



İki Farklı Ağır Metalin (Bakır ve Çinko) Tıbbi Sülükler (*Hirudo Verbana*) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Erdal YILMAZ¹ Ebubekir ATICI²

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

² Kayseri İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 11.12.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 16.12.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Yılmaz E, Atıcı E. İki Farklı Ağır Metalin (Bakır ve Çinko) Tıbbi Sülükler (*Hirudo Verbana*) ve Salya Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Bozok Vet Sci* (2024) 5, (2):70-75.

Özet: Araştırmada çinko ve bakır metallerinin farklı konsantrasyonlarının tıbbi sülükler üzerindeki etkileri incelenmiştir. 10 litrelik kaplara 15 adet olacak şekilde stoklanan tıbbi sülükler (*Hirudo verbana*) bakır ve çinko metallerinin letal dozların altında belirlenen farklı iki doza maruz bırakılmıştır. Çinko ve bakır için 96 saatlik muamele dozları sırası ile 3.0 mg/L ile 12 mg/L ve 0.15 mg/L ile 0.6 mg/L iken; 30 günlük muamelelerde 0.5 mg/L ile 2.0 mg/L ve 0.02 mg/L ile 0.08 mg/L olarak uygulanmıştır. Bu uygulamalardan sonra sülüklerden alınan salya örneklerinin antimikrobiyal karakteristiği, ağır metal birikimleri ve malondialdehyde (MDA) düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmada sülük salyasının balık patojenlerinden *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Tıbbi sülüklerin çinko ve bakır metallerine maruz kaldıklarında dokularında depolanan ağır metal miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çinko ve bakırın farklı konsantrasyon ve sürelerde maruziyetinde sülük salyasında malondialdehit değerlerinin de artış gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen verilerden *H. verbana* türü tıbbi sülüğün çinko ve bakır ağır metalleri için iyi bir biyo-monitör organizma olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Antimikrobiyal, *Hirudo verbana*, Malondialdehit, Tıbbi sülük

The Investigation of The Effect of Two Different Heavy Metals (Copper and Zinc) on The Medicinal Leeches (*Hirudo verbana*) and Saliva Antimicrobial Properties

Abstract: In the study, the effects of different concentrations of zinc and copper metals on medicinal leeches were investigated. Fifteen medicinal leeches (*Hirudo verbana*), which were stocked in containers with 10 liters of water, were exposed to two different doses of copper and zinc metals, which were determined below the lethal doses. While applied doses of zinc and copper were 3.0 mg/L, 12 mg/L, and 0.15 mg/L and 0.6 mg/L during 96 hours, respectively. Applied doses of zinc and copper were 0.5 mg/L and 2.0 mg/L, and 0.02 mg/L and 0.08 mg/L for 30 days applications, respectively. After these applications, antimicrobial characteristics of the leech saliva, heavy metal deposition and malondialdehyde (MDA) levels were analysed. It was determined that leech saliva extract did not show any antimicrobial activity on fish pathogens, *Lactococcus garviae* and *Yersinia ruckeri*. Also, It has been found that when medicinal leeches exposed to zinc and copper metals, heavy metals concentrations in tissues of the medicinal leeches increased. In addition, it was found that malondialdehyde values in leech saliva increased when zinc and copper were exposed at different concentrations and durations. It was revealed from the data that medicinal leech of the *Hirudo verbana* species is a good biomonitor organism for zinc and copper heavy metals.

Keywords: Antimicrobial, Heavy metal, *Hirudo verbana*, Medicinal leech, Malondialdehyde

