



## Nil Tilapyası, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Karaciğer Dokusunda Kurşunun Neden Olduğu Oksidatif Strese Karşı Humik Maddelerin Koruyucu Etkisi

Ferbal Özkan - Yılmaz<sup>1\*</sup>, Zülfiye Su<sup>1</sup>, Arzu Özlüer-Hunt<sup>2</sup>, Metin Yıldırım<sup>3</sup>, Serap Yalın<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, 33160 Mersin, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 33160 Mersin, Türkiye

<sup>3</sup>Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 33160 Mersin, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

### ÖZ

#### Araştırma Makalesi

Geliş 16 Mart 2018  
Kabul 05 Temmuz 2018

**Anahtar Kelimeler:**  
*Oreochromis niloticus*  
Kurşun  
Humik madde  
Antioksidan sistem  
Lipid peroksidasyon

\*Sorumlu Yazar:

E-mail: ferbal1111@hotmail.com

Bu çalışmada, subletal kurşun (Pb) derişiminin Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*)'nda antioksidan enzim sistemi üzerine etkilerine karşı, yeme katılan humik maddenin koruyucu etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1,5 mg/L kurşun nitrat Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ortam derişimi etkisindeki balıklar, %0,2 oranında humik madde katkısı bulunan yem ile beslenmişlerdir. Kontrol grubu, humik madde (HM), Pb, ve Pb+HM gruplarını içeren bu çalışmada 4. ve 10. günlerde karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Karaciğer dokusu katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondealdehit (MDA) seviyesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, subletal kurşun derişimi uygulanan grupta 4. ve 10. günlerde önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Pb grubu ile HM+Pb grubu karşılaştırıldığında, CAT ve SOD aktivitesinde önemli bir değişime neden olmadığı, ancak humik madde uygulamasının karaciğer dokusu lipid peroksidasyonu üzerine Pb toksisitesinin etkisini azalttığı belirlenmiştir. Deneme sonuçlarına göre, yeme ilave edilen %0,2 humik madde, 1,5 mg/L Pb ortam derişiminin, *O. niloticus* karaciğer dokusu lipid peroksidasyon üzerindeki toksisitesini belirli düzeyde azalttığı belirlenmiştir.

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(8): 1015-1021, 2018

## Protective Effect of Humic Substances Against Oxidative Stress Caused by Lead in Liver of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Research Article

Received 16 March 2018  
Accepted 05 July 2018

**Keywords:**  
*Oreochromis niloticus*  
Lead  
Humic substance  
Antioxidant system  
Lipid peroxidation

\*Corresponding Author:

E-mail: ferbal1111@hotmail.com

In this study, the protective effect of humic substance in the fish feed was investigated against the effects of subletal lead (Pb) concentration on the antioxidant enzyme system in *Oreochromis niloticus*. For this purpose, the fish which were affected by 1.5 mg/L lead nitrate Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> medium concentration were fed with feed containing 0.2% of humic substance. Liver samples were taken at 4th and 10th days in this study, which included control group, humic substance (HM), Pb, and Pb + HM groups. The enzyme activity of liver tissue catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) of *O. niloticus* and the level of malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, increased significantly at 4th and 10th days in the group with subletal lead concentration compared with the control group. Compared with Pb and HM+Pb groups, it was determined that humic substance application decreased Pb toxicity on lipid peroxidation of liver tissue and did not cause a significant change in CAT and SOD activity. According to the results of the experiment, 0.2% humic substance added to the feed reduced toxicity of subletal Pb concentration on liver tissue lipid peroxidation.

DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i8.1015-1021.1914>

## Giriş

Kurşun (Pb), doğal olarak bulunabilen bir element olup hava, toprak ve su ortamlarında çok çabuk yayılma özelliğine sahip olan yaygın bir çevresel kirleticidir (Farmand ve ark., 2005). Sucul ortama; madencilik, kömür yataklarından, kauçuk sanayinden, benzin katkı maddesi olarak, pil ve boya sanayinin atıkları ile sisteme dahil olmaktadır. Yapılan araştırmalar ile kurşun maruziyetinin balıklarda biyokimyasal ve fizyolojik bozukluklara ve serbest radikaller ile reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından oluşturulan oksidatif strese neden olduğu saptanmıştır (Ateş ve ark., 2008; Flora ve ark., 2012).

