



## Farklı Sürelerde Bakır Etkisinde Kalan Tatlısu Midyelerinde (*Unio tigridis*) Antioksidan Enzim Tepkilerinin İncelenmesi

Esin G. CANLI

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Niğde/Türkiye  
<https://orcid.org/0000-0002-0132-3712>

✉: egcanli@gmail.com

### ÖZET

Bu çalışmada, tatlısu midyeleri (*Unio tigridis*) bakırın ( $\text{CuSO}_4$  olarak) farklı derişimlerine (0, 30, 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) farklı sürelerde (0, 7, 14, 21gün) maruz bırakıldıktan sonra, hepatopankreas ve solungaç dokularında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerinin tepkileri incelenmiştir. Midyeler 21 gün süren deneyler esnasında kültür ortamında yetiştirilen tek hücreli algler (*Chlorella vulgaris*) ile (yaklaşık 300,000 alg/ml) beslenmişlerdir. Kontrol midyelerde 0-21 günler arasında hiçbir enzim aktivitesinde anlamlı ( $P>0.05$ ) değişim olmamıştır. Deneyler sonunda bakır etkisiyle herhangi bir mortalite gözlenmezken, midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularında antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı ( $P<0.05$ ) artışlar olmuştur. Buna göre antioksidan enzim aktivitelerindeki en fazla anlamlı artış en uzun etki süresinde olmuştur. CAT ve SOD gibi enzimler, antioksidan savunma sisteminin öncül enzimleri olması nedeniyle en fazla anlamlı artışın görüldüğü enzimler olmuşlardır. Buna rağmen, solungaç ve hepatopankreas dokularının toplam protein düzeyinde anlamlı bir değişim olmamıştır ( $P>0.05$ ). Bu çalışma, letal olmayan bakırın midyelerde oksidatif strese neden olduğunu vurgulamıştır.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 05.10.2021

Kabul Tarihi : 15.11.2021

#### Anahtar Kelimeler

Metal

Bakır

Midye

Antioksidan

Toksosite

## Investigations on the Responses of Antioxidant Enzymes in Freshwater Mussels (*Unio tigridis*) Exposed to Copper in Differing Durations

### ABSTRACT

In this study, freshwater mussels (*Unio tigridis*) were exposed to different concentrations (0, 30, 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) of copper (as  $\text{CuSO}_4$ ) for different durations (0, 7, 14, 21 days) and then the responses of the antioxidant enzymes such as, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) were investigated. Mussels were fed with the unicellular algae (*Chlorella vulgaris*) (approximately 300,000 algae  $\text{ml}^{-1}$ ) cultured in the laboratory conditions. There was no mussel mortality following copper exposures. Likewise, there was no significant ( $P>0.05$ ) change in enzyme activities of control mussels between 0-21 days. There were significant ( $P<0.05$ ) increases in antioxidant enzyme activities in the gill and hepatopankreas, exposure durations playing predominant roles. Since enzymes such as CAT and SOD are the first defense lines of the antioxidant systems, the most increases were observed in the activities of these enzymes. Despite this, there was no significant change in total protein levels of tissues ( $P>0.05$ ). This study showed that that sublethal and low copper concentrations could have toxic effects for mussels, emphasizing oxidative stress of mussels.

### Research Article

#### Article History

Received : 05.10.2021

Accepted : 15.11.2022

#### Keywords

Metal

Copper

Mussel

Antioxidant

Toxicity

**Atıf İçin:** Canlı EG 2022. Farklı Sürelerde Bakır Etkisinde Kalan Tatlısu Midyelerinde (*Unio tigridis*) Antioksidan Enzim Tepkilerinin İncelenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 31-41. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1005168.

**To Cite:** Canlı EG 2022. Investigations on the Responses of Antioxidant Enzymes in Freshwater Mussels (*Unio tigridis*) Exposed to Copper in Differing Durations. KSU J. Agric Nat 25 (1): 31-41. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1005168.

## GİRİŞ

Çevreye salınan her türlü kirleticinin son durağı genellikle sucul ortamlardır. Bu nedenle sucul ortamları ve bu ortamlarda yaşayan organizmaların sağlığını kontrol etmek çevrebilimcilerin önem verdikleri konuların başında gelmektedir. Metaller insanlar tarafından çok uzun yıllardır kullanılmış olmasına karşın, çevreye fazla miktarda salınmaları sanayileşme devrimiyle başlamıştır. Bunun anlamı, 20. yüzyılın başlamasıyla birlikte metal kirliliği de başlamıştır. Clark (1989) sulara kirlilik ve kontaminasyon terimleri arasında bazı farklar olduğunu belirtmiştir. Buna göre su kirliliği, metallerin insan tarafından doğrudan veya dolaylı olarak çevreye salınması sonucu sucul organizmaların çeşitli şekillerde zarar görmesi şeklinde açıklanırken, kontaminasyon sudaki metal seviyelerinin normal değerlerden daha yüksek olması şeklinde açıklanmaktadır. Başka bir deyişle, kontaminasyon bir uyarı sinyali verebilir, ancak kirlilik olabilmesi için insan faaliyetlerinden kaynaklanmış olması ve organizmalar üzerinde olumsuz etkilerinin gözlenmesi gerekir. Tatlı sular denizlere göre çok küçük hacimlere sahip olduklarından, kirlenmenin etkilerine çok daha fazla maruz kalabilmektedirler. Bunun anlamı, tatlı sular denize göre daha hassas ekolojik ortamlardır.

Sucul ortamların metal kontaminasyonunun etkisini doğrudan gözlemleyebilmek genellikle zordur. Bunun için biyobelirteç denilen çeşitli enzimatik veya enzimatik olmayan moleküller kirleticilerin etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Böylece sucul organizmaların yaşadığı stres ve içinde buldukları fizyolojik durum hakkında somut veriler elde edilebilmektedir (Wood ve ark., 2012a ve b). Midyeler çok önemli indikatör organizmalardır ve çevresel kirliliğin veya kontaminasyonunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Nugroho ve Frank, 2012; Goswami ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2021). Bunun en önemli nedenleri, midyelerin beslenme şekilleri ve yerleşik yaşam tarzlarıdır. Suyu filtre ettiklerinden suda bulunan metallerin midyeler tarafından yoğun bir şekilde alınması ve besin zinciri yoluyla taşınması, diğer sucul canlılara göre daha fazla olabilmektedir. Bu bakımdan midyeler besin zinciri açısından da çok önemli organizmalardır. Kirliliğin potansiyel etkilerini belirlemek için midyelerin solungaç ve hepatopankreas gibi aktif organlarında biyobelirteç analizleri yaparak hem midye biyolojisi açısından hem de insanların bir besin kaynağı olması açısından önemli veriler elde edilebilir (Doyotte ve ark., 1997; Sukhovskaya ve ark., 2019). Bu nedenle, farklı sistemlere özgü enzim aktivitelerinin çeşitli organlarda belirlenmesi daha sonra meydana gelebilecek çok ciddi hasarlar açısından “erken uyarı sinyali” olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (Canli ve Stagg, 1996).