1. Giriş

Günümüzde çevre kirliliği her geçen gün artmakta ve biyolojik varlıkları tehdit etmektedir. Çevre kirliliği, en yıkıcı hasarı sucul ekosistemlere vermektedir. Sucul ekosistemlere zarar veren kirleticilerin başında evsel ve endüstriyel atıklar gelmektedir. Su ekosisteminde bulunan en önemli çevresel kirleticilerden biri de ağır metallerdir. Ağır metaller deniz, göl ve akarsularda fazla miktarlarda bulduklarında suda yaşayan organizmalar tarafından bünyelerine alınırlar (1-3). Söz konusu kirletici etkenler hedef organ ve dokularda birikerek yapısal ve fonksiyonel mekanizmalara hasar vermektedirler (4, 5). Bu ağır metallerin çok düşük konsantrasyonları bile toksik olabilmektedir (6). Bu

toksikasyonun derecesi canlılar arasında oldukça farklılık göstermektedir. Su ekosistemi ağır metallerin en çok birikim yaptığı sistemler olduğundan, bu kirleticilerin etkileri daha çok balıklar üzerinden belirlenmeye çalışılmıştır (7-9). Balıkların yanı sıra denizel veya tatlı su ekosistemlerinde yaşayan midye, istiridye ve deniztarakları gibi çift kabuklu canlıların da ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi amacı ile kullanıldığı bilinmektedir (10). Ortamdaki metal konsantrasyonları ile suda yaşayan balık, midye, istiridye, plankton gibi organizmaların dokularındaki miktarları arasında bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Bu ağır metallerin suda yaşayan ve besin zincirinin farklı kademelerinde bulunan organizmalar tarafından alınması

çoğunlukla beslenme yolu ile olmaktadır. Bu geçişlerin solunum, osmoz ve difüzyon olayları ile de devam ettiği, vücudun suyla temas eden yüzeyleri olan deri ve solungaçlar vasıtasıyla da bünyeye alındığı bilinmektedir. Ancak vücuda alınan miktarlar türden türe oldukça farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar alınan metalin toksisite derecesini de belirleyen önemli bir unsur olmaktadır. Örneğin suyu süzerek beslenen kabuklu canlılar ve alglerin birim zamanda aldıkları metallerle balıkların bünyelerine aldıkları miktarlar oldukça farklı olmaktadır. Bu canlılar sudaki kirlenmeyi çok daha iyi ve doğru tahmin etmeyi kolaylaştıran canlılar olduklarından aynı zamanda biyo-indikatör organizmalar olarak da adlandırılırlar. Su ekosistemlerindeki kirleticileri araştırmak ve izlemek maksadı ile bu biyo indikatör organizmaların kullanıldığı birçok metot geliştirilmiştir (11). Geliştirilen bu metotların suda yaşayan canlıların dokularındaki birikimlerin tespiti üzerinden yapıldığı ve bu birikimlerden bir sonuca ulaşılmaya çalışıldığı anlaşılmaktadır. Elde edilen verilerden canlının etkilenme derecesi veya toksisite durumu ile sudaki miktarlar arasındaki ilişkilerden kirlenmenin modellenmesi mümkün olmaktadır. Kaldı ki endüstrileşmiş birçok ülkede cıva ve demir dışındaki çoğu metalin ekosistemdeki miktarları yer kabuğundaki miktarlarına kıyasla 100 ila 1000 kat artmış durumdadır (12). Bu durum canlıları önemli derecede etkilemiş ve söz konusu metallerin izlenmesi zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Geçtiğimiz yüz yılda ağır metallerden kaynaklı seri hastalıklar ve hatta ölümlere neden olan trajik sonuçlar vuku bulmuştur (13). Bu yüzden ağır metallerin genel özellikleri, kaynakları, toksisite etkileri ve artış modelleri takip edilmelidir. Örneğin endüstri alanında çok uzun bir süre kullanım alanı bulan bakırın yüksek dozları hem bitkiler hem de hayvanlar için tehlikeli olabilmektedir. Benzer şekilde çinkonun da yüksek miktarları toksik etki gösteren metallerin başında gelmektedir. Balıklar başta olmak üzere kabuklu ve sucul omurgasızlarla beslenen insanlara da söz konusu metaller geçebilmekte, toplum sağlığını etkiler düzeye ulaşabilmektedir. Bu bağlamda söz konusu biyo-indikatör canlıların ağır metaller bakımından izlenmesi çevre kirliliği bakımından olduğu kadar halk sağlığı bakımından da önem arz etmektedir. Doğru seçilmiş bir biyo-monitör canlıının kullanımı farklı metal kaynaklarının varlığını ve miktarının belirlenmesinde önemli rol oynar. Denizel ortamlarda en çok kullanılan biyo- monitör organizmalar; mikro algler, çiçekli bitkiler, suyu filtre eden canlılar ve detritusla beslenen canlılardır (14). Midyeler ve istiridyeler epibentik bölgelerde filtratif beslenen organizmalar olduklarından askıdaki, çözünmüş, sudaki ve sedimentteki metaller için iyi birer biyo-monitör canlıdır (15). Bu tür canlıların, çevresel kirleticilerin en iyi şekilde canlılar üzerinde görülebildiği hassas organizmalar olduğundan uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir (16). Çevre kirliliğinde biyo-monitör veya indikatör olarak kullanılan çift kabuklu canlılar arasında; *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *Septifer virgatus*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*,

