

***Oreochromis niloticus*'ta bazı serum biyokimyasal parametreleri kullanılarak civa toksisitesi üzerine zeolitin birlikte etkisinin araştırılması**

Investigation of combined effect of zeolite and mercury toxicity on some serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*

Özgür Fırat* • Arzu Şahin İnandı

Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adıyaman, Türkiye

* Corresponding author: ofirat@adiyaman.edu.tr

Received date: 09.04.2016

Accepted date: 17.06.2016

How to cite this paper:

Fırat, Ö. & Şahin İnandı, A. (2016). Investigation of combined effect of zeolite and mercury toxicity on some serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus* (in Turkish with English abstract). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3): 251-257. doi: 10.12714/egejfas.2016.33.3.09

Öz: Sunulan bu çalışmada civa (Hg) toksisitesi üzerine zeolitin (Zeo) koruyucu etkisini değerlendirmek için *Oreochromis niloticus*'un serumundaki biyokimyasal parametreler kullanılmıştır. Bu amaçla balıklar 0.01 ve 0.05 mg/L Hg ile 0.01 mg/L Hg+0.01 g/L Zeo ve 0.05 mg/L Hg+0.05 g/L Zeo karışımlarının etkisine 4 ve 21 günlük sürelerle bırakılmıştır. Elde edilen kan serumunda kortizol, glukoz, total protein, sodyum, klor ve potasyum düzeyleri otoanalizator cihazlarla ölçülmüştür. Doğrudan civa ve civa+zeolit karışımlarının etkisinde incelenen serum parametrelerinde ortam derişimine ve etki süresine bağlı olarak önemli değişiklikler saptanmıştır. Civanın tek başına etkisinde her iki etkileşim süresi sonunda da kortizol ve glukoz düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (P<0.05). Bununla birlikte civa+zeolit karışımlarının etkisinde kortizol düzeyinde 4 günlük, glukoz düzeyinde ise 21 günlük etki süresi sonunda anlamlı bir artış belirlenmiştir (P<0.05). Denenen her iki sürede de civa+zeolit karışımlarının etkisinde anlamlı bir değişim göstermeyen (P>0.05) total protein düzeyi yüksek civa derişiminin etkisinde anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05). Civanın doğrudan etkisinde özellikle de yüksek ortam derişiminde sodyum ve klor düzeyleri azalırken; potasyum düzeyleri artmıştır (P<0.05). Civanın zeolitle birlikte etkisinde ise analiz edilen tüm bu iyonların düzeylerinde önemli bir değişim belirlenmemiştir (P>0.05). Araştırma sonuçları *O. niloticus*'un serum metabolit ve iyon düzeylerinde belirlenen değişikliklerin civa+zeolit karışımına oranla civanın tek başına etkisinde daha fazla olduğunu ve ortamda zeolit bulunduğu civa toksisitesinin kısmen ya da tamamen düzeldiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Oreochromis niloticus*, civa, zeolit, biyokimyasal parametreler

Abstract: In the present work, serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus* were used to assess protective effects of zeolite (Zeo) on toxicity of mercury (Hg). For this purpose fish were exposed to 0.01 and 0.05 mg/L Hg and 0.01 mg/L Hg+0.01 g/L Zeo and 0.05 mg/L Hg+0.05 g/L Zeo for 4 and 21 days. Cortisol, glucose, total protein, sodium, chlorine and potassium levels were measured in blood serum. The statistically significant differences were determined in all analysed parameters of the fish exposed to mercury and mercury+zeolite mixtures. In the mercury alone, levels of cortisol and glucose elevated after the both exposure periods (P<0.05). The exposures of mercury+zeolite mixtures increased the cortisol level at 4 days and glucose level at 21 days (P<0.05). At the both exposure periods in the mercury+zeolite mixtures, it not determined significant change in the total protein levels (P>0.05), while they decreased in higher concentrations of mercury alone (P<0.05). In the exposure of mercury alone especially in its higher medium concentration, levels of sodium and chlorine declined, while level of potassium elevated (P<0.05). On the other hand it was not determined significant alterations in levels of all analysed ions in exposure of mercury and in combination with zeolite (P>0.05). The results showed that zeolite partially or totally played a protective role against the toxic effect of Hg since the metabolites and ions levels of *O. niloticus* were higher in the mercury alone than mercury+zeolite mixture.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, mercury, zeolite, biochemical parameters