Antioksidan enzimler aerobik organizmalarda gerek organizmasının kendi metabolizmasının ürettiği, gerekse dışarıdan alınan kimyasalların neden olduğu oksidatif stresi engellemek için çalışan bir enzim grubudur. Bu enzimler ve görevleri kısaca şu şekilde açıklanabilir. SOD, süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit'e dönüştürür. CAT hidrojen peroksit'i suya indirger. GPX, hidrojen peroksiti azaltır, peroksitleri ve süperoksit radikallerini giderir ve ayrıca okside glutasyonu, indirge glutatona dönüştürür. GST, GSH'nin ksenobiyotiklerle konjugasyonunu katalize eder. GR, okside olmuş glutasyonu bir elektron donörü görevi gören GSH'ye indirger. Organizmalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Winston, 1991). Bu bakımdan antioksidan sistemin enzimleri çevresel faktörlerin neden olduğu oksidatif stres ile başa çıkmada önemlidir (Goswami ve ark., 2014; Canli ve ark., 2019; Zhou vd, 2021). Antioksidan enzim aktiviteleri sucul ve karasal organizmaların karşılaştığı stres hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir ve bu nedenle toksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Wood ve ark., 2012a ve b).

Doğal sucul ortamlarda midyelerdeki metal birikimi ve toksitesi üzerine yapılmış çalışmalar, büyük şehirler ve sanayii bölgeleri dışında midyelerdeki metal birikimini toksik düzeylerde olmadığını vurgulamıştır. Benzer şekilde, bu çalışmada kullanılan kontrol midyelerin dokularında da metal birikimi çok az miktarlarda ölçüldüğünden, midyelerin doğal ortamlarında da metal kirliliği olmadığını vurgulamıştır (Canli ve Canli, 2021a). Laboratuvar deneyleri bakır dahil metal etkisinde kalmanın midyelerin antioksidan sistemini harekete geçirdiği ve antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artışların yanında azalışların da olduğunu göstermiştir (Rajalakshmi ve Mohandas, 2005; Company ve ark., 2008; Jorge ve ark., 2013; Mlouka ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2021; Canli ve Canli, 2021b). Bu çalışmalar, metallerin midyelerde antioksidan savunma sistemini etkilerken metal derişiminin yanında, etki süresi, suyun kimyasal özellikleri ve türün biyolojik özelliklerinin de önemli olduğunu vurgulamıştır. Böylece, bakırın süreye bağlı olarak tatlısu midyelerinin antioksidan sistem enzimleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Bunun için, *U. tigridis* türü tatlısu midyeleri farklı bakır derişimlerine (0, 30, 90 µg/L) farklı sürelerde (0, 7, 14 ve 21 gün) maruz bırakılarak CAT, SOD, GPX, GR ve GST gibi antioksidan enzim aktiviteleri solungaç ve hepatopankreas dokularında ölçülmüştür. Böylece, düşük derişimlerde kronik bakır etkisinin midye antioksidan sistemine olan toksik etkileri değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOD

### Deney Şartları

Bu çalışmada Unionidae familyasına ait midyeler (*Unio tigridis*) kullanılmıştır. Midyeler profesyonel dalgıçlar yardımıyla Gölbaşı gölünden (Hatay) 1-6 metre derinliklerde toplanmıştır (36° 30'17.6 "N 36° 29'10.8" E). Toplanan midyeler uygun şartlarda hızlı bir şekilde laboratuvara getirilip, iki hafta süresince laboratuvar şartlarına uyumları sağlanmıştır. Bunun için midyeler cam akvaryumlara (40x40x120 cm; 120 L) alınarak deneyin yapılacağı su (pH; 8.3±0.08, toplam sertlik; 304.2±21.2 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, alkalinite; 195±11.4 mg Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>L<sup>-1</sup>, iletkenlik; 580±10.8 µS cm<sup>-1</sup>) şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır. Deneyler 22±1.0 °C laboratuvar sıcaklığında yapılmış olup, midyelere oksijen sağlamak (6.0±1.0 mg L<sup>-1</sup>) için hava motorları ile havalandırma yapılmıştır. Suyun fiziksel ve kimyasal kontrolleri Thermo Scientific Orion 5-Star cihazı ile düzenli olarak yapılmıştır. Deney ortamı 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu ile aydınlatılmıştır. Bütün kimyasalların analitik saflıkta olmasına dikkat edilmiş olup, Sigma şirketinden sağlanmıştır.

### Tek Hücreli Alg Üretimi

Midyelerin hem adaptasyon hem de deneyler esnasında beslenmelerini sağlamak amacıyla tek hücreli tatlısu alg (*Chlorella vulgaris*) üretimi yapılmıştır. Alg kültürleri, 8 L kültür ortamı içeren cam kavanozlarda tutulmuştur. Alg üretim ortamları (3NBBM+V ortamı) sürekli olarak hava ile karıştırılmış olup, ortam sıcaklığı ortalama 22±2 °C'de olmuştur. Aydınlatma floresan lambalar (Philips TLM 40W/54RS) ile 80 µmol/m<sup>2</sup>/s ışık şiddeti seviyesinde 16:8 (U:D) fotoperiyodu ile yapılmış olup, ışınım seviyesi, bir radyasyon sensörü LI-COR (LI-250) kullanılarak belirlenmiştir. Alg sayıları UV-vis spektrofotometre (Schimadzu UV-1800) kullanılarak 680 nm'de optik yoğunluk ölçümleri ile günlük olarak belirlenmiş olup, alg üretimi 680 nm'de 1513±30 rakamlarına ulaşmaya kadar bir hafta boyunca devam etmiştir. Bu algler stok algler olarak adlandırılmış ve midye beslemesinde kullanılmıştır.