C. virginica, *C. brasiliiana* ve *Spondylus spinosis* türleri sayılabilir (10; 17). Biyo-monitör olarak seçilen organizma ne kadar hassas olursa çevresel kirlenme o denli doğru bir şekilde modellenebilir. Bu bağlamda, iyi bir indikatör organizmadan beklenen birçok özelliğe sahip olan tıbbi sülüklerin çevresel kirleticilerden ağır metallere karşı gösterdikleri tepkilerin ortaya koyulması hedeflenmiştir. Tıbbi sülükler ekolojik ve ekonomik önemleri bakımından oldukça değerli canlılardır. Son yıllarda tamamlayıcı veya alternatif tıbbi uygulamalarda kullanımları artmakta olan tıbbi sülüklerin biyo-monitör olarak kullanıldığı çalışma oldukça azdır. Bu nedenle, tıbbi sülüklerde farklı ağır metallerin dokulardaki birikimlerinin ve tıbbi sülüklerden elde edilecek salyada, Malondialdehit (MDA) ve antimikrobiyal özelliklerinin ortaya koyulması hedeflenmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Hayvan Materyali ve Ağır Metal Dozları

Araştırma kapsamında yapılan çalışmalarda tıbbi sülük olarak bilinen türlerden biri olan *Hirudo verbana* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvan materyali tıbbi sülük yetiştiriciliği yapan Cansuyu Sülük isimli firmadan temin edilmiştir. Çalışmalar Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan tıbbi sülükler 12-15 aylık olup yaklaşık ağırlıkları 5-7 gram arasında (ortalama 6 gram civarında) seçilmiştir. Sülüklerin stoklandığı plastik kaplar 5 litre hacminde olup, her bir kaba 15'er adet stoklanmış ve denemeler boyunca herhangi bir besleme yapılmamıştır. Letal konsantrasyonlar çinko için 96 saat ve 30 gün sonunda sırası ile 15.83 mg/ L ve 3.00 mg/ L'dir. Bakır için ise 96 saat ve 30 günlük maruz kalma sürelerinde 0.84 mg/ L ve 0.09 mg/ L olarak belirlenmiştir (18). *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bu lethal dozlardan hareketle doz altı konsantrasyonlarda belirlenen iki farklı metal konsantrasyonunun etkilerinin belirlenmesi için düşük ve yüksek dozlar belirlenmiştir. Daha önce lethal dozların altındaki bakır ve çinko metallerinin tıbbi sülüklerdeki etkileri ile ilgili herhangi bir araştırmaya ulaşılmadığından bu dozlar her bir konsantrasyon için dört kat artırılarak belirlenmiştir. Çinko metali için düşük doz (DD) 96 saatlik uygulamada 3.0 mg/L, yüksek doz (YD) düşük dozun dört kat fazlası olan 12 mg/ L dozu seçilmiştir. Yine çinkonun 30 günlük uygulanmasında düşük doz 0.5 mg/L, yüksek dozu ise 2.0 mg/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde sülüklerin yaşayacakları su ortamına ilave edilecek olan bakır metali için 96 saatlik uygulamada düşük doz 0.15 mg/ L, yüksek doz ise bu değerinin dört katı olan 0.60 mg/ L olarak belirlenmiştir. Bakır metalinin 30 günlük muamelesinde düşük doz 0.02 mg/L iken yüksek doz 0.08 mg/L olarak kullanılmıştır. Kontrol grubunda ise herhangi bir metal kullanılmamıştır. Yukarıda verilen konsantrasyonların hazırlanmasında, çinko ve bakır metallerinin kimyasal olarak saf durumda olan nitrat

ve sülfatlı formları ($Zn(NO_3)_2 \cdot 7H_2O$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) kullanılmıştır. Her iki ağır metal için uygulanan dozların söz konusu sürelerde verilmesinden sonra, tıbbi sülükler buldukları plastik kaplardan alınarak ağır metal ve salya analizlerine kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