Hücrelerdeki ve hücre dışı vücut sıvılarındaki ROT seviyeleri, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların etkisiyle kontrol edilir. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), serbest radikalleri yok etme yeteneğinde olan enzimatik antioksidan savunma sistemi (ASS) elemanlarından (Van der Oost ve ark., 2003). Diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklar da enzimatik ve enzimatik olmayan ASS'ne sahiptirler (Trenzado ve ark., 2006). Antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve antioksidan maddelerin seviyeleri, stres de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik veya patolojik koşullarla ilişkili bulunmuştur. Stresin bir dizi biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişikliğe yol açtığı ve böylece normal vücut homeostazını değiştirdiği iyi bilinmektedir (Tsigos ve ark., 2016). Lipid peroksidasyon (LPO), çok iyi tanımlanmış bir hücre hasar mekanizması olup doku ve hücrelerde oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünlerinin seviyelerinin artması, insan ve diğer omurgalılarda çeşitli kronik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Ramana ve ark., 2017).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde en önemli sorunlardan kabul edilen stres ve hastalık unsurlarının etkisinin azaltılması ya da oluşumunun engellenmesi ve bunun yanında büyüme performansına olumlu tesir göstererek verimin artırılmasını sağlamak için yem katkı maddelerinin kullanımı günümüzde önem kazanmıştır (Yılmaz ve Koç, 2016). Alternatif yem katkı maddeleri olarak, hayvansal üretim uygulamalarında, büyüme hızlarını, yem verimliliğini ve bağışıklığı artırarak ve hastalık riskini azaltarak hayvan üretimini iyileştirmek için humik maddeler (HM) kullanılmaktadır (Islam ve ark., 2005; Arafat ve ark., 2015). Humik maddeler, organik maddelerin toprak içerisindeki parçalanma ürünleri olan karbonhidrat, amino asit ve fenoller gibi bazı maddelerin meydana getirdiği humustan köken alan humik, fulvik ve ulmik asitten ve bazı mikro minerallerden meydana gelmektedir (Tunç ve Yörük, 2017). Humik maddelerin, sindirim kanalında optimum pH oluşumunu sağlayarak patojen mikroorganizmaların çoğalmalarını engellediği, kalsiyum ve çeşitli iz minerallerden yararlanmayı artırdığı, ağır metallerle şelat oluşturmak suretiyle detoksifikasyonlarında rol oynadığı (Mager ve ark., 2010), hastalıklara karşı direnç sağladığı ve bağışıklık sistemini artırıcı etki gösterdikleri (Nakagwa ve ark., 2009), metallerin toksik etkilerini ve dolayısıyla ROT zararlarını azalttığı (Alak ve ark., 2013) yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bununla birlikte, su ürünleri yetiştiriciliğinde humik madde kullanımı yeni bir

alan olup, yaygın olarak araştırılmamıştır (Abdel-Wahap ve ark., 2012).

Karaciğer, ksenobiyotik metabolizmanın birincil organıdır ve oksitlenebilir substratlar bakımından zengin oldukları için peroksidatif hasara karşı duyarlıdır (Mudipalli, 2007). Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) toksikolojik çalışmalar için kolay üreme ve yüksek adaptasyona sahip olması nedeniyle iyi bir modeldir (Wu ve ark., 1999). Bu çalışmada ağır metal olan kurşunun subletal derişiminin *O. niloticus*'da oluşturacağı oksidatif strese karşı humik maddelerin koruyucu rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, 1,5 mg/L kurşun ortam derişimine maruz kalan balıklar, %0,2 oranında humik madde ilave edilmiş yem ile 10 gün beslenmiştir. Deneme süresi sonunda, balıkların karaciğer dokusu CAT, SOD enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ölçmek amacıyla MDA seviyesi belirlenmiştir.

## Materyal ve Yöntem

Araştırma Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma merkezinde yeralan kontrollü ortam koşullarına sahip Temel bilimler laboratuvarında yapılmıştır. Deneme materyali olarak 35±1,50 g ağırlık ve 14±0,28 cm boya sahip *O. niloticus* bireyleri kullanılmıştır. Deneme uygulamaları 40×100×40 cm boyutlarında cam akvaryumlarda gerçekleştirilmiştir. Balıklar 15 gün süreyle ortam koşullarına uyum için bekletilmiştir. Aklimasyon süresince balıklar günde 1 kez, toplam biyo kütlelerinin %2'si oranında hazır pelet yem ile beslenmişlerdir. Laboratuvarında 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodu uygulanmış ve akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi (merkezi olarak çalışan blower ile oluşturulan ve tüm ünitelere dağıtılan hava borularından çekilen hava hortumu ve hava taşı kullanılarak havalandırılmıştır. Deneme iki seri halinde yapılmış ve her seride 4'er adet cam akvaryum kullanılmıştır. Belirlenen süreler dikkate alınarak her seri için akvaryumların herbirine 6'şar adet balık konulmuştur. Denemenin bir serisinde 24 olmak üzere toplamda 48 adet balık kullanılmıştır. Akvaryumlarda evaporasyon, presibitasyon ve adsorbsiyon gibi nedenlerle kullanılan çözeltilerin derişiminde değişimler olabileceği için, suları gūnaşırı (2 gün ara ile) dinlendirilmiş ve kloru uçurulmuş su ile değiştirilmiştir. Denemede 23 ± 1°C sıcaklık; 7,35 ± 0,76 pH; 6,8 ± 0,55 mg/L çözülmüş oksijen; 229 ± 0,51 mg/L CaCO<sub>3</sub> toplam sertlik değerlerine sahip su kullanılmıştır.

Denemede kontrol yemi olarak Çamlı Yem A.Ş. tarafından üretilen ticari yem (Pelet No:3/ %44 ham protein, %18 ham yağ, %12 nem, %12 kül ve %3 lif) kullanılmıştır. Pelet yem öğütülmüş ve humik madde, ticari balık yemine kg başına 2 gr (%0,2) ilave edilmiştir. Homojen karışım için bir mutfak robotunda harmanlanmış ve yumuşak bir hamur oluşturmak üzere karışıma yeterli su eklenmiştir. Elde edilen hamur 3 mm çapında bir kalıpla bir kıyıcıdan geçirilmiştir. Peletler bir fırında (40°C) kurutulmuştur. Kontrol yeme humik madde ilave edilmeksizin, benzer şekilde işlem yapılmıştır. Denemede "Farmavet International" firmasının ürünlerinden olan Farmarine® kullanılmıştır. Farmarine, humik, fulvik ve

ulmik asitlerin kombinasyonundan oluşan verim arttırıcı olarak önerilen bir üründür. Yapılan farklı çalışmalarda balık yemlerine ilave edilen humik madde miktarları, %0,1 ile %10 arasında değişmektedir (Kodama ve ark., 2007; Abdel-Wahab ve ark., 2012). Farmavet firması bu ürünün balık yemlerine verim arttırıcı olarak 1 kg/ton (%0,1) şeklinde kullanılmasını önermektedir. Bu çalışmada 2 gram/kg (%0,2) oranı kullanılmıştır. Deneme süresince HM ve HM+Pb gruplarında bulunan balıklar, %0,2 oranında humik madde ilave edilen yem ile beslenmişlerdir.