GİRİŞ

Günümüzde giderek artan endüstrileşme, kentleşme ve tarımsal aktivitelere bağlı olarak sucul ortamların kirlenmesi ciddi bir sorun haline gelmiştir. Sucul ortamlardaki kirlilik, su kalitesinin bozulmasına ve içindeki organizmaların olumsuz etkilenmesine neden olarak sucul ekosistemleri tehdit etmektedir. Birçok farklı kirleticiler su kirliliğinden sorumlu tutulmaktadır. Bunların içerisinde ağır metaller birinci dereceden su kirleticileri olarak dikkate alınmaktadır. Hem

doğadaki biyolojik alınabilirliği hem de yoğun şekilde antropojenik aktivitelere bağlı olarak her zaman her yerde bulunabilecek olan bu kirleticiler sucul yaşamı tehdit eden en önemli kirleticiler grubunu oluşturmaktadır. Balıklar yaşadıkları ortamlarda birçok farklı stres yapıcı faktörlerin etkindedir. Bunlardan ağır metal stresi bu canlıları en çok etkileyen faktördür. Balıklarda bu strese karşı moleküler, biyokimyasal ve hücresel düzeylerde yanıtlar

oluşturabilmektedir. Sucul organizmalar arasında balıklar ağır metallerin önemli hedef organizmaları olması nedeniyle bu canlılar sucul ekosistemlerdeki metal kirlilik düzeylerinin ve toksik etkilerinin değerlendirilmesinde uygun organizma grubu olarak kullanılmaktadırlar (Rashed, 2001).

Civa (Hg), canlılar üzerine zararlı etkileri olan en tehlikeli çevresel kirleticilerden biridir (Chen vd., 2006). Bu metalin insanlar ve diğer organizmalar için en toksik ağır metallerden biri olduğu da iyi bilinmektedir. Elemental civa ve bileşikleri herhangi bir metabolik fonksiyona sahip olmayan toksikantlardır. Organizmalardaki bulunurluğu çevresel kontaminasyonun bir sonucudur. Çeşitli araştırmalarda civanın organizmalarda mutajen ve kanserinojen olduğu, embriyosidal, sitotoksik ve histopatolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Chaurasia ve Jain, 2006; Mishra ve Jain, 2009; Gharaei vd., 2011).

Sucul ortamlardan civa gibi toksik elementlerin uzaklaştırılması ya da serbest halde bulunmalarının azaltılması su kalitesi ve canlı organizmalar için oldukça önemlidir. Sucul ortamlardan inorganik kirleticilerin uzaklaştırılmasında elektrodializ, kimyasal presipitasyon, adsorpsiyon ve iyon değiştirme gibi yöntemler mevcuttur (Fergusson, 1990). Doğal zeolitler ve onların modifiye formları, hem yeryüzünde bol miktarda bulunmaları ve maliyetin düşük olması hem de iyon değiştirme kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı suların ağır metallerin uzaklaştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Zeolitlerin bu amaçlar için temel kullanım nedeni iyon değiştirme özelliğidir (Misaelides, 2011). Bu mineraller yapısında bulunan alkali ya da toprak alkali örneğin K⁺, Na⁺, Ca²⁺ ve Mg²⁺ gibi elementler sayesinde iki değerlikli kanyonlarla (civa, kadmiyum, çinko, kurşun gibi) yer değiştirebilmektedirler (Taş vd., 2007). Ağır metallerin yanı sıra sucul ortamlardan amonyağın, petrokimyasal ürünlerin ve düşük-düzeyle radyoaktif elementlerin uzaklaştırılmasında da sıklıkla başvurulan minerallerdir (Mishra ve Jain, 2009).

Zeolitler ağır metallerle karşı yüksek ilgileri ve yüksek kanyon değiştirme kapasiteleriyle uygun materyal olarak hayvanlardaki ağır metal toksisitesinin önlenmesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Papaioannou vd., 2005). Moleküler elek yapısı sayesinde civa ve diğer metalleri bünyesinde tutarak sudaki serbest bulunan metal düzeylerini azaltmakta ve böylece balıklar tarafından alınacak metal düzeyleri de azaltmaktadır (Chaurasia ve Jain, 2006). Bu mineralin içyapısında metallerin hareketsiz formda tutulması daha az metalin balık tarafından alınmasına neden olacağından metallerin toksik etkilerinin de azalacağı belirtilmektedir (Jain, 1999).

Sucul ortamların ağır metallerle kontaminasyonu burada yaşayan organizmalarda akut ya da kronik stresin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Sucul ekosistemler üzerine kirleticilerin etkileri balık biyokimyasal parametrelerin ölçülmesiyle değerlendirilmektedir. Balık kan parametreleri, endojen veya ekzojen kaynaklı değişikliklere karşı fizyolojik ya da subletal stres yanıtının biyobelirteçleri olarak yaygın bir

şekilde kullanılmaktadır (Cataldi vd., 1998). Ağır metalin etkisinde balık kan dokusunda önemli değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Önceki çalışmalarda da çeşitli ağır metallerin balıkların kan dokusundaki enzimler, metabolitler ve iyon düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (Firat vd., 2011, Gharaei vd., 2011, Cogun vd., 2012). Plazma/serum parametreleri iç metabolizmanın ürünleri olduğu için hayvanların fizyolojik durumlarını yansıtmaları bakımından önemlidir. Kan dokusundaki değişkenler balıklarda genel sağlık durumunun yanı sıra hastalıkların ve stresin kontrol edilmesinde yararlı belirteçler olduğu ifade edilmektedir (Martinez vd., 1994).