2.2.Ağır Metal Analizleri

Tıbbi sülük dokularında bakır ve çinko analizleri yanı sıra, aynı örneklerden arsenik, demir ve kurşun analizleri de eş zamanlı olarak yapılmıştır. Söz konusu ağır metal analizleri ERÜ Teknoloji Araştırma Uygulama Laboratuvarlarında ICP-MS cihazında gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga çözündürme işlemlerinde numunelerden 0.2 g tartılarak 5 ml derişik HNO_3 , 2 ml H_2O_2 eklenmiş ve yaş yakma uygulanmıştır. Daha sonra örnekler 25 ml'ye seyreltilerek analizler gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır.

2.3.Antimikrobiyal Analizler

Tıbbi sülüklerden elde edilen salyalarda antibakteriyel özelliklerin incelenmesi için, daha önce belirlenen gram pozitif ve gram negatif bakterilerde antibiyogram testleri yapılmıştır. Bu testlerde disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan disk difüzyon yöntemi Bauer ve ark. (19)'dan yararlanılarak yapılmıştır. Daha önceden izole edilen ve $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen patojenlerden *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garviae* suşları genel besi yerlerinde (triptik soy agar) çoğaltılmıştır. Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları yukarıda değinildiği üzere standart disk difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100µl alınarak Mueller-Hinton Agar (MHA)'lı petriyelerin yüzeyine yayılmıştır. Daha sonra besiyeri yüzeyine antibiyotik disklerle birlikte tıbbi sülük salyası emdirilen tüm diskler yerleştirilmiş ve $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ de 16- 18 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafındaki zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Çalışmada amoksisillin (AML 25µg), amoksisilin /klavulanik acid (AMC 30 µg), doksisisiklin (DO 30µg), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT 25µg), eritromisin (E 15 µg), gentamisin (CN 10 µg), oksitetrasiklin (OT 30 µg), enroflaksasin (ENR 5 µg), okzolinik asit (OA 2 µg) ticari antibiyotik diskleri (Oxoid) ve steril disklere emdirilmiş tıbbi sülük salyaları kullanılmıştır. Antibiyogram analizleri sonucunda tıbbi sülüklerden elde edilen salya örneklerinin diğer ticari antibiyotik disklerle kıyaslanarak antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir.

2.4.Malondialdehit (MDA) Analizleri

Ağır metal muamelelerinden sonra, tıbbi sülüklerde oksidatif bir stresin ortaya çıkıp çıkmadığı MDA miktarları analiz

edilerek belirlenmiştir. Bu amaçla sülüklerden elde edilen salya örneklerinin bir kısmı MDA analizlerinde kullanılmıştır. Salya örneklerine 1 ml MDA çözeltisi ilave edilerek $95\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik su banyosunda yaklaşık 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 20 dakika buz banyosu yaptırılan numuneler, 10.000 rpm ile 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Hali hazırda pembe renge dönmüş örnekler daha sonra 535-600 nm dalga boylarında spektrofotometrede okunmuştur. Örnekteki pembe rengin yoğunluğu MDA miktarı ile orantılı olduğundan, MDA miktarı standart grafiğe karşı gelen absorbans değerinden hareketle belirlenmiştir. Kullanılacak seyreltme katsayısı ile çarpıldıktan sonra elde edilen sonuçlar $\mu\text{M}/100\text{ mL}$ olarak hesaplanmıştır. MDA analizleri için Esterbauer ve Cheeseman (20) ve Ohkawa (21)'dan yararlanılmıştır.