Önceki yapılan araştırmalarda *O. niloticus* için kurşunun 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 14,93 mg/L; olarak bulunmuştur (Awoyemi ve ark., 2014). Bu çalışmada, subletal derişim olarak 1,5 mg/L (LC<sub>50</sub>'nin 1/10 değeri) kullanılmıştır. Metal çözültisinin hazırlanmasında kurşunun suda çözülebilen formu olarak kurşun nitrat (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) kullanılmıştır. Deneme uygulamasında metal kullanımı, yarı statik düzenek şeklindedir.

#### Deneme grupları:

- Kontrol :Çeşme suyu + Normal ticari yem ile besleme  
 HM :Çeşme suyu + Humik madde ilave yem ile besleme  
 Pb :1,5 mg/L Pb + Normal ticari yem ile besleme  
 HM + Pb :1,5 mg/L Pb + Humik madde ilave yem ile besleme

Belirlenen deneme günlerinde (4. gün ve 10. gün) her gruptan 6'şar birey alınarak her birey bir tekrar olacak şekilde kullanılmıştır. Beyin omurilik bağlantısı kesilerek öldürülen bu balıkların karaciğer dokuları buz üzerinde ayrı eppendorf tüplere alınarak hızla -20°C'de dondurulmuştur. Biyokimyasal analizlere başlamadan önce karaciğer doku örnekleri %9'luk serum fizyolojik çözültisi içerisinde 10000 devir/dakika hızda 5 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Isınma nedeniyle meydana gelebilecek enzim aktivite kaybını önlemek üzere örnekler buz içerisinde homojenize edilmişlerdir. Homojenatlar +4°C'de 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatant, CAT, SOD enzim aktiviteleri ile MDA ve protein seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Doku CAT aktivitesi Aebi (1974) yöntemine göre belirlenmiştir. Yöntemin, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) substratının enzimatik ayrışmasının 240 nm'de absorbanstaki azalma ile takip edilmesi esasına dayanır. Birim zamandaki absorban farkı, CAT aktivitesinin bir ölçüsü olarak kullanılmıştır. SOD aktivitesi, ksantin / ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen O<sub>2</sub>'ye bağlı nitroblue tetrazolium (NBT) azalmasının inhibisyonu ile ölçülmüştür (Sun ve ark. 1988). Bir birim SOD aktivitesi, NBT indirgeme hızının %50 inhibisyonuna neden olan protein miktarı olarak tanımlanmıştır. NBT'deki süperoksit anyonunun mavi formazan ile indirgenmesi 560 nm'de ölçülmüştür. Enzim aktiviteleri "U/mg protein" olarak ifade edilmiştir. LPO indeksi olarak ölçülen doku MDA seviyesi, Yagi (1998) yöntemi kullanılarak tiyobarbitürik asit reaksiyonu ile belirlenmiştir. Tiyobarbitürik, asitle kaynatıldığında malondialdehid ve diğer aldehytler, spektrofotometrik

olarak analiz edilebilen pembe renkli bir ürün verir. 532 nm'de ölçülen bu değerler "nmol/mg protein" olarak ifade edilmiştir. Doku protein içerikleri, Lowry ve ark.(1951), tarafından geliştirilen yöntemle göre antioksidan enzimlerin spesifik aktivitesini belirlemek için ölçülmüştür. Numunelerin absorpsiyonları, spektrofotometre ile 750 nm dalga boyunda belirlenmiştir.

CAT, SOD enzim aktiviteleri ve MDA seviyesine ait deneme verilerinin istatistiksel analizlerinde deneme grupları ortalamaları arasındaki farklar, One Way-Anova varyans analizi yöntemiyle, önem kontrolü Duncan testi uygulanarak yapılmıştır. Deneme günleri olan 4. ve 10. gün verilerinin karşılaştırılmasında t testi uygulanmıştır. Deneme verileri aritmetik ortalama ± standart hata ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ ) şeklinde hesaplanmıştır. Önemlilik derecesi olarak P<0,05 kabul edilmiştir.

