan organizma üzerindeki ekolojik sonuçların düzeyini gösterir.

Çalışmanın amacı, piyasada en çok bulunan, doktorlar tarafından reçete edilen ya da reçetesiz olarak satılabilen ve tüketimleri her geçen gün artan analjezik - antienflamatuvar ve beta-blocker grubu ilaçların laboratuvar ortamında hazırlanan sentetik atıksularının akut toksisitelerinin deneysel ortamda belirlenmesidir. Çalışmada, evsel atıksu, endüstriyel atıksu ve yüzeysel sulara en çok karşılaşılan Flurbiprofen, Naproksen ve Propranolol etken maddelerine sahip üç ilaç türünün iki farklı toksisite

test metodu ile çevreye olan toksik etkilerini belirleme çalışmalarını kapsamaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Sentetik atıksu numunesi hazırlama

Tüm ilaçların stok çözeltisi 2 g/L olarak hazırlanmış ve bunlar kullanılarak deney yöntemine göre test çözeltileri hazırlanmıştır. Bazı ilaçlar direkt toz olarak saf su ile hazırlanmış, sudaki çözünürlüğü az olanlar hidroalkolik (< %1 etanol) çözelti ile hazırlanmıştır.

2.2. *Lepidium sativum* toksisite testi

Lepidium sativum, Cruciferae familyasından gelmektedir. Öncelikli olarak başlangıç aşamasında kazık kök gerçekleşmektedir. Kazık kök oluşumu 4 - 6 cm aralığında uzunluğa ulaştığında yan kök oluşumu gerçekleşmektedir. Kazık kök zamanla kaybolarak saçak kök şeklini almaktadır. Gövde dallanmış otsu bir yapıya sahiptir. *Lepidium sativum* tohumları genellikle kahverengi ve kahverengimsi kırmızı renklerinde bulunmaktadır. Yaklaşık olarak tohumlar 2 mm uzunluğunda, 1 mm genişliğinde ve 0,6 - 1,0 mm aralığında kalınlığa sahiptir. Tohumların minimum çimlenme gücü %80 civarındadır. Çimlenme toprakta 4°C sıcaklıkta başlamaktadır. *Lepidium sativum* ılımlı, nemli iklimlerden hoşlanmaktadır. Yetiştirilme sıcaklığı 10-15 °C aralığında olması gelişimi için yeterli olmaktadır. pH seviyesi 6,0 - 6,5 düzeyinde olmalıdır. *Lepidium sativum* fazla ışığı sevmemektedir.

Lepidium sativum toksisite testi Devare ve Bahadır (1994) fitotoksikite üzerine yaptıkları çalışma ile Braunschweig Teknik Üniversitesi Sürdürülebilir Kimya ve Çevre Enstitüsü'nde geliştirilen yöntemle düzenlenerek yapılmıştır [9,14]. 6 adet kontrol ve 3'er adet % 0,625, % 1,25, % 2,5, % 5, % 10 konsantrasyonlarında hazırlanan numuneler için gerçekleştirilmiş, gerekli olduğu durumlarda bu çözelti derişimleri azaltılmış veya yükseltilmiştir. 9 cm'lik cam petri kapları içerisine 2'şer adet 90 mm çapında Whatman 1 marka filtre kâğıdı yerleştirilerek kontrol petri kaplarına 5'er mL saf su, numune petrilere ise hazırlanan farklı seyrelmelerdeki numunelerden 5'er mL konulmuş, filtre kâğıdı altında hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Her bir petri kabının içerisine eşit büyüklükte, zarar görmemiş *Lepidium sativum* tohumlarından 25'er adet eşit aralıklarla olacak şekilde yerleştirilmiştir. Petri kaplarının kapakları kapatılarak 72 saat süresince, yaklaşık olarak 25°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Toksikite testinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir petri kabı içerisinde bulunan *Lepidium sativum* tohumlarının en iyi gelişim

gösteren 20 tanesinin kök uzunlukları ve bitki yükseklikleri ölçülmüştür. Buna göre, test süresi sonunda numunelerin *Lepidium sativum* tohumlarında gözlemlenen kök uzunluk ve yükseklik ortalama değerleri kontrol petri kaplarında ölçülen ortalama kök uzunluk ve gövde yükseklik değerleri ile kıyaslanarak % inhibisyonları hesaplanmış buna bağlı olarak EC₅₀ değerleri ve Toksik Birimleri bulunmuştur.