Yeryüzündeki en toksik metallerden biri olan civanın, sucul ekosistemin önemli bir ögesi olan ve insanların birinci dereceden besinini oluşturan balıklar üzerine toksik etkilerini ve bu toksite üzerine koruyucu mekanizmaları çalışmak hem bu sucul canlıların hem de insanların sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle sunulan bu çalışmada tüm vücudun genel fizyolojik ve patolojik durumu hakkında bilgi veren kan parametreleri kullanılarak civanın balıklarda neden olduğu fizyolojik ve biyokimyasal hasarların belirlenmesi ve iyon değiştirme yetenekleri ile ağır metal toksisitesini baskıladığı bilinen zeolit civa toksisitesi üzerine koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için *O. niloticus* tatlı su balığı civanın tek başına ve zeolitle birlikte etkisine bırakılarak kan serumu metabolit (kortizol, glukoz, total protein) ve iyon (sodyum, klor ve potasyum) düzeyleri ölçülmüştür.

MATERYAL VE METOT

Sunulan çalışma için gerekli Etik Kurul onayı Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar No:4, Tarih: 29.09.2014). Çalışmamızda araştırma materyali olarak *Oreochromis niloticus* kullanılmıştır. Balıklar, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki balık yetiştirme havuzlarından alınmış ve laboratuvara getirilerek içerisinde 120 L bekletilmiş çeşme suyu bulunan 40x140x40 cm ebatlarındaki 14 stok cam akvaryumda ortam koşullarına uyumları için üç ay süre ile bırakılmışlardır. Bu süre içerisinde balıklar 12.18 ± 0.64 cm boy ve 30.28 ± 0.51 g ağırlığa ulaşmıştır. Deneyler 25±1 °C'de yürütülmüş, günde sekiz saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Merkezi havalandırma sistemiyle akvaryumların havalandırılması sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarına uyumları sırasında balıklar, hazır balık yemi kullanılarak (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Denemelerden 48 saat öncesinde yem kesilmiş ve denemeler boyunca günde iki defa olmak üzere vücut ağırlıklarının %2'si kadar yem ile balıklar beslenmiştir. Deney suyunun kimyasal özellikleri; toplam sertlik 325±7 ppm CaCO₃, çözülmüş oksijen 7.07±0.06 mg/L, pH 7.78±0.05, akvaryum suyunun sıcaklığı 21.13±0.42 °C olarak ölçülmüştür.

Deneylerde her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan toplamda 5 akvaryum kullanılmıştır. Deneylerde beş akvaryumun ilk ikisine civanın 0.01 ve 0.05 mg/L çözeltileri; üçüncü ve dördüncü akvaryumlara 0.01 mg/L civa + 0.01 g/L zeolit ve 0.05 mg/L civa + 0.05 g/L zeolit karışımlarından 120'şer litre ve son akvaryum ise kontrol grubu olarak

kullanılarak içerisinde aynı hacimde (120 L) dinlendirilmiş çeşme suyu konmuştur. Balıklar bu kimyasalları etkisine 4 ve 21 gün sürelerle bırakılmıştır. *O. niloticus* için Hg'nin 96 saat-LC50 değeri 0.2 mg/L olarak saptanmıştır (Ishikawa vd., 2007). Çalışmamızda test edilen civanın 0.01 ve 0.05 mg/L derişimleri, bu LC₅₀ değerinin sırasıyla 1/20 ve 1/4'ü baz alınarak subletal konsantrasyonlar olarak seçilmiştir. Deney akvaryumlarında kullanılan kimyasalların derişimlerinde zamana bağlı olarak değişim olabileceği dikkate alınarak çözeltiler her gün yeni hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir.

Denenen etki süreleri sonunda deney akvaryumlarından rastgele balıklar alınmıştır. Balıkların kan alma sırasında strese girmesini ve böylece incelenecek kan parametrelerinde meydana gelebilecek olası değişiklikleri önlemek için balıklara anestezi madde uygulanmıştır. Akvaryumlardan alınan balıklar 75 mg/L derişimindeki MS222 (etil p-amino benzoat metan sülfanat veya trikain metan sülfanat) anestezi maddesi ile bayıltılmıştır. Bayıltılan balıkların boy ve ağırlıkları alındıktan sonra zaman kaybetmeksizin kaudal pedinkülün vertikal kesilmesi yoluyla kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri içinde herhangi bir antikoagülant madde bulunmayan tüplere alınarak 10 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edilerek serumlar elde edilmiştir. Serum örneklerindeki biyokimyasal parametrelerin analizi, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarındaki Beckman Coulter DXI 800 ve DXC 800 otoanalizör cihazlarında yürütülmüştür.