#### Bulgular

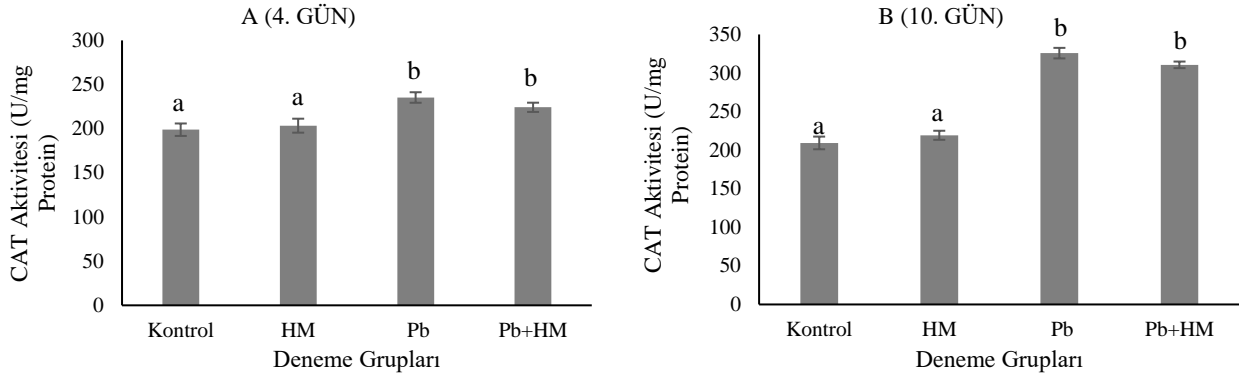
Kurşunun 1,5 mg/L derişimi ve yeme katılan %0,2 humik maddenin 10 günlük uygulanması sonucu *O. niloticus* karaciğer CAT enzim aktivitesinde değişim Şekil 1'de sunulmuştur. CAT aktivitesi bakımından 4. ve 10. günlerde yapılan ölçümlerde, kontrol grubu ve humik madde uygulanan gruplar arasındaki istatistiksel önemli bir fark belirlenmemiştir. Kontrol grubu CAT aktivitesi, 4. ve 10. günlerde 193,88-207,52 U/mg protein; HM grubunda 202,04-199,78 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Kurşunun 1,5 mg/L ortam derişimi, kontrol grubuna göre 4. günde yaklaşık %18, 10. günde %55 oranlarında önemli (P<0,05) artışa neden olmuştur. HM+Pb grubunda bulunan balıkların karaciğer CAT aktivitesi, kurşun uygulanan grup ile kıyaslandığında 4. ve 10. günlerde önemli fark bulunmamıştır. Deneme günleri olan 4. ve 10. günlerin birbiri ile karşılaştırılması durumunda, HM grubunda önemli fark saptanmamıştır. Pb uygulaması, 10. günde 4. güne oranla %38 oranında önemli artışa (P<0,05) neden olmuştur.

Kurşunun 1,5 mg/L ortam derişimi ve yeme katılan %0,2 humik maddenin 10 günlük uygulanması sonucu *O. niloticus* karaciğer SOD enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 2'de sunulmuştur. SOD aktivitesi bakımından 4. ve 10. günlerde yapılan ölçümlerde, kontrol grubu ve humik madde uygulanan gruplar arasındaki farklılık, istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur. Uygulanan kurşun derişimi, kontrol grubuna göre 4. günde istatistiksel yönden önemli bir fark oluşturmamış, 10. günde %70 oranında önemli (P<0,05) artışa neden olmuştur. HM+Pb grubunda bulunan balıkların karaciğer SOD aktivitesi kurşun uygulanan grup ile karşılaştırıldığında önemli fark bulunmamıştır. Deneme günleri olan 4. ve 10. günlerin birbiri ile karşılaştırılması durumunda, Pb derişimi uygulanan gruptaki *O. niloticus* bireylerinin karaciğer SOD aktivitesinde 10. günde 4. güne oranla %49 oranında artış bulunmuştur. Aynı şekilde HM+Pb grubunda da %49 artma saptanmıştır.

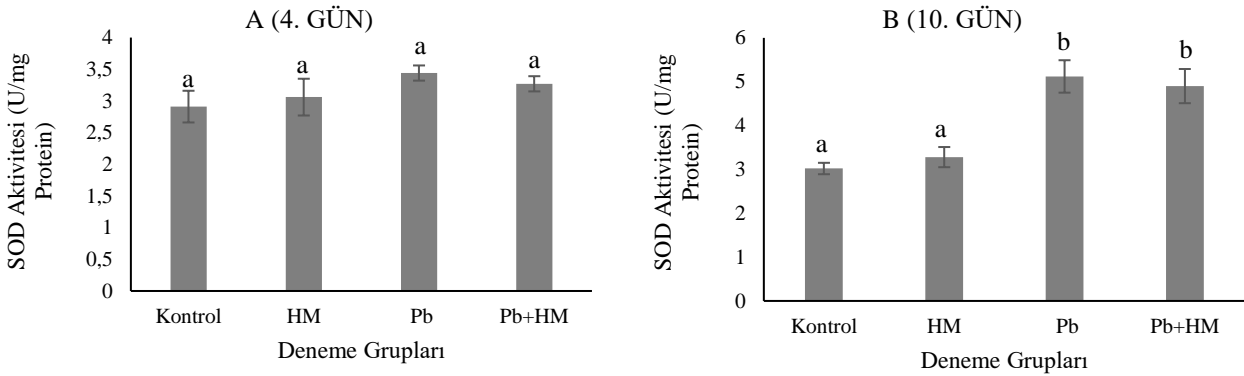
*O. niloticus* karaciğer dokusu MDA seviyesi üzerine, 1,5 mg/L Pb ortam derişimi ve %0,2 humik madde katkılı yem uygulamasının etkileri Şekil 3'de gösterilmiştir. Doku MDA seviyesi bakımından 4. ve 10. günlerde yapılan ölçümlerde, kurşunun 1,5 mg/L ortam derişimi uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki farklılık

istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Kurşun uygulaması 4. günde %63, 10. günde %107 oranlarında önemli artışa ( $P<0,05$ ) neden olmuştur. HM+Pb grubunda bulunan balıkların karaciğer MDA seviyesi ile kurşun uygulanan gruptaki balıkların MDA seviyesi ölçümleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Bu farklılık, 10. günde %22 oranında önemli ( $P<0,05$ ) azalma şeklinde saptanmıştır.