2.3. *Daphnia magna* toksisite testi

Daphnia magna toksisite testi standart test (OECD, 2004; Test No: 202) prosedürüne göre yapılmıştır [10,11]. Standart freshwater çözeltisi kullanılmadan önce 15 dakika süre ile havalandırılmıştır. *Daphnia magna* yumurtaları (ephippia) sürekli ışık altında (11.000 lux), 20 - 22°C sıcaklıkta 72 saat inkübe edilerek larvaların yumurtadan çıkması sağlanmıştır. Yumurtlamaya aşamasına gelen daphnidler, freshwater çözeltisi kullanılarak kaplara aktarılmış ve 24 saat içerisinde yeni çıkmış daphnidler toplanmıştır.

Deney için hazırlanan sentetik numunelerin çözeltisi deney kaplarına konsantrasyon hacimleri giderek artacak şekilde konulmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki her bir derişimdeki numune için, test tabağındaki hücrelere 5'er adet *Daphnia magna* (Straus 1820) (Cladocera, Crustacea) konulmuştur.

Biyodenedelerde, kontrol grubu oluşturularak her kontrol grubuna, deney ortamıyla aynı sayıda olacak şekilde 5'er adet *Daphnia magna* (Straus 1820) (Cladocera, Crustacea) konulmuştur. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir deneysel kaptaki hareketsiz ve ölü *Daphnia magna*lar sayılmıştır. Buna göre, % inhibisyon oranı kullanılarak grafiksel interpolasyon ile EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3. Bulgular

Deneyde Flurbiprofen, Naproksen ve Propranolol etken maddelerine sahip üç ilaç türünün farklı seyrelmelerdeki numuneleri için *Lepidium sativum* ve *Daphnia magna* toksisite testlerinin hassasiyetleri araştırılmıştır.

Sonuçların kategorize edilmesi için toksisite test sonuçları, toksik birim (TB) olarak ifade edilmiştir. TB sonuçları TB=0 toksik değil, 0<TB<1 hafif toksik, 1<TB<10 toksik, 11<TB<100 çok toksik şeklindeki sınıflandırmaya göre değerlendirilmiştir [12, 13].

$$TB = \left[\frac{1}{L(E)C_{50}} \right] \times 100 \quad (1)$$

3.1. *Lepidium sativum* toksisite testi

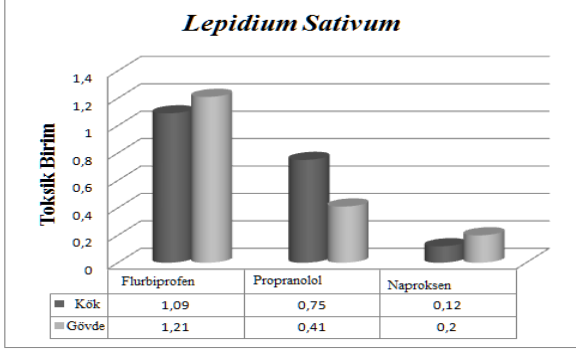
Flurbiprofen, Naproksen ve Propranolol etken maddelerine sahip ilaçlar için *Lepidium sativum*

toksikite test sonucu hesaplanan EC₅₀ değerleri ve toksik birimleri aşağıda verilmektedir.

Tablo 1. *Lepidium sativum* EC₅₀ Değerleri (mg/L)

E.M.A.	Flurbiprofen	Naproksen	Propranolol
Kök	91,32	779.21	132.26
Gövde	82,35	485.71	242.92

*(E.M.A: Etken madde adı)



Şekil 1. *Lepidium sativum* deneyi toksik birimleri

Lepidium sativum toksisite testleri sonucunda toksik birimleri Persoonee ve diğ. (1993) yapmış olduğu sınıflandırmaya göre incelendiğinde kullanılan ilaç numunelerinden Flurbiprofen, Propranolol ve Naproksen etken maddelerinin kökleri için toksik birimleri sırasıyla (TB_{Flurbiprofen}:1,09, TB_{Propranolol}:0,75 ve TB_{Naproksen}:0,12) ve gövdeleri için toksik birimleri ise sırasıyla (TB_{Flurbiprofen}:1,21, TB_{Propranolol}:0,41 ve TB_{Naproksen}:0,20) olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre Flurbiprofenin “toksik”; Propranolol ve Naproksenin ise “hafif toksik” olduğu tespit edilmiştir.