Analizlerden elde edilen verilerin istatistik analizi, IBM SPSS Statistics 21.0 paket programında yapılmıştır. Analizler, her parametre için altı tekrarlı olarak yapılmış ve veriler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde düzenlenmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel ayrımlar One Way-ANOVA'yı takiben çoklu karşılaştırma testlerinden Student – Newman Keul's (SNK) Test kullanılarak yapılmıştır. Süreye bağlı olarak deney grupları arasındaki istatistiksel ayrım için ise Student-t Testi kullanılmıştır. Tablolarda istatistiksel ayrımlar işaretleme sistemiyle gösterilmiştir. Sonuçlar P<0.05 düzeyinde ise önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Civa ve civa + zeolit karışımlarının belirli bir ortam derişiminde ve denenen etki sürelerinde *O. niloticus*'un serum kortizol, glukoz ve total protein düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. İlk etkileşim süresi sonunda kortizol düzeyinde civanın hem tek başına hem de zeolitle birlikte etkisinde düşük ve yüksek ortam derişimlerinde; 21 günlük etki süresi sonunda ise civanın 0.01 ve 0.05 ppm etkisinde anlamlı bir artış saptanmıştır (P<0.05). 4 günlük sürede yüksek civa ve civa+zeolit karışımının etkisinde kortizol düzeyi sırasıyla, %76 ve %36 düzeylerinde bir artış göstermiştir. Süreye bağlı olarak civanın doğrudan etkisinde önemli bir değişim göstermeyen (P>0.05) kortizol düzeyi civa+zeolit karışımlarının her iki ortam derişiminde anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05).

Tablo 1. Civa (mg/L) ve civa (mg/L) + zeolit (g/L) karışımlarının etkisine 4 ve 21 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'ta serum metabolit düzeyleri
Table 1. Serum metabolite levels of *O. niloticus* exposed to mercury (mg/L) and mercury (mg/L) + zeolite (g/L) mixtures for 4 and 21 days

Derişim	4 Gün	21 Gün
Kortizol (µg/dL)		
Kontrol	12.54±0.83 ax	12.19±0.22 ax
0.01 Hg	17.46±0.55 bx	18.78±0.41 bx
0.01 Hg+0.01 Zeolit	18.52±0.89 bx	11.68±0.57 ay
Kontrol	12.54±0.83 ax	12.19±0.22 ax
0.05 Hg	22.08±0.49 bx	19.95±0.88 bx
0.05 Hg+0.05 Zeolit	17.08±0.91 cx	12.65±0.71 ay
Glukoz (mg/dL)		
Kontrol	42.18±0.68 ax	39.85±0.91 ax
0.01 Hg	61.52±0.73 bx	57.11±1.21 bx
0.01 Hg+0.01 Zeolit	40.47±1.03 ax	38.77±1.10 ax
Kontrol	42.18±0.68 ax	39.85±0.91 ax
0.05 Hg	74.25±1.14 bx	81.49±0.53 bx
0.05 Hg+0.05 Zeolit	41.33±0.41 ax	51.62±0.41 cy
Total Protein (g/dL)		
Kontrol	2.53±0.04 ax	2.61±0.08 ax
0.01 Hg	2.60±0.05 ax	2.55±0.07 ax
0.01 Hg+0.01 Zeolit	2.49±0.08 ax	2.45±0.12 ax
Kontrol	2.53±0.04 ax	2.61±0.08 ax
0.05 Hg	2.01±0.06 bx	2.03±0.07 bx
0.05 Hg+0.05 Zeolit	2.68±0.08 ax	2.74±0.11 ax

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. Metabolit düzeylerinin aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımını göstermek için SNK testi kullanılmış ve farklar a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için t testi kullanılmış ve farklar ise x ve y harfleri ile gösterilmiştir. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir (P<0.05). N=6

Glukoz düzeylerinde civanın düşük ve yüksek derişimlerinde her iki etkileşim süresi; civa+zeolit karışımlarının ise yüksek ortam derişiminin etkisinde 21 günlük süre sonunda anlamlı artışlar belirlenmiştir ($P<0.05$). Son etkileşim süresi sonunda yüksek civa ve civa+zeolit karışımının etkisinde glukoz düzeyi sırasıyla %105 ve %30 düzeylerinde bir artış göstermiştir. Etki süresinin uzamasına bağlı olarak glukoz düzeyinde yüksek civa+zeolit ortam derişiminde anlamlı bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$).

Denenen her iki etkileşim süresi sonunda da civa+zeolit karışımlarının etkisinde anlamlı bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) total protein düzeyi, 0.05 mg/L civa ortam derişiminin etkisinde anlamlı bir azalış göstermiştir ($P<0.05$). Yüksek civa derişiminin etkisinde 4 ve 21 günlük süreler sonunda total protein düzeyinin sırasıyla %20 ve %22 düzeyinde azaldığı saptanmıştır. Hem civanın hem de civa+zeolit karışımlarının denenen ortam derişimlerinde total protein düzeylerinde süreye bağlı olarak istatistiksel bir değişim belirlenmemiştir ($P>0.05$).

Civa ve civa + zeolit karışımlarının belirli bir ortam derişiminde ve denenen etki sürelerinde *O. niloticus*'un serum sodyum, klor ve potasyum düzeyleri **Tablo 2**'de verilmiştir.