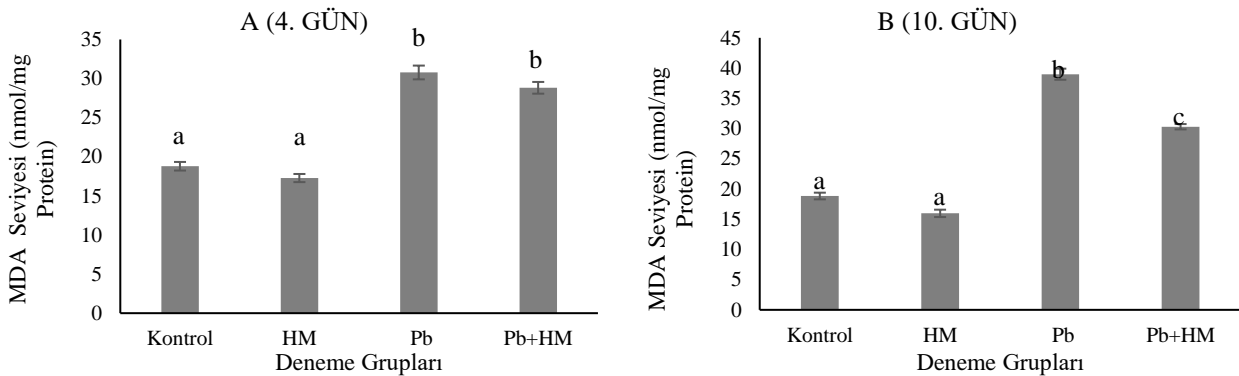
Deneme günlerinin karşılaştırılması durumunda, kurşun derişimi uygulanan gruptaki balıkların karaciğer MDA seviyesinde 10. günde 4. güne oranla %26 oranında önemli artış ( $P<0,05$ ) belirlenmiştir. HM ve HM+Pb uygulaması yapılan gruplarda, deneme günlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak önemli bir değişim belirlenmemiştir.



Şekil 1 1,5 mg/L Pb ortam derişimi ve yeme katılan %0,2 HM uygulamasının *O. niloticus*'un karaciğer dokusu CAT aktivitesi üzerine 4. gün (A) ve 10. gün (B) etkileri. Farklı harfler istatistik ayrımı belirtmektedir ( $P<0,05$ ).  
Figure 1 Effects of 1.5 mg/L Pb medium concentration and 0.2% HM dietary supplementation on CAT activity of liver tissue of *O. niloticus* on day 4 (A) and day 10 (B). Different letters indicate statistical differences ( $P<0.05$ ).



Şekil 2 1,5 mg/L Pb ortam derişimi ve yeme katılan %0,2 HM uygulamasının *O. niloticus*'un karaciğer dokusu SOD aktivitesi üzerine 4. gün (A) ve 10. gün (B) etkileri. Farklı harfler  $P<0,05$  düzeyinde istatistik ayrımı belirtmektedir.  
Figure 2 Effects of 1.5 mg/L Pb medium concentration and 0.2% HM dietary supplementation on SOD activity of liver tissue of *O. niloticus* on day 4 (A) and day 10 (B). Different letters indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).



Şekil 3 1,5 mg/L Pb ortam derişimi ve yeme katılan %0,2 HM uygulamasının *O. niloticus*'un karaciğer dokusu MDA seviyesi üzerine 4. gün (A) ve 10. gün (B) etkileri. Farklı harfler  $P<0,05$  düzeyinde istatistik ayrımı belirtmektedir.  
Figure 3 Effects of 1.5 mg/L Pb medium concentration and 0.2% HM dietary supplementation on MDA level of liver tissue of *O. niloticus* on day 4 (A) and day 10 (B). Different letters indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).

## Tartışma

Bu çalışmada 1,5 mg/L kurşun subletal derişimi etkisiyle, *O. niloticus*'un karaciğer CAT ve SOD enzim aktiviteleri süreye bağılı olarak artmıştır. Subletal kurşun derişimlerine 15 gün maruz kalma sonucu *O. niloticus* karaciğer CAT aktivitesinin kontrole oranla arttığı belirtilmiştir (Atlı ve Canlı, 2007). *Channa punctatus* ile yapılan bir çalışmada barsak dokusunda CAT aktivitesi azalma, SOD aktivitesinde artış bulunmuştur (Paul ve Sengupta, 2013). Antioksidan enzimlerin aktivitesi, kontaminantların baskısı altında indüklenebilir veya inhibe edilebilir. Oksidatif stres altında, enzim aktivitelerinde farklılıklar görülebilir. Stres başlangıcında aktiviteler uyarılır, ancak stres uzun sürerse, enzim inhibisyonu başlar (Annabi Berrahal ve ark., 2007). Bu olay, stres yoğunluğuna, türlerinin hassasiyetine bağılı olarak değişebilir (Awoyemi ve ark., 2014).

SOD ve CAT enzimleri ROT'ne karşı ilk savunma sağlar ve ROT'un toksisitesine karşı hücrel bir savunma mekanizmasını temsil eder (Van der Oost ve ark., 2003). SOD enziminin, üretilen süperoksit radikallerini hidrojen peroksitlere dönüştürerek serbest radikal kaynaklı zarara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Hidrojen peroksit daha sonra sisteme su ve moleküler oksijene dönüştüren CAT enzimi ile giderilir (Van der Oost ve ark., 2003). Artan CAT ve SOD aktiviteleri, metallere uzun süreli maruz kalındığında detoksifikasyon mekanizmasına doğru muhtemel bir değişimi göstermektedir. Bu durum, *O. niloticus*'da SOD'n aktivitesini arttırarak süperoksit anyon radikalının toksik etkisine karşı kendisini korumasını, CAT aktivitesi artış ise, daha yüksek düzeyde peroksit seviyesinin varlığına işaret etmektedir (Fernandes ve ark., 2008). Bu çalışmada CAT ve SOD enzim aktivitelerinde görülen artış, Pb ortam derişimi etkisiyle *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksit oluşumunun artmış olabileceğini ihtimalini göstermektedir (Paul ve Sengupta, 2013).