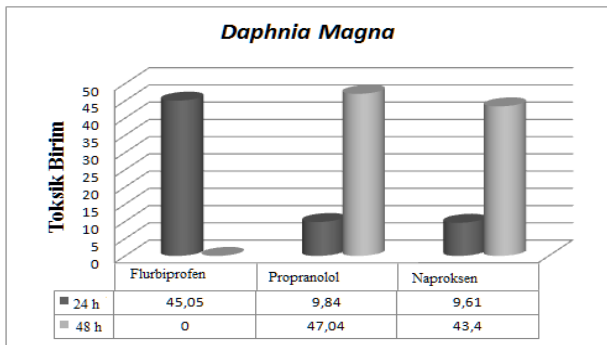
3.2. *Daphnia magna* toksisite testi

Flurbiprofen, Propranolol ve Naproksen etken maddelerine sahip üç ilaç türü için *Daphnia magna* toksisite test sonucu 24 saat ve 48 saat sonra okunan EC₅₀ değerleri ve toksik birimleri aşağıda verilmektedir.

Tablo 2. *Daphnia magna* EC₅₀ Değerleri (mg/L)

E. M. A.	Flurbiprofen	Naproksen	Propranolol
24 saat (mg/L)	2,21	10,39	10,16
48 saat (mg/L)	0,0018	2,3	0,47

*(E.M.A: Etken madde adı)



Şekil 2. *Daphnia magna* deneyi toksik birimleri

Daphnia magna toksisite testleri sonucunda toksik birimleri Persoonee ve diğ. (1993) yapmış olduğu sınıflandırmaya göre incelendiğinde kullanılan ilaç numunelerinden Flurbiprofen, Propranolol ve Naproksen etken maddelerinin 24 saat için toksik birimleri sırasıyla (TB_{Flurbiprofen}:45,05, TB_{Propranolol}:9,84 ve TB_{Naproksen}:9,61) ve 48 saat için toksik birimleri ise sırasıyla (TB_{Flurbiprofen}:H.Y, TB_{Propranolol}:47,04 ve TB_{Naproksen}:43,4) olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre 24 saatlik test sonuçları için Flurbiprofenin “çok toksik”; Propranolol ve Naproksenin ise “toksik” olduğu tespit edilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan deneyler sonucunda, deneyde kullanılan üç farklı ilaç türünün de toksik etkilerinin bulunduğu görülmüştür. Test sonuçları incelendiğinde her iki toksisite testi, farklı karakterdeki üç ilaç türü için farklı hassasiyetler gösterdiği tespit edilmiştir. Üç farklı ilaç türü için, kullanılan yöntemler içerisinde en hassas değerlerin elde edildiği toksisite test yönteminin *Daphnia magna* toksisite test metodu olduğu belirlenmiştir.

Her iki toksisite testi için Toksik Birim (Tablo 3) sıralaması; *Lepidium sativum* toksisite deneyinde, kullanılan ilaç numuneleri için, TB_{Flurbiprofen}>TB_{Propranolol}>TB_{Naproksen}, *Daphnia magna* toksisite deneyinde de, kullanılan ilaç numuneleri için, TB_{Flurbiprofen}>TB_{Propranolol}>TB_{Naproksen} olarak bulunmuştur.

Tablo 3. Toksikite testleri sonucu elde edilen toksik birimler

TOKSİK BİRİM	Flurbiprofen	Propranolol	Naproksen
<i>Lepidium sativum</i> (Kök)	1,09	0,75	0,12
<i>Lepidium sativum</i> (Gövde)	1,21	0,41	0,2
<i>Daphnia magna</i> (24 Saat)	45,05	9,84	9,61
<i>Daphnia magna</i> (48 Saat)	H.Y	47,04	43,4