### Deney Protokolü

Adaptasyon sonunda, midyeler 33x33x40 cm ebatlarında olan ve 20 L çeşme suyu içeren cam akvaryumlara dağıtılmıştır. Bu dağıtımlar rastgele yapıldığından gruplar arasında midyelerin ağırlığı (30,21±1,33 g) ve uzunluğu (58,65±0,97 mm) bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir (P>0.05). Daha sonra midyeler bakırın (CuSO<sub>4</sub> olarak) farklı derişimlerine (0, 30, 90 µg L<sup>-1</sup>) farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 gün) maruz bırakılmıştır. Deneylerde her bir koşul için 12 midye kullanılmıştır. Deneyler sırasında, cam yüzeye tutunma, suyun buharlaşması ve bakırın dibe çökmesi gibi nedenlerle akvaryumlardaki bakır

derişimleri ve akvaryum suları her ikinci günde yenilenmiştir. Midyeler her su değişiminden önce tek hücreli tatlısu algleri (*Chlorella vulgaris*) ile beslenmiştir (yaklaşık 300,000 alg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde). Midyelerin beslenmeleri karanlık ortamda 5 saat süre ile yapılmıştır. Farklı zaman dilimlerinde akvaryumlardan çıkartılan midyelerin önce canlı olup olmadıkları not edilmiştir. Midyelerin kabukları sıkıca kapalıysa canlı kabul edilmiştir. Ayrıca, disseksiyon sırasında da hayvanların canlılığı onaylanmıştır. Daha sonra midyeler kabukları birbirine bağlayan ön ve arka addüktör kaslarının kesilmesiyle açılmış ve dokular dissekte edilerek kullanılacakları zamana kadar -85 °C'de (Esco UUS-480A) saklanmıştır.

### Antioksidan Enzim Aktivite Ölçümleri

Enzim aktivitelerinin ölçümünün yapılabilmesi için solungaç ve hepatopankreas dokuları öncelikle homojenize edilmiştir. Her deney grubu için kullanılan 12 midyenin solungaç ve hepatopankreas dokuları ikiye bölünmüş ve birleştirilmiş olup, böylece her dokudaki ölçümler 6 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bunun için, derin dondurucuda (-85 °C) saklanan dokular eritilip tartıldıktan sonra 1/10 (w/v) oranında 100 mM KCl ve 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren bir tampon ile (pH 7.4) 9500 rpm'de 5 dakika süre ile buz içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 30 dakika süre ile 10,000 rpm'de santrifüj (Hettich Universal 30 RF) edilmiş ve süpernantantlar enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü için aşağıdaki metotlar kullanılmıştır; SOD aktivitesi, 1 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 10 mM sitokrom c, 0,05 mM hipoksantin, 1,87 mU mL<sup>-1</sup>, supernatant ve ksantin oksidaz içeren reaksiyon ortamında, 1 dk süre boyunca sitokrom c redüksiyonunun 550 nm'deki inhibisyonunun gözlemlendiği yöntemle ölçülmüştür (McCord ve Fridovich, 1969). GPX aktivitesi, 1 L son hacimde 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 2 mM GSH, 0.12 mM NADPH, 2 U GR, supernatant 3 mM CHP içeren ortamda NADPH absorpsiyonunun azalışının 340 nm'de gözlenmesi sonucu ölçülmüştür (ε=6.22 µmol<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>) (Livingstone ve ark.,1992). CAT aktivitesi, 1 dk süreyle son hacmi 1 mL olan 75 mM fosfat tamponu (pH 7,4), 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20 µL supernatant içeren ortamda absorpsiyonunun azalışının 240 nm'de kaydedilmesi ile ölçülmüştür (ε=0,0392 µmol<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>) (Lartillot ve ark., 1988; Bessey ve ark., 1946). GST aktivitesi, 1 mL'lik 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 1 mM GSH, 1 mM CDNB ve supernatant içeren reaksiyon ortamındaki 340 nm'de 1 dk süreyle GSH ve CDNB konjugasyonuna bağlı absorpsiyon artışına bağlı olarak ölçülmüştür (Habig ve ark., 1974). GR aktivitesi de aynı esasa dayalı olarak 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 0.1 mM NADPH, supernatant ve 1 mM GSSG içeren reaksiyon ortamında ölçülmüştür (Carlberg ve

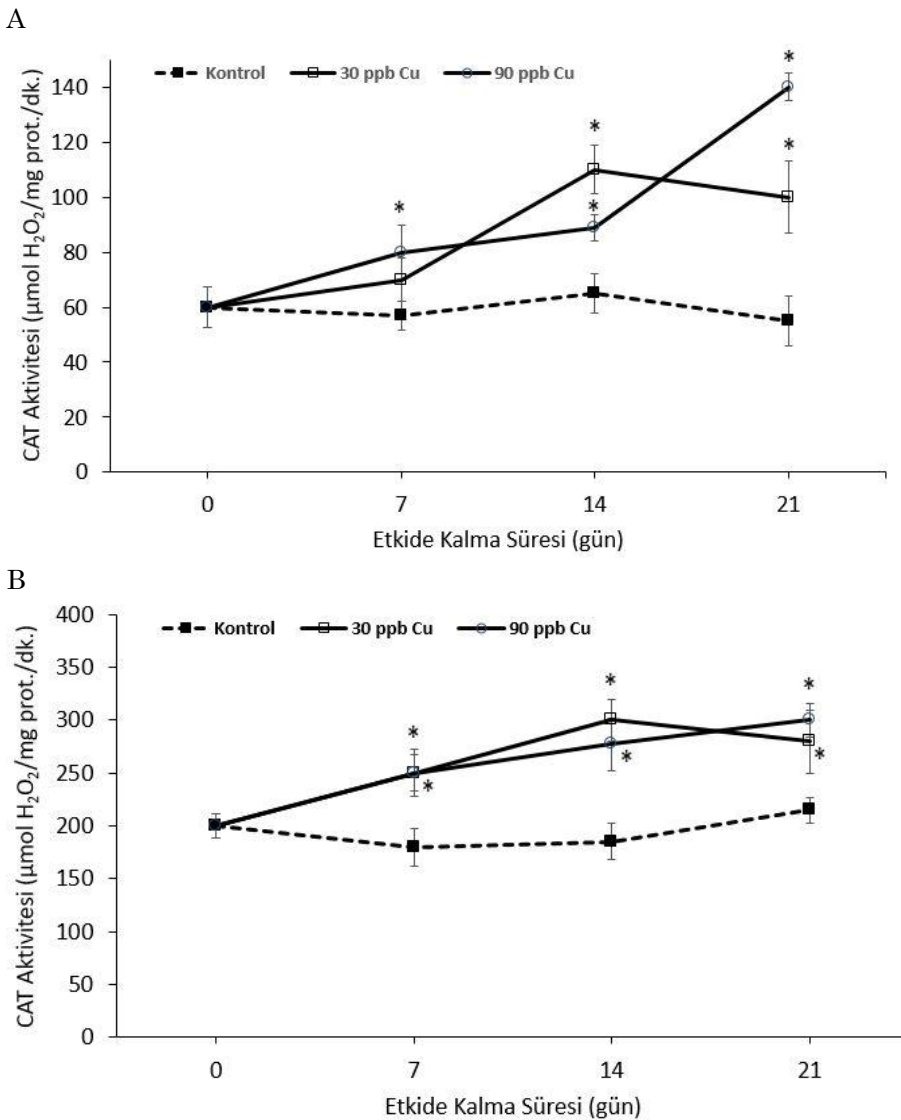
Mannervik, 1975). Protein düzeyleri Lowry ve ark. (1951) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

### İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin öncelikle dağılım şekilleri belirlenerek buna göre uygun istatistik testler kullanılmıştır (SPSS 20). Nonparametrik veriler Kruskal Wallis ve/veya Mann-Witney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler ise One Way Anova ve/veya T testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlarda verilen P değerleri Mann-Witney U testi veya T testinden elde edilen verilerdir. Elde edilen verilerin (ortalama±standart hata) grafikleri Microsoft Excel Programı ile çizildikten sonra grafik üzerinde istatistiksel önem düzeyleri de belirtilmiştir.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Yirmi bir gün süren deneyler sırasında bakır etkisinde kalan midyelerde ve kontrol gruplarında herhangi bir ölüm olayı gözlenmemiştir. Deney sonuçları solungaç ve hepatopankreas dokularında bakırın oksidatif strese neden olduğunu ve bütün enzim aktivitelerinde anlamlı ( $P<0.05$ ) artışlara neden olduğunu göstermiştir. Ancak kontrol midyelerde 0-21 gün arasında antioksidan enzim aktivitelerinde dalgalanmalar olsa da, bu değişimlerin hiçbiri istatistiki olarak anlamlı ( $P>0.05$ ) olmamıştır. Kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında CAT aktivitesi ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot./dk.}$ ) sırasıyla  $60.0\pm 7.59$  ve  $199.8\pm 12.03$  olarak ölçülmüştür. Her iki dokuda da CAT aktivitesi anlamlı ( $P<0.05$ ) artışlar göstermiştir (Şekil 1).



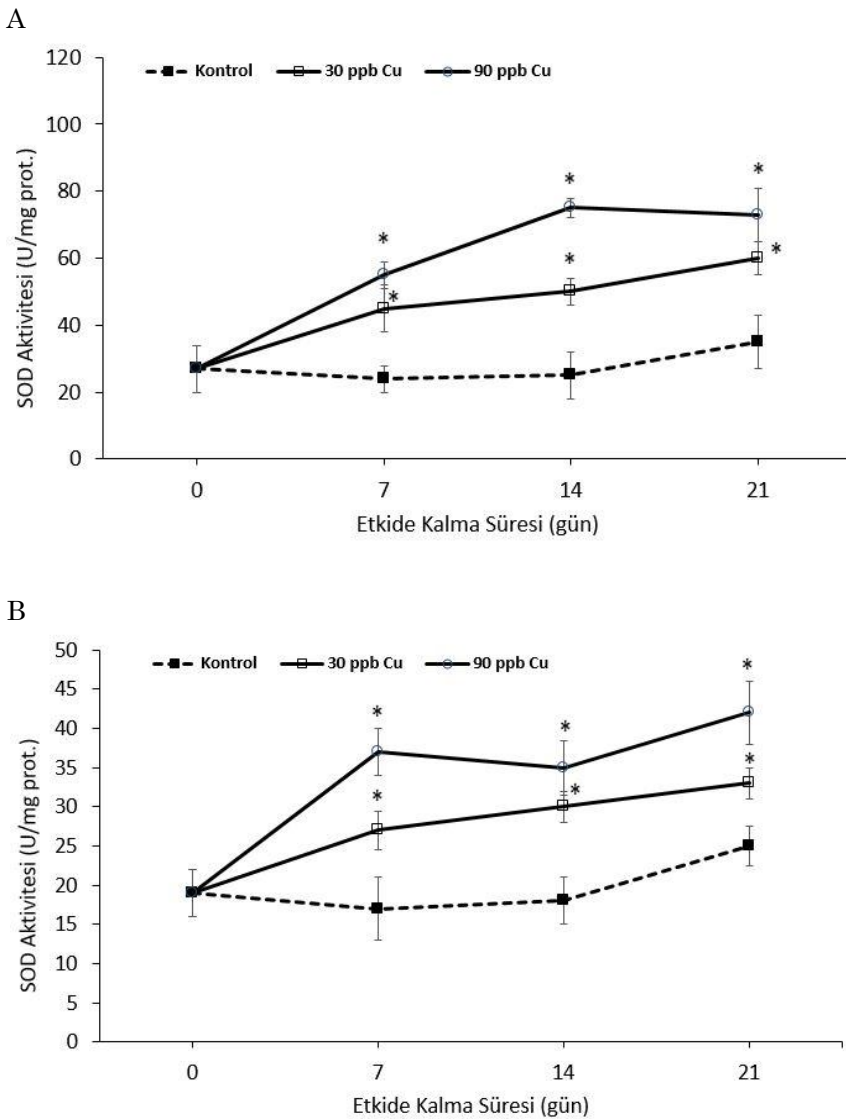
Şekil 1. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında CAT aktivitesi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

Figure 1. Activities of CAT in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.