Bu çalışmada 1,5 mg/L kurşun ortam derişimin etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA seviyesi, deneme süresine bağılı olarak artmıştır. *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* ve *Acipenser baerii*'de Pb derişimlerinin etkisiyle karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyonun arttığı belirtilmiştir (Farombi ve ark., 2007; Brucka-Jastrzębska, 2010). Kurşuna maruz kalmış *Clarias gariepinus*'un karaciğer ve böbrek dokularında lipid peroksidasyon düzeyinde belirgin bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar *C. gariepinus* ve *O. niloticus* (Awoyemi ve ark., 2014) ve *Labeo rohita* (Bangeppagari ve ark., 2014) ile yapılan çalışmalarda da belirlenmiştir.

Temel bir hücrel bozulma değişikliği olan lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ile indüklenen etkilerden biridir ve çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan membranlardan dolayı dokularda kolayca oluşabilmektedir (Cini ve ark., 1994). Membran yapısında bulunan doymamış fosfolipidler ve kolesterol, ROT ile kolayca reaksiyona girerek, lipid peroksidasyona uğrarlar (Ahamed ve Siddiqui, 2007). Bu çalışmada *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinin artması, Pb ortam

derişiminin etkisiyle ROT üretiminin artmasına bağlanabilir (Ling ve Hong, 2010; Maiti ve ark., 2010).

Yapılan çalışmada Pb+HM uygulaması yapılan grup bireylerinde kurşun toksisitesini azaltma olduğu yönünde bulgular belirlenmiştir. CAT ve SOD enzim aktivitelerinde bir değişim oluşturmamış ancak, denemenin 10. gününde lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinde kurşunun yalnız kullanımı olan grup ile karşılaştırılmasında belirgin bir azalma olmuştur. Humik maddelerin balıklarda kullanımı ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Humik maddelerin, gastrointestinal sistemin mukus epitelinde enfeksiyonlara ve toksinlere karşı koruyucu bir film oluşturabildiği, böylece hayvan yemlerinde yem çevirim oranını iyileştirdiği (Islam ve ark., 2005), bazı eser elementler, yardımcı faktörler olarak görev yapabildiği ve sonuç olarak besinlerin sindirimi ve kullanımı için birçok enzimin aktivitesini arttırdığı (Yörük ve ark., 2004; Hayırlı ve ark., 2005), çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir. Humik asidin sazanlarda enfeksiyona karşı koruyucu bir etki gösterdiği tesbit edilmiştir (Kodama ve ark., 2007). Humik asit uygulamasının, balıkların fizyolojik durumunun iyileştirilmesi yoluyla parazitlere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Nakagwa ve ark., 2009; Meinelt ve ark., 2008). Besin ile verilen humik asit katkı maddesinin, balıklarda serum lizozim aktivitesinde artışa neden olduğu ve doğal olarak bağışıklığı arttırdığı bildirilmiştir (Kodama ve ark., 2007). Abel-Wahab ve ark. (2012), humik asidin yem katkı maddesi olarak kullanılmasıyla, *C. carpio*'da toksisiteye ve hastalık direncine karşı nonspesifik bağışıklık tepkisi geliştirdiğini belirtmişlerdir.

Humik maddeler, çürüten organik maddeden kaynaklanan toprak organik kalıntılarıdır ve temel bileşenler olarak humik asit (HA) ve fulvik asit (FA) yanı sıra poliaromatik ve heterosiklik kimyasalların çoklu karboksilik asit yan zincirleri ile kompleks karışımlarını içerir (Klocking, 1994). Kinon, fenol ve karboksilik asit gibi işlevsel grupları içeren bileşimlere sahiptirler. Özellikle, fenolik grupların varlığı, serbest radikalleri nötrleştirme kapasitesi nedeniyle antioksidan özellikleri sağlarlar (De Melo ve ark., 2016). Fenolik bileşikler, bir aromatik halkaya bağılı fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren maddelerdir (Dimitrios, 2006). Fenol hidroksilleri, bir elektron indirgeme reaksiyonlarına katılabilen makromoleküllerdir (Smirnova ve ark., 2012). Humik asit, fenolik ve polifenolik hidroksil grupları yoluyla antioksidan özelliklere sahiptir ve serbest radikal süpürücü olarak davranır (Karadirek ve ark., 2016). Yapılan çalışmada kurşun toksisitesine karşı humik maddenin lipid oksidasyonunu azaltma yönündeki etkisi, HM'nin içeriğinde bulunan fenol bileşiklerinin antioksidan etkisine bağlanabilir (Kudryasheva ve Tarasova, 2015).

Humik maddeler konusunda göz önüne alınması gereken önemli bir konu, organlara veya organellere göç edebildikleri ve stres tepki reaksiyonlarını tetikleyebilecekleri gerçeğidir (Steinberg ve ark., 2003). Bunların, fiziksel ve kimyasal zar tahrişi, biyotransformasyon aktivitesinin indüksiyonu ve modülasyonu, kimyasal savunma proteinlerinin indüksiyonu, iç oksidatif stresin gelişimi ve ROT

savunma enzimlerinin uyarılması gibi etkileri de olabilir (Steinberg ve ark., 2003). Dikkat edilmesi gereken ikinci unsur humik maddelerin şelasyon özellikleridir. Fe, Zn, Mn ve Cu gibi hücresel fonksiyonun korunması için gerekli olan eser elementler çok sayıda metal içeren enzimlerin ayrılmaz bir parçasıdır (Rajkowska ve Protasowicki, 2013). Burada, metallerin humik maddeler tarafından bağlanması, biyolojik açıdan önemli elementlerin hayvan vücuduna alınım miktarlarını azaltıp azaltmayacağını belirlenmesi ve aydınlatılması önemli bir konudur (Zatko ve ark., 2014).