2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM-SPSS for Windows Release 25.0 Programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois, United States of America) kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik açısından test edilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Normal dağılmayan veriler ise medyan (25. ve 75. yüzdelikler) olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda One Way ANOVA (alternatif; Kruskal Wallis Testi) yapılmıştır. Post-hoc testi olarak Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. P değerinin <0.5 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

96 saatlik uygulamalarda suya ilave edilen çinko nitrat miktarının artması ile birlikte sülük kas dokusunda biriken demir, bakır ve çinko miktarlarının arttığı, ancak arsenik düzeyinin anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Söz konusu zamanda uygulanan bakır sülfatın dokularda belirlenen demirin azalması yönünde bir etki gösterdiği kaydedilmiştir. Yine benzer olarak çinko miktarının da azalışına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu verilere ilaveten uygulanan bakır sülfat miktarı ile dokularda depolanan kurşun miktarının ters orantılı olarak değiştiği kaydedilmiştir. 30 gün süre ile çinko nitrat ve bakır sülfat miktarlarının artışına paralel olarak kurşun ve demir düzeylerinin arttığı arsenik miktarının azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 1).

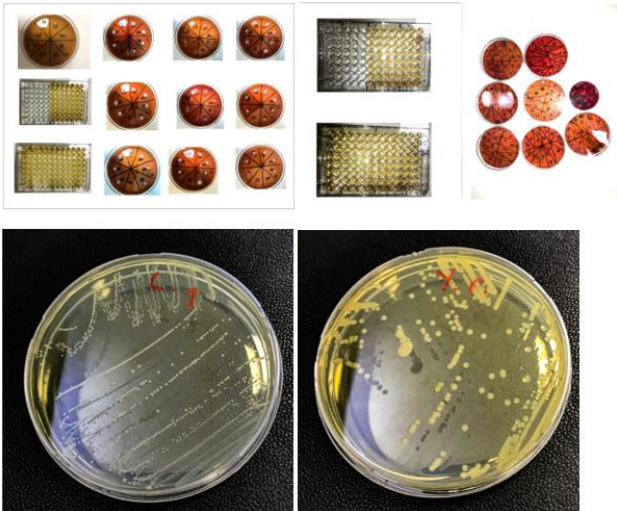
Farklı ağır metallerin 96 saat boyunca uygulanması sonrasında en yüksek MDA değeri yüksek doz çinko nitrat grubunda belirlenmiştir ($p<0.001$). Aynı ağır metallerin 30 gün uygulandığı sülüklerden elde edilen salyadaki MDA düzeylerinin düşük ve yüksek doz bakır sülfat gruplarında önemli düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı ağır metal ve dozlarının tıbbi sülüklerde metal ve MDA düzeylerine etkileri

Muamele grubu	Ağır metal ve miktarı (ppm)					
	Fe	Cu	Zn	As	Pb	MDA
96S-Zn-DD	22.68 ± 0.43	2.02 ± 0.01	16.60 ± 1.41	0.14 ± 0.02	0.98 ± 0.07	0.27 ± 0.01
96S-Zn-YD	17.31 ± 0.17	2.33 ± 0.17	20.41 ± 0.35	0.18 ± 0.02	0.85 ± 0.01	1.34 ± 0.42
96S- Cu-DD	17.83±0.47	2.38±0.23	12.33±1.22	0.17±0.01	1.08±0.01	0.43±0.21
96S-Cu-YD	18.31±1.32	1.85±0.01	12.45±0.19	1.03±0.08	0.21±0.01	0.23±0.06
96S-Kontrol	22.33 ± 0.61	2.14 ± 0.11	14.28 ± 1.58	0.18 ± 0.03	0.98 ± 0.10	0.55±0.48
30G-Zn-DD	20.39±1.47	1.80±0.23	19.37±0.74	0.69±0.33	0.57±0.12	0.58±0.24
30G-Zn-YD	22.94±0.87	2.24±0.10	24.65±4.34	0.37±0.01	0.74±0.09	1.41±0.58
30G-Cu-DD	20.71±0.98	6.20±0.28	20.51±1.46	0.18±0.01	0.18±0.04	1.95±0.02
30G-Cu-YD	24.80±0.65	4.88±0.06	17.52±1.23	0.22±0.02	0.70±0.07	1.76±0.19
30G-Kontrol	20.62±2.01	3.08±1.63	26.23±4.21	0.85±0.25	0.48±0.07	1.17±1.02
P değeri	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