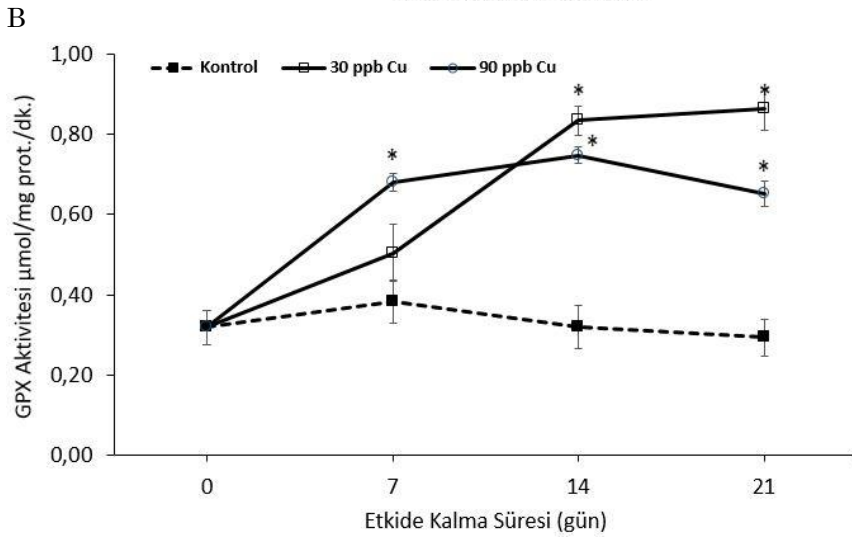
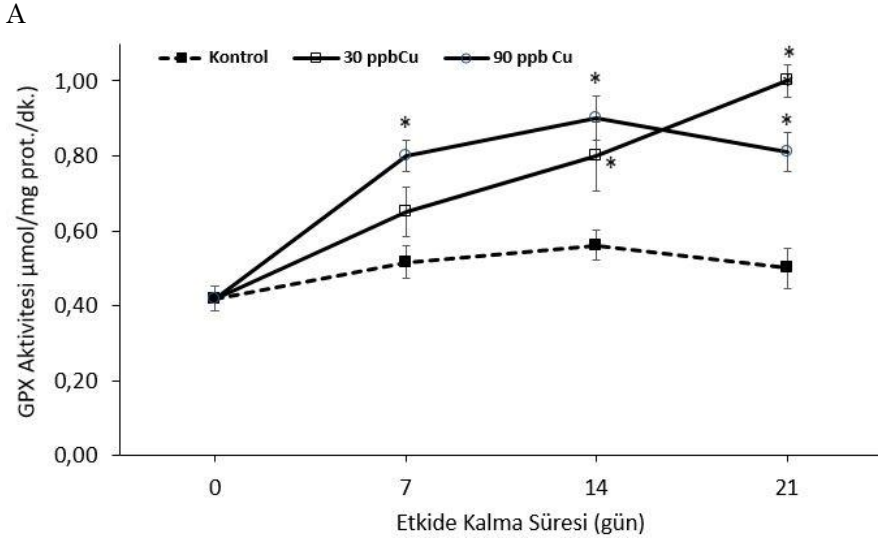
SOD aktivitesi (U/mg prot.) kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında sırasıyla 26.98±7.03 ve 18.98±2.95 olarak ölçülmüştür. SOD aktivitesi her iki dokuda bakır etkisiyle anlamlı artışlar ( $P<0.05$ ) göstermiştir (Şekil 2). Kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında GPX aktivitesi ( $\mu\text{mol/mg prot./dk.}$ ) sırasıyla 0.42±0.03 ve 0.32±0.04 olarak ölçülmüş olup, bakır etkisinde kalan gruplarda GPX aktivitesinde anlamlı ( $P<0.05$ ) artışlar gözlenmiştir (Şekil 3). GR aktivitesi ( $\mu\text{mol/mg prot./dk.}$ ) kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında sırasıyla 0.045±0.05 ve 0.065±0.01 olarak ölçülmüştür. Her iki dokuda da bakır etkisiyle GR aktivitesinde anlamlı

( $P<0.05$ ) artışlar olmuştur (Şekil 4). Kontrol midyelerde GST aktivitesi ( $\mu\text{mol/mg prot./dk.}$ ) solungaç ve hepatopankreas dokularında sırasıyla 0.11±0.032 ve 0.08±0.021 olarak ölçülmüş olup, bakır etkisinde kalan midyelerde GST aktivitesinde anlamlı ( $P<0.05$ ) artışlar gözlenmiştir (Şekil 5). Deney başlangıcında (0. gün), kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularındaki toplam protein düzeyleri (mg protein/g y.a.) sırasıyla 8.03±0.97 ve 20.0±1.98 olarak ölçülmüştür. Yedinci, 14. ve 21. gün sonunda yapılan ölçümlerde toplam protein düzeylerinde dalgalanmalar olsa da, bu değişimler istatistiki olarak anlamlı ( $P>0.05$ ) olmamıştır (Şekil 6).



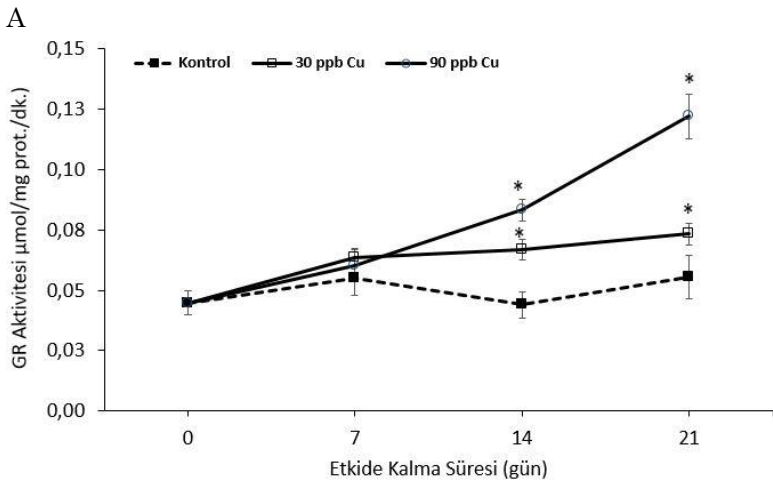
Şekil 2. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında SOD aktivitesi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