Humik maddelerin olumlu ya da olumsuz etkilerinin hayvanın fizyolojik durumuna bağlı olduğu da gözlenmiştir (Steinberg ve ark., 2003). Çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar, organizmaların türü, yaşı, cinsiyeti, beslenme düzeni, yemin besin kompozisyonu, rasyondaki HM seviyeleri, deneme süresi veya çevresel koşullardan kaynaklanabilir (Tunç ve Yörük, 2017). Ksenobiyotik metabolizması için başlıca metabolik fonksiyonları ve sorumluluğu olan antioksidan özelliklerinin in vitro çalışmalarında HM'lerin elektrofilik özellikleri vurgulanmıştır. Ancak, in vitro denemelerden elde edilen sonuçlar, in vivo denemelere basitçe uygulanamaz. Vücut sıvıları içinde ve hücrelerde bir metalin birkaç iyonunun varlığı, hücre dışı alanlardaki toksik metal birikimi ve toksik metallerin biyolojik ligandlarla etkileşimi humik asitlerin biyolojik etkisini değiştirebilecek faktörlerdir (Islam ve ark., 2005). Kullanılan maddelerin dozu ve kullanım süresinin, pozitif etkiyi elde etmek için önemli olduğu da bilinmektedir. Humik maddelerin güvenli kullanımı için, etki mekanizmalarını daha açık bir şekilde ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Tunç ve Yörük, 2017).

## Sonuç

Bu çalışmada kurşunun 1,5 mg/L derişiminin *O. niloticus*'un karaciğer dokusu CAT ve SOD aktivitelerinde ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinde bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Pb kaynaklı toksisite, ROT üretiminin artması sonucu MDA düzeyinde artış oluşturmuştur. Humik madde kullanımının kurşun toksisitelerinden olan oksidatif stres oluşumu üzerinde belirli derecede azalttığı belirlenmiştir.

Humik maddelerin, hayvanların sağlığı üzerindeki olumlu etkileri bilinmektedir. Balıkların fizyolojik durumunu arttırabilmekte ve stresin yol açtığı fizyolojik ve histolojik sonuçların olumsuzluğunu azaltabilmektedir. Yem katkı maddesi olarak humik maddelerle yapılan araştırmalarda olumlu sonuçlar alınmış olmasına karşın, bazı araştırmalarda verim artışı sağlanmadığı, hatta bazı araştırmalarda olumsuz sonuçlar alınabildiği de gözlenmektedir. Bu durum hayvanların içinde bulunduğu çevresel koşullardan, yemin bileşiminden veya katkı maddesi olarak kullanılan humik maddelerin miktar ve özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Özellikle humik asitlerin elde edildiği kaynak başta olmak üzere, humik asitlerin içeriği, depolanma şartlarındaki farklılıklar, hayvana verilmiş şekli, dozajı gibi birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Bu konular ileride yapılacak çalışmalarla ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

## Kaynaklar

- Abdel-Wahab AM, El-Refae AME, Ammar AA. 2012. Effects of humic acid as feed additive in improvement of nonspecific immune response and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). Egyptian Journal for Aquaculture, 2(1): 83-91.
- Aebi H, 1974. Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of Enzymatic Analysis. New York and London Academic Press, 673-677.
- Ahamed M, Siddiqui MK. 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. Clinica Chimica Acta, 383: 57-64.
- Alak G, Atamanalp M, Topal A, Arslan H, Oruç E, Altun S. 2013. Histopathological and biochemical effects of humic acid against cadmium toxicity in brown trout gills and muscles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 315-320.
- Annabi Berrahal A, Nehdi A, Hajjaji N, Gharbi N, El-Fazaa S. 2007. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. Comptes Rendus Biologies, 330: 581-588.
- Arafat RY, Khan SH, Abbas G, Iqbal J. 2015. Effect of dietary humic acid via drinking water on the performance and egg quality of commercial layers. American Journal of Biology and Life Sciences, 3: 26-30.
- Ates B, Orun I, Talas Z S, Durmaz, G, Yılmaz I. 2008. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Fish Physiology and Biochemistry, 34, 53-59.
- Atlı G, Canlı M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 145: 282-287.
- Awoyemi OM, Bawa-Allah KA, Ottiloju AA. 2014. Accumulation and anti-oxidant enzymes as biomarkers of heavy metal exposure in *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. Applied Ecology and Environmental Sciences, 2(5): 114-122.
- Bangeppagari M, Gooty JM, Tirado JO, Mariadoss S, Thangaswamy S, Maddela NR, Ortiz DR. 2014. Therapeutic efficiency of Spirulina against lead acetate toxicity on the fresh water fish *Labeo rohita*. American Journal of Life Sciences, 2: 389-394.
- Brucka-Jastrzębska E. 2010. The effect of aquatic cadmium and lead pollution on lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in freshwater fish. Polish Journal of Environmental Studies, 19(6): 1139-1150.
- Cini M, Fariello RG, Bianchetti A, Moretti A. 1994. Studies on lipid peroxidation in the rat brain. Neurochemical Research, 19: 283-288.
- De Melo BAG, Motta FL, Santana MHA. 2016. Humic acids: structural properties, and multiple functionalities for novel technological developments. Materials Science and Engineering C, Material for Biological Applications, 62: 967-974.
- Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends in Food Science and Technology, 17: 505-512.
- Farmand F, Ehdaie A, Roberts CK, Sindhu RK. 2005. Lead induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase and guanylate cyclase. Environ. Res. 98, 33-39.
- Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR. 2007. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. International Journal of Environmental Research and Public Health, 4(2): 158-165.

- Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Ferreira M, Salgado MA. 2008. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(2): 262-269.
- Flora G, Gupta D, Tiwari A. 2012. Toxicity of lead: A Review with recent updates, *Interdisciplinary Toxicology*, 5: 47–58.
- Hayırlı A, Esenbuğa N, Macit M, Laçın E, Karaoğlu M, Karaca H, Yıldız L. 2005. Nutrition practice to alleviate the adverse effects of stress on laying performance, metabolic profile, and egg quality in peak producing hens: I. The humate supplementation. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 18(9): 1310-1319.
- Islam KMS, Schuhmacher A, Gropp CM. 2005. Humic acid substances in animal. *Agriculture Pakistan Journal of Nutrition*, 4(3): 126-134.
- Karadirek S, Kanmaz N, Balta Z, Demircivi P, Uzer A, Hizal J, Apak R. 2016. Determination of total antioxidant capacity of humic acids using CUPRAC, Folin-Ciocalteu, noble metal nanoparticle- and solid-liquid extraction-based methods. *Talanta*, 153, 120-129.
- Klocking R. 1994. Humic substances as potential therapeutics. In: N, Miano TM (Eds.): *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1245-1257.
- Kodama H, Denso OF, Nakagawa T. 2007. Protection against atypical aeromonas salmonicida infection in carp (*Cyprinus Carpio* L.) by oral administration of humus extract. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(4): 405-408.
- Kudryasheva NS, Tarasova AS. 2015. Pollutant toxicity and detoxification by humic substances: mechanisms and quantitative assessment via luminescent biomonitoring *Environmental Science Pollution Research*, 2(22):155-167.
- Ling Q, Hong F. 2010. Antioxidative role of cerium against the toxicity of lead in the liver of silver crucian carp. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(3): 367-376.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Mager EM, Brix KV, Grosell M. 2010. Influence of bicarbonate and humic acid on effects of chronic waterborne lead exposure to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 96: 135-144.
- Maiti AK, Saha NK, Paul G. 2010. Effect of lead on oxidative stress, Na+K+ATPase activity and mitochondrial electron transport chain activity of the brain of *Clarias batrachus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84: 672-676.
- Meinelt T, Schreckenbach K, Pietrock M, Heidrich S, Steinberg CEW. 2008. Humic substances Part 1: Dissolved humic substances (HS) in aquaculture and ornamental fish breeding. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(1): 17-22.
- Mudipalli A. 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. *Indian J. Med. Res.* 126, 518–527
- Nakagwa J, Iwasaki T, Kodama H. 2009. Protection against *Flavobacterium psychrophilum* infection (cold water disease) in ayufish (*Plecoglossus altivelis*) by oral administration of humic acid. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(11): 1487-91.
- Paul N, Sengupta M. 2013. Lead induced overactivation of phagocytes and variation in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in intestinal macrophages of *Channa punctatus*. *Modern Research in Inflammation*, 2: 28-35.
- Rajkowska M, Protasowicki M. 2013. Distribution of metals (Fe, Mn, Zn, Cu) in fish tissues in two lakes of different trophy in Northwestern Poland. *Environmental Monitoring Assessment*, 185: 3493-3502.
- Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. 2017. Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2 page, doi.org/10.1155/2017/2163285
- Smirnova OV, Efimova IV, Khil'ko SL. 2012. Antioxidant and pro-oxidant activity of ascorbic and humic acids in radical-chain oxidation processes. *Russ. J. Appl. Chem.*, 85: 252-255.
- Steinberg CEW, Paul A, Pflugmacher S, Meinelt T, Klöcking R. 2003. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals-a review. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12: 391-401.
- Sun Y, Oberley LW, Ying LA. 1988. Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34: 497-500.
- Trenzado C, Hidalgo MC, Garcia-Gallego M, Morales AE, Furne M, Domezain A, Domezain J, Sanz A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccari* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254, 758-767.
- Tsigos C, Kyrou I, Kassi E. 2016. Stress, endocrine physiology and pathophysiology. In: De Groot LJ, et al. (eds) *Endotext* [Internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc.
- Tunç MA, Yoruk MA. 2017. Effects of Humate and Probiotic on the Number of Escherichia coli, Blood and Antioxidant Parameters in Suckling Period of Calves *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(3): 169-176.
- Van der Oost R, Beyer, RJ, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Wu SM, Weng CF, Yu MJ, Lin CC, Chen ST, Hwang JC, Hang PP. 1999. Cadmium-inducible metallothionein in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 758-768.
- Yagi K. 1998. Simple Procedure for Specific Enzyme of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasma. *Methods in Molecular Biology*, 108: 107-110.
- Yılmaz E, Koç C. 2016. Feed additives in aquafeeds. *Scientific Papers-Animal Science Serie*, 66: 155-160.
- Yörük MA, Gül M, Hayırlı A, Macit M. 2004. The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science*, 83: 84-88.
- Zatko D, Vaskova J, Vasko L, Patlevic P. 2014. The effect of humic acid on the content of trace element in mitochondria. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9: 315-319.