Civa+zeolit karışımlarının her iki ortam derişiminde ve denenen süreler sonunda anlamlı bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) tüm serum iyon düzeyleri, civanın tek başına etkisinde önemli değişimler göstermiştir. Civanın doğrudan etkisinde sodyum düzeyinde yüksek ortam derişiminde, klor düzeyinde ise her iki ortam derişiminin etkisinde 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış belirlenmişken ($P<0.05$); potasyum düzeyinde her iki etkileşim süresi sonunda ve yüksek ortam derişiminde önemli bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$). 21 günlük süre sonunda 0.05 mg/L civa derişiminin etkisinde sodyum ve klor düzeyleri sırasıyla, %21 ve %31 düzeylerinde bir azalış; potasyum düzeyi ise %44 düzeyinde bir artış göstermiştir. Etki süresinin uzamasına bağlı olarak sodyum düzeyi yüksek civa; klor düzeyi ise hem düşük hem de yüksek civa ortam derişimlerinde anlamlı bir azalış göstermiştir ($P<0.05$).

Table 2. Civa (mg/L) ve civa (mg/L) + zeolit (g/L) karışımlarının etkisine 4 ve 21 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'ta serum iyon düzeyleri
Table 2. Serum ion levels of *O. niloticus* exposed to mercury (mg/L) and mercury (mg/L) + zeolite (g/L) mixtures for 4 and 21 days

Derişim	4 Gün	21 Gün
Sodyum (mmol/L)		
Kontrol	152±1.86 ax	153±2.17 ax
0.01 Hg	155±2.53 ax	154±2.74 ax
0.01 Hg+0.01 Zeolit	150±2.49 ax	152±1.76 ax
Kontrol	152±1.86 ax	153±2.17 ax
0.05 Hg	150±3.21 ax	121±1.86 by
0.05 Hg+0.05 Zeolit	151±1.44 ax	149±1.58 ax
Klor (mmol/L)		
Kontrol	135±2.49 ax	138±2.82 ax
0.01 Hg	141±1.72 ax	104±2.11 by
0.01 Hg+0.01 Zeolit	136±2.35 ax	137±1.10 ax
Kontrol	135±2.49 ax	138±2.82 ax
0.05 Hg	134±2.88 ax	95±1.51 by
0.05 Hg+0.05 Zeolit	138±1.47 ax	134±2.65 ax
Potasyum (mmol/L)		
Kontrol	5.14±0.24 ax	5.16±0.31 ax
0.01 Hg	5.22±0.18 ax	5.33±0.29 ax
0.01 Hg+0.01 Zeolit	5.10±0.09 ax	5.04±0.07 ax
Kontrol	5.14±0.24 ax	5.16±0.31 ax
0.05 Hg	6.83±0.11 bx	7.41±0.35 bx
0.05 Hg+0.05 Zeolit	5.06±0.15 ax	5.01±0.08 ax

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. İyon düzeylerinin aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımını göstermek için SNK testi kullanılmış ve farklar a ve b harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için t testi kullanılmış ve farklar ise x ve y harfleri ile gösterilmiştir. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ($P<0.05$). N=6.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Balıklardaki biyokimyasal parametreler metal stresinde balık metabolizmasındaki değişiklikleri değerlendirmek için duyarlı belirteçlerdir. Kan hücreleri, biyokimyası ve hormonlarını araştırmak balıkların fizyolojik durumlarının izlenmesinde ve hastalıkların teşhisinde önemlidir. Çevresel (sıcaklık, ışık, yoğunluk, tuzluluk), fizyolojik (yaş, beslenme, cinsiyet) faktörler ve toksik maddeler (pestisit ve ağır metaller gibi) balık kan parametrelerini etkilemektedir (Chen vd., 2003;

Fırat vd., 2011). Sunulan araştırmada da civanın *O. niloticus*'un kan serumundaki metabolit (kortizol, glukoz ve total protein) ve iyon (sodyum, klor ve potasyum) düzeylerini ortam derişimine ve etkisi süresine bağlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda da balık kan dokusundaki kortizol, glukoz, protein, kolesterol, bilirubin gibi bileşenler ve Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} gibi iyon düzeylerinde ağır metallerin etkisinde çalışılan balık türüne, ortam derişimine ve etki süresine bağlı olarak önemli değişikliklerin olduğu belirlenmiştir (Fırat ve Kargın, 2010; Gharaei vd., 2011; Cogun vd., 2012).

Stres durumlarında balıklar birincil ve ikincil yanıtlar oluşturmaktadır ve bu yanıtlar, stres ile baş etmek için hızlı bir şekilde oluşmaktadır. İlk yanıt nöroendokrin sistemin aktivasyonu ile endokrin bezlerden kortizol ve katekolaminler (adrenalin ve nöradrenalin) gibi stres hormonlarının dolaşım sistemine salınmasıyla oluşmaktadır. İkincil yanıt ise plazma glukoz düzeyinin artması gibi kan ve diğer doku kimyasında serbest kalan stres hormonlarının neden olduğu değişikliklerdir (Barton ve Iwama, 1991). Bu yanıtlar sonuç olarak stres altındaki organizmalarda artan enerji gereksiniminin karşılanması için yararlı belirteçler olarak kullanılabilir. Çünkü stresin balıklarda serum kortizol ve glukoz düzeylerinde artışlara neden olduğu bilinmektedir (Wendelaar-Bonga, 1997). Sunulan çalışmada da kimyasal stresle ilişkili olarak *O. niloticus*'ta serum kortizol ve glukoz düzeylerinin artış gösterdiği düşünülmektedir.