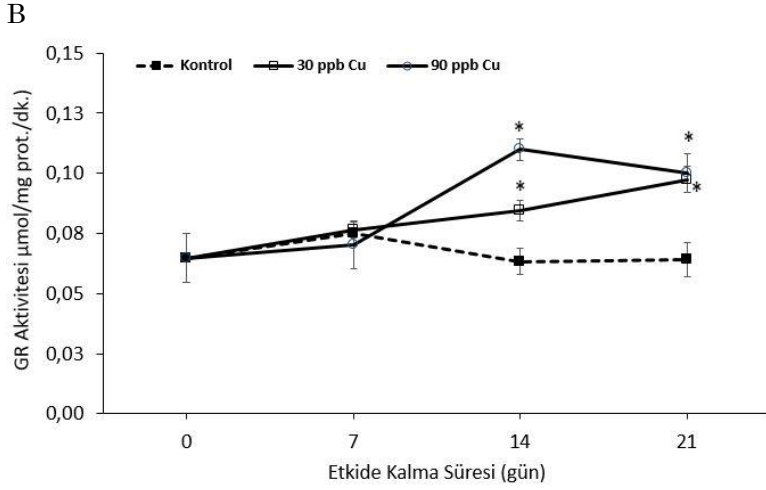
Figure 2. Activities of SOD in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 3. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GPX aktivitesi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

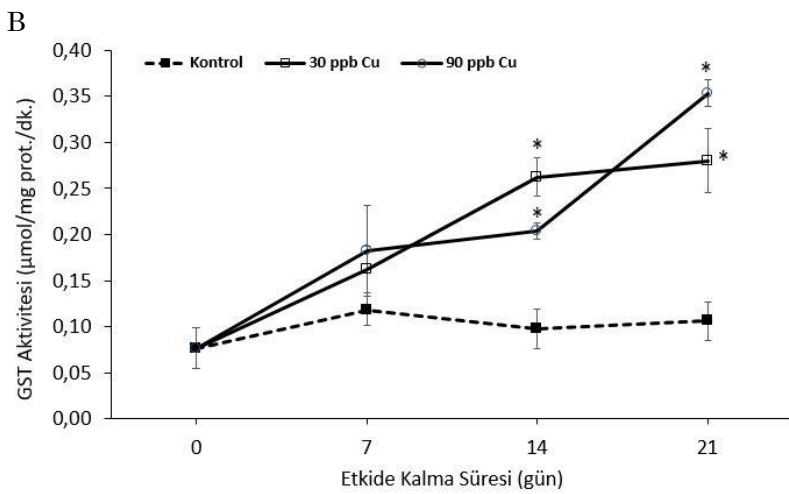
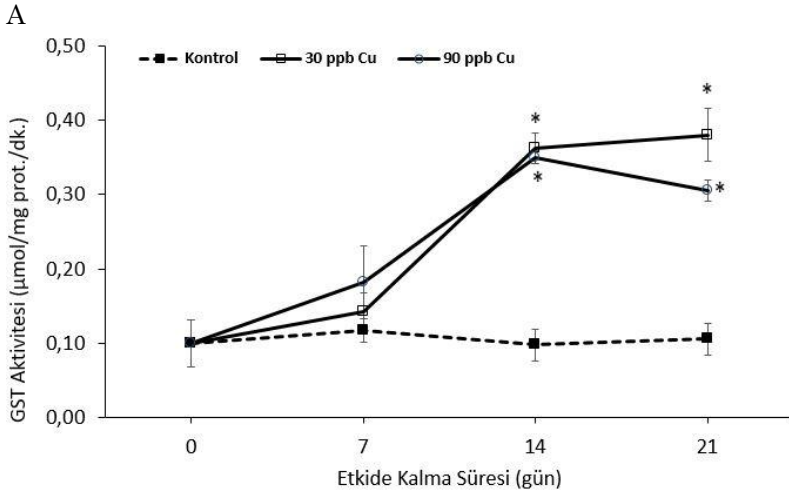
Figure 3. Activities of GPX in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.





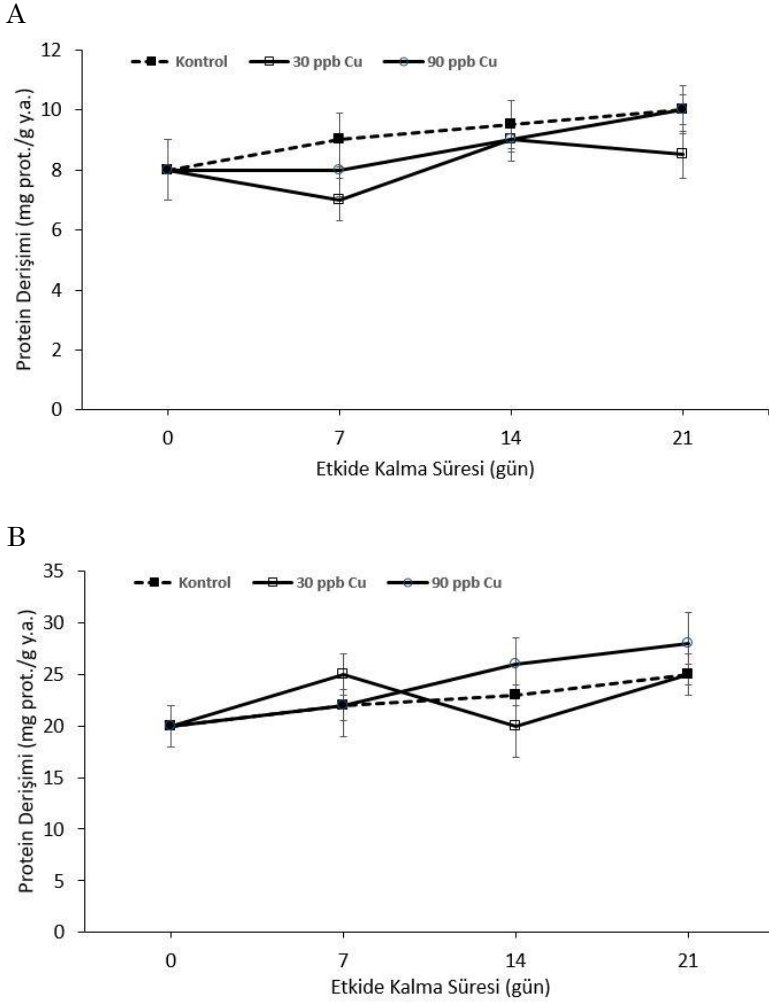
Şekil 4. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GR aktivitesi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

Figure 4. Activities of GR in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 5. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GST aktivitesi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

Figure 5. Activities of GST in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 6. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında toplam protein derişimi. \* işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ( $P<0.05$ ) farkı göstermektedir.