DD: düşük doz, YD: yüksek doz, S: saat, G: gün, Fe: demir, Cu: bakır, Zn: çinko, As: arsenik, Pb: kurşun, MDA: malondialdehit

Yapılan bu çalışmalarda sülük salyalarının disk difüzyon yöntemine göre herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmaların doğrulanması bakımından antimikrobiyal testler aynı zamanda minimum inhibisyon konsantrasyonlarını referans alan metot ile de gerçekleştirilmiş olup, bu analizlerde de sülük salyalarının hem *Lactococcus garviae* hem de *Yersinia ruckeri* suşları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Sülük salyalarının *Lactococcus garviae* (solda) ve *Yersinia ruckeri* (sağda) suşları üzerine olan antimikrobiyal etkileri

4. Tartışma ve Sonuç

Alaama ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada, toksisite ve ağır metal birikimleri bakımından sudaki ağır metal artışlarına bağlı olarak sülüklerin kas doku ve salyalarındaki ağır metal birikimlerinin artış gösterdiği kaydedilmiştir. Mevcut çalışmada da tıbbi sülüklerin kas dokularındaki ağır

metal birikimlerinin uygulama dozlarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiş olup, bu sonuçlar her iki çalışmanın birbirini destekler nitelikte olduğunu göstermektedir. Her iki çalışmada farklı tıbbi sülük türleri kullanılmış olsa da dokularda ağır metal birikim dinamiği, ortamdaki ağır metal miktarına bağlı olarak birbirine benzer görünmektedir. Ayrıca bakır ve çinko gibi ağır metallerle maruz bırakılan sülüklerin ortamdaki uzaklaşma, beslenme faaliyetlerini azaltma, tutunma özelliklerinde ve boşaltım faaliyetlerinin olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Söz konusu çalışmalarda bu parametrelerin ağır metal çalışmalarında davranışsal göstergeler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (23). Çinko ve bakırın farklı konsantrasyonlarının bireysel veya birlikte etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada uygulama süreleri 48 saat, 96 saat, 10 gün, 20 gün ve 30 gün olarak belirlenmiştir. *Hirudo verbana* türü sülüklerde yapılan bu çalışmada bakırın çinkoya göre daha çok toksik etkiler gösterdiği bulunmuştur. Toksik etkilerin kısa periyotlardan ziyade uzun periyotlarda ortaya çıktığı vurgulanmıştır. (18). Elde edilen bu bulgularla mevcut çalışmadan elde edilen bulgular birbirini destekler özelliindedir. Çünkü sülük dokularında belirlenen ağır metal birikimlerinin bakır sülfat uygulamalarında ve 30 günlük periyotta net bir biçimde ortaya çıktığı bulunmuştur.

Uzun periyotlarda bakır sülfat konsantrasyonundaki artışın sülük dokularındaki demir ve kurşun miktarlarını arttırdığı, buna karşın arsenik ve çinko miktarlarını ters orantılı olacak biçimde azalttığı belirlenmiştir. Buraya kadar belirtilen ikili metal ilişkilerinden suya ilave edilen çinkonun sülük dokularında biriken bakır miktarını arttırmasına rağmen, benzer etkinin bakır tarafından gösterilmediği aksine dokulardaki çinkonun azalması yönünde etki ettiği belirlenmiştir. Bu veriler Petrauskiene (18) tarafından gerçekleştirilen çalışmada elde edilen verilerden ortaya çıkan etkinin aslında sinerjistik olmadığını ortamdaki çinkonun çekilmesi halinde toksisitenin daha düşük olacağını