Balıklarda kortizolü içeren kortikostereoid hormonlar yapısal olarak memelilerdeki adrenal korteksle homolog olan interrenal hücreler tarafından sentezlenmektedir (Wendelaar-Bonga, 1997). Kortizol balıklardaki esas kortikosteroid hormon olup bu canlılarda hem mineralo- hem de glukokortikoid aksiyonlara sahip olup hidromineral denge ve enerji metabolizmasına katılmaktadır (Mommensen vd., 1999). Çalışmamızda *O. niloticus*'ta serum kortizol ve glukoz düzeyleri civanın tek başına etkisinde her iki etkileşim süresi sonunda da artış göstermiştir. Bununla birlikte civa+zeolit karışımlarının etkisinde kortizol düzeyi 4 günlük, glukoz düzeyi ise 21 günlük süre sonunda artış göstermiştir. Kortizol düzeyleri, civanın neden olduğu strese bağlı olarak interrenal hücrelerin uyarılması ve bu hücrelerden dolaşım sistemine bu hormonun salınması sonucunda artmış olabilir. Kan glukoz düzeylerindeki artış bir hiperglisemiye göstermekte ve bununla metalin neden olduğu stres durumları altında bu metabolite duyulan gereksinim nedeniyle karaciğer dokusundaki artan glukoz-6-fosfat aktivitesi ve glikojen yıkımı ile karbonhidrat olmayan kaynaklardan glukoneogenez yoluyla oluşan ve kan dolaşımına katılan glukoz moleküllerine bağlı olarak arttığı düşünülmektedir. Çalışmamızla benzer olarak Firat vd. (2011) de pestisit ve ağır metallerin etkisinde *O. niloticus*'un kan dokusundaki kortizol ve glukoz düzeylerinin arttığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar kortizolün de novo sentezi sonucunda; glukozun ise artan glikojenolizis ve glukoneojenezle ilgili olarak arttığını vurgulamışlardır.

Stres yapıcılara karşı kan plazması kortizol düzeylerinde artış meydana gelmektedir (Barton ve Iwama, 1991). Kan glukoz düzeylerindeki artışlar kirlenmeye karşı balıklardaki genel bir yanıt mekanizmasını göstermektedir. Kimyasal stres durumlarında organizmaların enerji gereksinimi artmaktadır. Sunulan çalışmada da civanın etkisinde balık kan dokusundaki kortizol ve glukoz düzeylerinin büyük bir olasılıkla bir stres yanıtı olarak ve bu ağır metalin neden olduğu stres durumlarıyla baş etmek için gereken fazladan enerji için arttığı düşünülmektedir. Firat vd. (2011) de toksikantların etkisinde

balıklarda artan kan kortizol ve glukoz düzeylerinin kirlenmeye neden olduğu stres durumlarının iyileştirilmesi için gereken enerjinin sağlanması için arttığını belirtmişlerdir.

Dokuların protein düzeyleri, protein sentezi ya da yıkımı arasındaki orana bağlıdır. Serum proteinleri karaciğerde sentezlenmekte olup serum total protein düzeylerindeki değişiklikler olası bir karaciğer hasarının belirteci olarak kullanılmaktadır (Yang ve Chen, 2003). Protein düzeyleri kirlenmeye etkisinde sentezinin azalması ya da yıkımının artmasına bağlı olarak azalabilmektedir. Sunulan çalışmada *O. niloticus*'ta denenen her iki sürede de serum total protein düzeylerinin yüksek civa derişiminin etkisinde azaldığı; bununla birlikte, civa+zeolit karışımlarının etkisinde ise önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Serum total protein düzeylerinin civa toksisitesinin bir sonucu olarak azaldığı düşünülmektedir. Kan protein düzeylerinin azalan protein sentezi ve/veya artan yıkımı ve proteolitik aktivite ile ilişkide protein kayıplarının sonucunda azalabileceği öngörülmüştür (Shakoori vd., 1990). Pestisit ve ağır metallerin *O. niloticus*'ta serum parametreleri üzerine karşılaştırılmalı etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada sonuçlarımızla paralel olarak serum total protein düzeylerinde toksikantların etkisinde önemli azalışların olduğu ve bu azalışların kirlenmeye karaciğer dokusu üzerine olan toksik etkileriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Firat vd., 2011).

Balıklarda serum iyon düzeyleri sucul ortamlardaki kirlenmeye fizyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan yararlı belirteçler olup ağır metal toksikolojisiyle ilgili birçok çalışmada balıklardaki ozmotik regülasyon ve iyon dengesindeki değişiklikler hakkında bilgiler sunmaktadır (Firat ve Kargin, 2010; Firat vd., 2011). Kanın ozmatik basıncının korunmasında ve iyon homeostazisinde sodyum, klor ve potasyum gibi iyonlar önemli roller oynamaktadır. Gerek ağır metaller gerekse de pestisitlerin balıklarda iyon regülasyonunu etkilediği iyi bilinmektedir (Firat vd., 2011). Bu çalışmada da *O. niloticus*'ta civanın tek başına etkisinde özellikle de yüksek ortam derişiminde serum sodyum ve klor düzeylerinde azalışlar; potasyum düzeylerinde ise artışlar saptanmıştır. Bununla birlikte civanın zeolitle birlikte etkisinde ise analiz edilen tüm bu elektrolit düzeylerinde önemli bir değişim belirlenmemiştir.