Figure 6. Concentrations of total proteins in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. \* indicates significant differences ( $P<0.05$ ) among individual control group and its copper exposure groups.

Bu çalışmada, 21 gün süresince bakır etkisinde kalan midyelerde herhangi bir mortalitenin görülmemesi, kullanılan bakır derişimlerinin subletal olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan bakır derişimlerinin subletal olduğu başka midyelerde de gösterilmiştir (Rajalakshmi ve Mohandas, 2005; Company ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2021). Ancak, deneylerde midye ölümlerinin gözlenmemesi, midyelerin bakır maruziyetinden etkilenmediği anlamına gelmez. Zira hem solungaç hem de hepatopankreas dokularında bütün antioksidan enzimlerin aktivitelerinde anlamlı artışlar görülmüş olması midye metabolizmasının bakıra karşı tepki verdiğini ve oksidatif stres ile başa çıkmaya çalıştığını göstermektedir.

Bilindiği gibi oksidatif stres tüm aerobik canlılar için potansiyel bir tehlikedir. Doğal olan oksidatif stres ile birlikte, çevresel kirleticiler de oksidatif stresi artırabilmektedir (Winston, 1991). Böylece, doğal ve laboratuvar koşullarında kirletici maddelere maruz

kalan sucul hayvanlarda meydana gelen oksidatif stresi belirlemek için antioksidan sistemlerin enzimleri kullanılmaktadır. Tatlı su midyeleri su kirliliği için iyi bir bioindikatör hayvan olduklarından, oksidatif stres biyobelirteçleri kullanılarak doğal ve laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmışlardır (Doyotte ve ark.,1997; Labieniec ve Gabryelak, 2007; Al-Fanharawi ve ark., 2019; Falfushynska ve ark., 2018).

Literatürde *U. tigridis* türünde antioksidan enzimlerinin bakıra karşı verdiği tepkileri gösteren çalışma sayısı sınırlı olsa da, diğer tatlı su midyeleri ve deniz midyeleri ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Jorge ve ark. (2013) genç tatlısu midyesi *Lampsilis siliquoidea* ile yaptıkları çalışmada çok düşük derişimlerdeki bakırın (2 ve 12  $\mu\text{g/L}$ ) kronik süreçte bile serbest radikal oluşumunu, antioksidan kapasiteyi, GST aktivitesini ve glutatyon düzeylerini anlamlı şekilde değiştiremeye de lipid peroksidasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir.



Zhou ve ark. (2021) 7 günlük bir deney protokolünde derin deniz midyesi *Bathymodiolus platifrons*'u 100 ve 500 µg/L derişimlerdeki bakır ve kadmiyumun etkisine bıraktıktan sonra, çeşitli biyobelirteçlerin düzeylerini incelemişlerdir. Araştırmacılar her iki metalin midyelerde biriktiğini belirtirken, bakırın ve kadmiyumun etkisinin farklı olduğunu vurgulamışlardır. Örneğin, SOD aktivitesi her iki metal tarafından da değiştirilemezken, CAT aktivitesi bakır tarafından artırılmış, GSH düzeyleri ise kadmiyum tarafından artırılmıştır. Company ve ark. (2008) deniz midyesi *Bathymodiolus azoricus* 24 gün düşük düzeydeki bakırın (25 µg/L) etkisine bıraktıktan sonra 6 gün eliminasyon sürecine tabii tutmuşlar ve solungaç ve manto dokusunda bazı biyobelirteç moleküllerin davranışını incelemişlerdir.

Deney sonuçları midyelerde 24 günde biriken bakırın 6 günlük eliminasyon süresine rağmen azalmadığını göstermiştir. Ayrıca, CAT, GPX ve SOD aktivitelerinde zamana bağlı olarak bir artış eğilimi olduğunu gösterirken, bu çalışmayı da desteklemiştir. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri metallerin yanında ekolojik faktörlerle de değişebilmektedir (Mlouka ve ark., 2019). Araştırmacılar Akdeniz midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) ve mavi midyeleri (*Mytilus edulis*) sıcaklık ve bakırın etkisine bırakarak antioksidan enzimlerin tepkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar bakırın etkisinin sıcaklıkla beraber daha da arttığını ve midyelerin CAT, SOD ve GST aktivitelerinde artışlar olduğunu göstermiştir. Xu ve ark. (2018) çok düşük bakır derişiminin (8 µg/L) bile *Mytilus coruscus*'un hemositlerinde CAT ve SOD aktivitesini artırdığını, fakat daha düşük bakır derişiminin (2 µg/L) anlamlı değişime neden olmadığını vurgulamışlardır. Bakır gibi kadmiyumun da midyelerin antioksidan enzimler üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Sukhovskaya ve ark., 2019). Araştırmacılar kuğu midyeleri (*Anodonta cygnea*) ile yaptıkları bir çalışmada 10-100 µg/L derişimlerdeki kadmiyumun midyelerde yüksek miktarlarda kadmiyum birikimine neden olmakla beraber, midyelerin ölümüne neden olmadığını, ancak oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmanın süresi 72 saat olmakla beraber, CAT, SOD ve GPX aktiviteleri ve GSH düzeyleri değerlendirildiğinde kadmiyumun düşük derişimlerde ve kısa sürede midyelerin antioksidan sistemini etkileyebildiğini göstermiştir. Goswami ve ark. (2014) bakır (60 µg/L) ve kadmiyumun (150 µg/L) birlikte etkilerini (21 gün) deniz yeşil midyelerinde (*Perna viridis*) incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları SOD, GPX ve GST aktivitelerinde anlamlı artışlar olduğunu belirtirken, bu çalışmanın bulgularını da desteklemektedir. Diğer yandan metal nanopartiküllerinin midyelerinin antioksidan enzimlerine olan etkileri de birkaç çalışma ile gösterilmiştir. Midyelerin antioksidan sistem tepkisi