göstermektedir. Bu yönü ile çalışmamız farklılık arz etmektedir. Sonuç olarak bakırın sülüklerde toksik etkilerin araştırılması için çinkoya göre daha iyi bir indikatör olduğu söylenebilir. Ancak bu etkilerin kısa periyotlardan ziyade en az 30 gün ve daha uzun sürelerde daha net bir şekilde ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Kısa periyotlarda (96 saat) ağır metal uygulamaları sonrasında yüksek doz çinko nitrat uygulamasının sülük salyasında MDA değerinin en yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir. Bu durum yüksek doz çinkonun sülüklerde oksidatif stres kaynağı olduğunu göstermektedir. Ancak literatürde sülük salya MDA'ları üzerinde yapılmış herhangi bir araştırma bulunamadığından 96 saat sonrasında elde edilen bu değerler başkaca yayınlarla kıyaslanamamıştır. Ancak elde edilen veriler kısa periyotlar için çinkonun *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerde bir stres kaynağı olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte 30 günlük uygulamalarda, yüksek doz bakır sülfat ve yüksek doz çinko nitrate maruz bırakılan tıbbi sülüklerde MDA değerleri bakımından istatistiksel olarak aralarında farklılık olmadığı anlaşılmıştır.

Tıbbi sülük salyasının antimikrobiyal etkilerinin ortaya konmasında farklı iki patojen *Lactococcus garviae* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri kullanılmıştır. Tüm muamele gruplarından 96 saat ve 30 günlük ağır metal uygulanan sülüklerden salyaları sağılmış ve antimikrobiyal sonuçları ayrı değerlendirilmiştir. Ancak tüm muamele gruplarından alınan tıbbi sülük salyalarının yukarıda verilen balık patojenleri üzerinde herhangi baskılayıcı etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak bu durum diğer balık ve/veya insan patojenleri için geçerli olmayabilir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması için insan, su canlıları veya deney hayvanları üzerinde gerek *Hirudo verbana* gerekse diğer tıbbi sülüklerden elde edilen salyalar denenebilir. Literatür taramalarında Malezya sülüğü olarak bilinen *Hirudinaria manillensis* türü sülüklerin 14 haftalık açlık sonrası *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* patojenleri üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir.

Yine aynı çalışmada 23 hafta aç bırakılan sülüklerden elde edilen liyofilize salyanın *Staphylococcus aureus* ve *S. typhimurium* patojenlerine karşı etkili oldukları belirlenmiştir (24). Söz konusu çalışmada açlık periyodunun sülük salyasının antimikrobiyal karakteristiğine önemli düzeyde etki ettiği belirtilmiş olup, aynı zamanda bizim çalışmada kullandığımız türün de farklı olması sonuçların farklı çıkmasında birer faktör olabilir. Bu nedenlerle farklı açlık sürelerinin *Hirudo verbana* türü sülüklerde antimikrobiyal özelliklere etkilerinin araştırılması tavsiye edilebilir. Malik ve ark. (25) tarafından aynı sülük türü ile yapılan başka bir çalışmada ise 14 hafta aç bırakılan sülüklerden elde edilen salyanın *E. coli* 'ye karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla ile sülük salyasının antimikrobiyal etkilerinin

sağlıklı bir şekilde ortaya konabilmesi için; sülük türü, açlık periyodu, salya saflığı ve formu (sıvı/ liyofilize olup olmaması), sülüğün hasat mevsimi gibi faktörlerin ayrı ayrı ele alınarak detaylı araştırmaların yapılması tavsiye edilebilir. Çalışmadan elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında *Hirudo verbana* türü tıbbi sülüklerin, çevresel kirlenmeler için iyi bir indikatör organizma olabilecekleri anlaşılmaktadır.