Serum iyon düzeylerindeki azalış/ artışların büyük bir olasılıkla civanın etkisinde iyon regülasyonunda önemli roller oynayan dokular özellikle de solungaç dokusunun hasar görmesi, klorid hücrelerin aktivitesinin engellenmesi ve Na/K-ATPaz gibi enzimlerin inhibisyonuna bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Firat vd. (2011) de metallerin (bakır ve kurşun) etkisinde *O. niloticus*'un serumunda sodyum ve klor düzeylerinin azaldığını potasyum düzeylerinin ise arttığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar metallerin toksik etkisiyle solungaç ve böbrek gibi organlardaki histopatolojik bozukluklara bağlı olarak iyon regülasyon mekanizmasının zarar görmesinin serum iyon düzeylerinde değişikliklere yol açtığını vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada da çeşitli metallerin etkisinde *O. niloticus*'ta serum iyon (sodyum, klor, potasyum ve

kalsiyum) düzeylerinde önemli değişikliklerin olduğu ve bu değişikliklerin solungaç ve bağırsaklar gibi iyon alım ve atılımında rol oynayan dokulardaki hasarlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Öner vd., 2008).

Bu çalışmada *O. niloticus*'un kan dokusunda kortizol, glukoz, potasyum düzeylerindeki artışların ya da total protein, sodyum ve klor düzeylerindeki azalışların zeolit ile birlikte etkisine oranla civanın tek başına etkisinde daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar civanın biyokimyasal parametreler üzerine olan toksik etkilerinin zeolit varlığında ya kısmen ya da tamamen düzeldiğini göstermektedir. Zeolitin civayla etkileşimi antagonistik bir etkileşimdir. Bu mineral civa toksisitesini azaltmış ya da büyük bir oranda önlemiştir. Önceki çalışmalarda da farklı balık türlerinde zeolitin civayı da içeren çeşitli ağır metallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu bir rolü olduğu saptanmıştır. Çalışmamızdaki sonuçlara benzer sonuçlar Çoğun ve Şahin (2013)'in yaptığı çalışmada da bulunmuştur. Araştırmacılar kurşun ve kurşun+zeolit karışımlarının etkisinde *O. niloticus*'ta kan dokusu enzim aktiviteleri ile kortizol düzeylerinin kurşunun tek başına etkisinde daha fazla arttığını ve zeolitin kurşun toksisitesini kısmen ya da tamamen engellediğini belirtmişlerdir. Kadmiyum ve kadmiyum+zeolit etkisinde ise *O. mossambicus*'ta hematolojik parametrelerdeki değişimlerin değerlendirildiği çalışmada kadmiyumun doğrudan etkisinde kan parametrelerinde gözlemlenen değişikliklerin zeolit varlığında düzeldiği belirlenmiştir (James, 2000). *Heteropneustes fossilis*'te civanın (Chaurasia ve Jain, 2006) ve kurşunun (Mishra ve Jain, 2009) tek başına etkisinde dokuların azalan protein düzeylerinin zeolit varlığında kontrol grubu değerlerine döndüğü rapor edilmiştir. Yine *H. fossilis* türü balıklarda arsenik

toksisitesi üzerine zeolitin koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada arseniğin tek başına etkisinde karaciğer enzim aktivitelerinin arttığı; arsenik+zeolit karışımında ise bu enzim aktivitelerinin kısmen arttığı ve zeolitin arsenik toksisitesi üzerine antagonistik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Balasubramanian ve Kumar, 2013).

Sonuç olarak bu çalışma civanın *O. niloticus*'un kan dokusundaki biyokimyasal parametreleri etkilediğini ve bu etkinin metalin yüksek ortam derişimlerinde ve etki süresinin uzamasıyla genellikle arttığını göstermiştir. Civanın etkisinde serum enzim aktiviteleri, metabolit ve iyon düzeylerinde artış/azalışların olduğu ve bu değişikliklerin zeolit varlığında ya kısmen ya da tamamen düzeldiği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarımız zeolitin civa toksisitesi üzerine koruyucu bir etki olduğunu göstermektedir. Zeolitin iyon değiştirme yeteneğine bağlı olarak üç boyutlu kafes şeklindeki geniş hacimli yapısı içerisinde civayı tutarak, sudan uzaklaştırarak serbest civa bulunurluğunu azalttığı ve böylelikle civanın balıklar tarafından alınımını azaltarak bu metalin biyokimyasal toksisitesi üzerine antagonistik etki yaptığı düşünülmektedir. Çalışmamız aynı zamanda balıklarda ağır metal toksikolojisinin ve bu toksikoloji üzerine zeolitin koruyucu etkisinin değerlendirilmesinde kan dokusundaki biyokimyasal parametrelerin birer biyobelirteç olarak kullanılabilceğini de göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma FEFYL2014-0009 nolu Adıyaman Üniversitesi (ADYÜ) Bilimsel Araştırma Projesi ile yürütülmüş olup ADYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