üzerine yapılan çalışmalar daha çok deniz midyelerinden, özellikle *Mytilus* türlerinden gelmektedir. Gomes ve ark. (2011) *Mytilus galloprovincialis*'i 15 gün boyunca Cu nanopartiküllere maruz bırakmışlar ve hayvanların oksidatif stres biyobelirteç moleküllerindeki değişimleri gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar midyelerin hem iyonik hem de NP formlarında solungaçlarda bakır biriktirdiğini ve bu iki bakır formunun antioksidan savunma sistemini değiştirerek midyelerde oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Benzer çalışmalar Ruiz ve ark. (2015) tarafından da yapılmıştır. Araştırmacılar, Cu nanopartiküllerine maruz kalan *Mytilus galloprovincialis*'in hepatopankreasında antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde farklı etkiler yaptığını ve genel olarak antioksidan aktiviteyi arttırdığını göstermişlerdir. Bakır nanopartikülleri CAT ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde artırırken solungaçlarda bu etkinin daha az olduğunu vurgulamışlardır. Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada (Canlı ve Canlı, 2021b), Cu nanopartiküllerinin *U. tigridis*'de CAT ve SOD aktivitelerini azalttığını, ancak glutatyon metabolizması enzimleri olan GPX ve GST aktivitelerini ise artırdığını gösterilmiştir. Buda, bakırın iyonik ve nanopartikül formlarında farklı etkilere sahip olabileceğini göstermekle beraber her iki durumda da oksidatif strese neden olduğunu vurgulamaktadır.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Tatsız midyesi olan *U. tigridis* ile yapılan bu çalışmada bakır etkisinde 21 gün süre ile kalan hayvanların hem hepatopankreasında hem de solungaç antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artışların olması, bakırın neden olduğu oksidatif strese göstermesi bakımından önemlidir. Bu durum, doğal sucul ortamlarda metal etkisinde kalan midyelerde oluşabilecek kronik hasarı vurgulaması bakımından anlamlı görülmüştür. Birçok doğal sucul ortamlarda metal derişimleri subletal düzeydedir. Ancak, düşük bakır derişimlerinin bile midyelerde oksidatif strese neden olması çevre duyarlılığı konusunu bir kez daha vurgulamaktadır. Bu çalışmanın devamı olarak midyelerde bakır toksitesi farklı yönlerden de incelenebilir. Örneğin besin zincirinde metallerin taşınması doğal sucul ortamlardaki durumu temsil etmesi bakımından önemli çalışmalar arasında görülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada alg üretiminde desteklerini gördüğüm Dr. Uslu'ya teşekkürlerimi iletirim. Bu çalışmanın deneysel aşamaları Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır. Bunu sağladıkları için yönetimlere ve Dr. M. Canlı'ya teşekkür ederim.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Al-Fanharawi AA, Rabee AM, Al-Mamoori AM 2019. Multi-biomarker responses after exposure to organophosphates chlorpyrifos in the freshwater mussels *Unio tigridis* and snails *Viviparous benglensis*. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 25(5): 1137-1156.
- Canli M, Stagg RM (1996) The effects of in vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31(4): 494-501.
- Canli, E.G., İla, H.B., Canli, M., 2019. Response of the antioxidant enzymes of rats following oral administration of metal-oxide nanoparticles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>). Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 938-945.
- Canli EG, Celenk A, Canli M 2021a. Accumulation and distribution of nanoparticles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) in tissues of freshwater mussel (*Unio tigridis*). Bull. Environ. Contam Toxicol. (in press).
- Canli EG, Canli M 2021b. Antioxidant system biomarkers of freshwater mussel (*Unio tigridis*) respond to nanoparticle (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) exposures. Biomarkers, 26: 434-442.
- Carlberg I, Mannervik B 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 250: 5475-5480.
- Clark RB 1989. Marine pollution. Oxford: Oxford Scientific Publications, Clarendon Press.
- Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Médioni A, Camus L, Colaço A, Bebianno MJ 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. Sci. Tot. Environ. 389(2-3): 407-417.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat. Toxicol. 39(2): 93-110.
- Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Ivanina AV, Sokolova IM, Stoliar O B 2018. Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. Chemosphere, 193: 1127-1142.
- Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Sci. Technol. 45(21): 9356-9362.
- Goswami P, Hariharan G, Godhantaraman N, Munuswamy N 2014. An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*). J. Environ. Sci. Health Part A, 49(13): 1564-1577.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139.
- Jorge MB, Loro VL, Bianchini A, Wood CM, Gillis PL 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoides*) chronically exposed to copper. Aquat Toxicol. 126: 137-147.
- Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G 2003. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 539(1-2): 19-28.
- Lartillot S, Kedziora P, Athias A 1988. Purification and characterization of a new fungal catalase. Prep. Biochem. 18: 241-246.
- Livingstone DR, Lips F, Martinez PG, Pipe RK 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 112: 265-276.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- McCord JM, Fridovich I 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. J. Biol. Chem. 244(22): 6049-6055.
- Mlouka R, Cachot J, Boukadida K, Clérandeau C, Gourves PY, Banni M 2019. Compared responses to copper and increased temperatures of hybrid and pure offspring of two mussel species. Sci. Tot. Environ. 685: 795-805.
- Nugroho AP, Frank H 2012. Effects of copper on lipid peroxidation, glutathione, metallothionein, and antioxidative enzymes in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. Toxicol. Environ. Chem. 94(5): 918-929.
- Rajalakshmi S, Mohandas A 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotox. Environ. Safe. 62(1): 140-143.
- Ruiz P, Katsumiti A, Nieto JA, Bori J, Jimeno-Romero A, Reip P, Cajaraville MP 2015. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research, 111, 107-120
- Sukhovskaya IV, Borvinskaya EV, Kochneva AA, Slukovsky ZI, Kurpe SR, Xu K, Tang Z, Liu S, Xia H, Liu L, Wang Z, Qi P 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel

- Mytilus coruscus*. Fish Shellfish immunology, 82: 77-83.
- Xu K, Tang Z, Liu S, Xia H, Liu L, Wang Z, Qi P 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. Fish Shellfish Immun. 82: 77-83.
- Zhou L, Li M, Zhong Z, Chen H, Wang X, Wang M, Li C 2021. Biochemical and metabolic responses of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* to cadmium and copper exposure. Aquat. Toxicol. 236: 105845.
- Winston GW 1991. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. Comp. Biochem. Physiol. C-Pharma. Toxicol. Endocrin.100: 173-176.
- Wood CM, Farrel AP, Brauner CJ 2012a. Homeostasis and toxicology of essential metals. Fish Physiology 31A. Academic Press, London pp 497.
- Wood CM, Farrel AP, Brauner CJ 2012b. Homeostasis and toxicology of non-essential metals. Fish Physiology 31B. Academic Press, London pp 507.