Not: H.Y: Hesap Yok

Daphnia magna toksisite testi 24 saat ve 48 saat sonraki sonuçlar değerlendirildiğinde, bu test metodunun ilaçların toksisitelerinin belirlenmesinde *Lepidium Sativum* toksisite testine göre daha fazla hassaslıkla ölçüm yapılabilen bir test metodu olduğu görülmüştür. Deneyde 24 ve 48 saat sonraki toksiklik değerleri karşılaştırılmıştır. Kullanılan ilaçlarda 24 saatlik sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda Propranolol ve Naproksen için “toksik”, Flurbiprofen için “çok toksik”, 48 saatlik sonuçlar için ise Flurbiprofen etken maddesine sahip ilaç için sonuç elde edilememiş ve Propranolol ve Naproksen etken maddelerine sahip ilaç numuneleri için “çok toksik” özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, toksisite testlerinin duyarlılıkları yönünden karşılaştırıldığında ilaç numunelerinin toksisitelerinin belirlenmesinde kullanılabilir her iki ekotoksikite testi içerisinde en uygun yöntemin *Daphnia magna* olduğu, maliyetleri açısından karşılaştırıldığında ise *Lepidium sativum* toksisite testi olduğu görülmüştür. Aynı zamanda her iki ekotoksikite testi sonucunda Flurbiprofenin, Propranolol ve Naproksenden daha fazla toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan deneyler, ilaçların atıksularda bulunması durumunda çevreye olumsuz etkilerinin olduğunu kanıtlamıştır. Atıksularda, yeraltısularında, içme sularında, çamurda, toprakta ve sedimentte ilaç kalıntıları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ise ilaçların arıtımının ne derece önemli olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Kaynakça

- [1] Saygı, Ş., Battal, D., Şahin, N. Ö., 2012, Çevre ve insan sağlığı yönünden ilaç atıklarının önemi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 82-90.
- [2] Ruhoy, I. S., Daughton, C. G., 2008, Beyond the medicine cabinet: An analysis of where and why medications accumulate, *Environ Int*, 34, 1157-1169.
- [3] Duong, P. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Huong, T. T., Pham, V. C., Berg, M., Giger, W., Alder, A. C., 2008, Occurrence, fate and antibiotics resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam, *Chemosphere*, 72, 968-973.
- [4] Larrson, D. G. J., de Pedro, C., Paxeus, N., 2007, Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *J Hazard Materials*, 148, 751-755.
- [5] Meriç, S., Kaplan, D., Selçuk, H., Tünay, O., 2001, Endüstriyel Atıksularda Toksikite İzleme ve Azaltma Yöntemleri, IV. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Ankara, Sayfa 160-167.
- [6] SKKY, Su Kirliliği Yönetmeliği Teknik Usuller Tebliği, 1991.
- [7] Aydın, M. E., Kara, G., 2006, Organize Sanayi Atıksularının Zehirliliği, *S.Ü. Müh. – Mim. Fak. Derg.*, c.21, s. 3-4.
- [8] Aydın, M. A., Yıldız, S., Özcan, S., Kara, G., 2007, Atıksuların toksisitesinin belirlenmesinde farklı biyotest yöntemlerinin uygulanması, *7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi*, İzmir, 683-700.
- [9] Devare, M. And Bahadir, M., 1994, Ecotoxicological assessment of inorganic Waste disposal in salt mines. Part 2 : Phytotoxicity tests, *Fresenius Environ, Bull*, 3, 119-126.
- [10] OECD, Guidelines for testing of chemicals, 2004, *Daphnia sp. Acute immobilisation test*, 1-12.
- [11] Standard Operational Procedure, Daphtokit FTM magna, crustacean toxicity screening test for freshwater, 2006, Nazareth, Belgium: MicroBioTests Inc.
- [12] Persoonee, G., Goyvaerts, M.P., Janssen, C.R., de Coen W. And Vangheluwe, M., (1993). Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste drums with the aid of Toxkits. Final Report, CEC Contract ACE 89/BE 2/D3, VABRAP, University of Ghent, Belgium, 600 pages.
- [13] Persoonee, G., Marsalek, B., Blinova, I., et al., 2003, A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ Toxicol.*, 18(6): 395-402.
- [14] Aydın, M., E., Bahadir, M., Kolb, M., et al. Evaluation of sustainable toxicity tests for industrial wastewaters, 2008, TÜBİTAK (The Scientific and Technical Research Council Center of Turkey) and JÜLICH (International Bureau of the German Ministry of Education and Research) Project, Project no. 104I136.