KAYNAKÇA

- Balasubramanian, J. & Kumar, A. (2013). Effect of sodium arsenite on liver function related enzymes of cat fish *Heteropneustes fossilis* and its chelation by zeolite. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2): 53-58. doi: [10.5132/eec.2013.02.008](https://doi.org/10.5132/eec.2013.02.008)
- Barton, B.A. & Iwama, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A. & Cataudella, S. (1998). Serum parameters of adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): Effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121A: 351-354. doi:[10.1016/S1095-6433\(98\)10134-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10134-4)
- Chaurasia, M.K. & Jain, S.K. (2006). Natural zeolite mediated mercury toxicity in fish. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 20(2): 303-308.
- Chen, C.Y., Wooster, G.S., Getchell, R.G., Bowser, P.R. & Timmons, M.B. (2003). Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, 218: 89-102. doi:[10.1016/S0044-8486\(02\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00499-4)
- Cogun, H.Y., Firat, Ö., Firat, Ö., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Kargin, F. & Kötemen, Y. (2012). Protective Effect of selenium against mercury induced toxicity on hematological and biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(3): 117-122. doi: [10.1002/jbt.20417](https://doi.org/10.1002/jbt.20417)
- Çoğun, H.Y. & Şahin, M. (2013). The effect of lead and zeolite on hematological and some biochemical parameters in Nile fish (*Oreochromis niloticus*). *Current Progress Biological Research*, 12: 277-286.
- Fergusson, J.E. (1990). The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press, Oxford, p. 16.
- Firat, Ö. & Kargin, F. (2010). Biochemical alterations induced by Zn and Cd individually or in combination in the serum of *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 647-653. doi: [10.1007/s10695-009-9337-3](https://doi.org/10.1007/s10695-009-9337-3)
- Firat, Ö., Çoğun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F. & Kötemen, Y. (2011). A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 657-666. doi: [10.1007/s10695-011-9466-3](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9466-3)
- Gharraei, A., Ghaffari, M., Keyvanshokoo, S. & Akrami, R. (2011). Changes in metabolic enzymes, cortisol and glucose concentrations of Beluga (*Huso huso*) exposed to dietary methylmercury. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 485-493. doi: [10.1007/s10695-010-9450-3](https://doi.org/10.1007/s10695-010-9450-3)
- Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T. & Ferreira, C.M. (2007). Hematological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(4): 619-626.
- Jain, S.K. (1999). Protective role of zeolite on short and long term lead toxicity in the teleost fish *Heteropneustes fossilis*. *Chemosphere*, 39(2): 247-251.

- James, R. (2000). Effect of zeolite on reduction of cadmium level in water and improvement of haematological parameters in *Oreochromis mossambicus*. *Indian Journal of Fisheries*, 47: 29-35.
- Martinez, F.J., Garcia-Riera, M.P., Canteras, M., De Costa, J. & Zamora, S. (1994). Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Simultaneous influence of various factors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107: 95–100.
- Misaelides, P. (2011). Application of natural zeolites in environmental remediation: A short review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 144: 15–18. doi: [10.1016/j.micromeso.2011.03.024](https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.03.024)
- Mishra, M. & Jain, S.K. (2009). Effect of natural ion exchanger chabazite for remediation of lead toxicity: An experimental study in teleost fish *Heteropneustes fossilis*. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1): 39-44.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Journal of Fish Biology*, 9: 211–268.
- Öner, M., Atli, G. & Canli, M. (2008). Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 360–366. doi: [10.1897/07-281R.1](https://doi.org/10.1897/07-281R.1)
- Papaioannou, D., Katsoulos, P.D., Panousis, N. & Karatzias, H. (2005). The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 84:161–170. doi:[10.1016/j.micromeso.2005.05.030](https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.05.030)
- Rashed, M.N. (2001). Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International*, 27: 27-33. doi:[10.1016/S0160-4120\(01\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00050-2)
- Shakoori, A.R., Aziz, F., Alam, J. & Ali, S.S. (1990). Toxic effects of talastar, a new synthetic pyrethroid, on blood and liver of rabbit. *Pakistan Journal of Zoology*, 23: 289–300.
- Taş, M., Demirel, R., Şentürk, D., Kurt, D., Bacinoğlu, S., Cirit, Ü. & Ketani, M.A. (2007). Effects of dietary natural zeolite on the testicular weight, body weight and spermatological characteristics in rats. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University*, 33(3): 33-42.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Review*, 7: 591–625.
- Yang, J.L. & Chen, H.C. (2003). Effects of gallium on common carp (*Cyprinus carpio*): Acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology. *Chemosphere*, 53: 877–882. doi:[10.1016/S0045-6535\(03\)00657](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00657)