Teşekkür

FYL-2020-10072 kodlu proje ile bu çalışmanın yapılmasındaki katkılarından dolayı, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Akçalı İ, Küçüksezgin F. Ege Denizi kıyılarında görülen kahverengi alg (*Cystoseris* sp.)'de ağır metal birikimi. Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2009; 26(3): 159-163.
2. Richetti SK, Roseberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. NeuroToxicology 2011; 32(1): 116-122.
3. Oliva M, José Vicente J, Gravato C, Guil-hermino L, Galindo-Riaño MD. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation, Ecotoxicology and Environmental Safety 2012; 75(1): 151-162.
4. Hsu T, Huang KM, Tsai HT, Sung TS, Ho TN. Cadmium (Cd) induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition pro-teins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Aquatic Toxicology 2013; 126: 9-16.
5. Pereira S, Cavalie I, Camilleri V, Gilbin R, Adam-Guillermin C. Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2013; 750(1-2): 19-26.
6. Rainbow PS. The significance of trace metal concentrations in decapods. Symposium of Zoological Society 1988; 59, (pp. 291-313). London.
7. Madhavan P, Elumalai K. Effects of chromium (VI) on the lipid peroxidation and antioxidant parameters in the gill and kidney tissues of catfish, (*Clarias batrachus*) (Linnaeus 1758) (Actinopterygii: Siluriformes). International Journal Advanced Research in Biological Sciences 2016; 3(4): 249-255.
8. Ubani-Rex OA, Saliu JK, Bello TH. Biochemical Effects of the Toxic Interaction of Copper, Lead and Cadmium on (*Clarias gariepinus*). Journal of Health and Pollution 2017; 16: 38-48.
9. Arafa MM, Al-Afifi SHH, Ali AT. Investigating the Oxidative Stress of Heavy Metal's Pollution in (*Clarias gariepinus*). Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health 2015; 1(1): 231-43.
10. Türkmen A. İskenderun Körfezinde deniz suyu, askıdaki katı madde, sediment ve dikenli taş istiridyesinde (*Spondylus spinosis*) (Schreibers, 1793) oluşan ağır metal birikimi üzerine araştırma, Doktora tezi, Atatürk Üniv Fen Bil Ens, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum 2003.
11. Phillips DJH, Rainbow PS. Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Elsevier Science Publishes Ltd. England 1993; p. 371.

12. Wedepohl KH. The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals: Metals in natural raw materials; Natural Resources, Wiley 1990; p. 3-18.
13. Dallinger R, Rainbow R. Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. 1st edition, Setac Special Publications, Lewis Publishers Chelsea 1993.
14. Carballeria A, Carral E, Puente X, Villares R. Regional-scale monitoring of coastal contamination: nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia. International Journal of Environment and Pollution 2000; 13: 534-572.
15. Ettajani H, Amiard-Triquet C, Amiard J-C. Etude experimentale du transfert de deux elements traces (Ag, Cu) dans une chaine trophique marine: eau particules (sediment naturel, microalgue)-mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas* Thunberg). [Experimental study of the transfer of two trace elements (Ag, Cu) in a marine food chain: particulate water (natural sediment, microalgae)- filter molluscs (*Crassostrea gigas* Thunberg)]. Water Air Soil Pollution 1992; 65: 215-236.
16. Salazar MH. Use and misuse of mussels in natural resource damage assessment. Marine Technology Society Conference, Global Ocean Resources 1, (pp. 257-264), 1992 Washington DC.
17. Rainbow PS. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Marine Pollution Bulletin 1995; 31 (4-12): 183-193.
18. Petrauskienė L. Lethal effects of Zn, Cu and their mixture on the medicinal leech (*Hirudo verbana*). Ekologija 2008; 54(2): 77-80.
19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 1966; 45: 493-96.
20. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods in Enzymology 1990; 186: 407-421.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 1979; 95(2): 351-358.
22. Alaama M, Abdulkader AM, Ghawi AM, Merzouk A, Khalid RS, et al. Assessment of Trace Heavy Metals Contamination in the Tissues and Saliva of the Medicinal Leech *Hirudinaria manillensis*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2021; 21(5): 225-31.
23. Petrauskienė L. The medicinal leech as a convenient tool for water toxicity assessment. Environmental Toxicology 2004; 19(4): 336-341.
24. Abdulkader AM, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama M. Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. IIUM Engineering Journal 2011; 12(4): 1-9.
25. Malik B, Astuti DA, Arief DJF, Rahminiwati M. A study on antioxidative and antimicrobial activities of saliva extract of Indonesian local leeches. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences 251, The 2nd International Conference on Natural Products and Bioresource Sciences 1-2 November 2018; Tangerang- Indonesia.