

Fenitrothion'un Etkisinde Bırakılan Tilapia'da (*Oreochromis niloticus* L.) Sekonder Stres İndikatörleri Hematokrit ve Plazma Glukoz Seviyesinin Değişimi

A. Çağlan KARASU BENLİ⁽¹⁾

Zeynep GÜLEN⁽²⁾

Öz: Bu çalışmada, sucul ekosisteme toksik kirletici olarak bulaşabilen organik fosforlu pestisitlerden fenitrothionun subletal konsantrasyonlarının, Tilapia (*Oreochromis niloticus*) üzerinde sekonder stres yanıtı araştırılmıştır. Subletal fenitrothion konsantrasyonlarının (5, 50 ve 100 µg/L) etkisinde kalan Tilapia'nın (*Oreochromis niloticus*) sekonder stres yanıtı hematokrit ve plazma glukoz ölçümleri ile değerlendirilmiştir. 96 saat süren deneyler iki tekrarlı olarak yürütülmüş ve yarı statik yöntem kullanılmıştır. Kan örnekleri deneyin 1. ve 96. saati sonunda alınmıştır. 1 ve 96 saat süreyle fenitrothionun etkisinde kalan balıkların hematokrit değerleri kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Plazma glukoz düzeyleri her iki örnekleme zamanında da kontrole göre istatistik olarak önemli düzeyde artarken ($p<0.05$), 50 ve 100 µg/L fenitrothion konsantrasyonunda zamana ve doza bağlı değişim göstermiştir. Bu çalışmada değerlendirilen parametreler göz önüne alındığında tilipianın subletal fenitrothion konsantrasyonlarının etkisinde kalmasının strese neden olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fenitrothion, organik fosforlu insektisit, sekonder stres

The Alteration of Hematocrit and Plasma Glucose Level as Secondary Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) After Exposure to Fenitrothion

Abstract: The sublethal effects of fenitrothion, a organophosphothionate insecticide and potential toxic pollutant contaminating aquatic ecosystems, was investigated in the present study. The secondary stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* after exposed to sublethal fenitrothion concentrations (5, 50 and 100 µg/L) was evaluated assessing the levels of hematocrit and plasma glucose. The 96 h experiments were repeated 2 times and semi-static method was carried out. Blood samples were taken after the 1st and 96th h of the experiment. After 1 and 96 h exposed to fenitrothion hematocrit values were declined significantly ($p<0.05$). Plasma glucose levels were increased significantly in both sampling periods; however, time and concentration dependent changes were shown at the concentrations of 50 and 100 µg/L hematocrit values were declined ($p<0.05$). Considering the parameters measured in this study Nile tilapia appeared to exhibit a stress response to sublethal fenitrothion concentrations.

Key words: Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fenitrothion, organophosphothionate insecticide, secondary stress

Giriş

Nüfus artışına paralel olarak azalan tarım toprakları nedeniyle birim alandan alınacak ürün miktarının artırılması amacıyla gübreleme, sulama ve tarım ilacı uygulamaları yapılmaktadır (Post, 1987). Bu işlemler bilinçli ve kontrollü uygulanmadığı takdirde yağmur, deşarj suları ve yüzey akışlarıyla su kaynaklarına ulaşarak kirlilik yaratabilmektedir (Atamanalp ve Yanık, 2001). Pestisit kontaminasyonu, akuatik organizmalarda direkt ölüme neden olabileceği gibi büyümelerinde azalma, hastalıklara karşı duyarlı hale gelme gibi sonuçlar doğuran strese yol açabilmektedir (Morgan ve Brunson, 2002). Stres faktörü teleostlarda genel bir stres yanıtı ortaya çıkarmaktadır. Bu reaksiyon, balığın olumsuz uyarıma kalmasından sonra balığa tekrar homeostazi (sağlıklı yaşamın devamı için vücudun yapı ve işlev bakımından gösterdiği değişmezlik

veya çevreye uyum göstererek denge ve düzen içinde çalışması hali) kazandırma amaçlı adapte olma mekanizması şeklinde değerlendirilmektedir (Robertson ve ark., 1987). Bu yanıtın ilk fazı uyarımdan hemen sonra katekolaminlerin (epinefrin ve norepinefrin) ve kortikosteroidlerin (dominant olarak kortizol) hipersekresyonu ile karakterize edilmektedir. Bu hormonların yükselen seviyeleri, metabolik, osmoregulasyon ve bağışıklık sistemi değişikliklerini içeren sekonder yanıtı teşvik etmektedir. Tersiyer etkiler, büyümenin engellenmesi ve hastalıklara karşı duyarlılığın artması gibi etkilerdir (Robertson ve ark., 1987; Davis ve Parker, 1990; Arende ve ark., 1999). Bu bağlamda, stresin balığın homeostazisini muhafaza etme kapasitesini ve aynı zamanda ikinci bir stres faktörüne karşı dayanma yeteneğini de azalttığı açıktır.

⁽¹⁾ Yazışma Adresi: Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens., Çevre Bilimleri ABD, Maltepe, ANKARA, ackbenli@gmail.com

⁽²⁾ Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Dışkapı, ANKARA

Oksijen tüketimi, lipid metabolizması, plazma glukoz ve hematokrit ölçümü akut fizyolojik stres yanıtında indikatör olarak değerlendirilmekte (Sancho ve ark., 1999) ve sekonder stres yanıtı hakkında fikir verebilmektedir. Bu açıdan hematokrit ve plazma glukozu pratik olarak ölçülebildiğinden subletal stres yanıtının incelendiği çalışmalar için önerilmektedir (Smith, 1991).

Orta derecede zehirli pestisitler sınıfında olan fenitrothion [CAS no: 122-14-5, O, O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate], organik fosforlu bir insektisittir. 1959 yılından beri pirinç, tahıl, meyve, sebze, depolanmış buğday ve pamuk bitkisinin böcek kontrolünde kullanılmaktadır. Fenitrothion kullanım miktarı, sıklığı ve yöntemleri (direkt, havaya spreyleme) pest türüne göre değişim göstermektedir (APVMA, 2004). Aynı zamanda halk sağlığı programlarında sıtmayla mücadelesinde vektör kontrol etkenidir (Extoxnet, 2003). Fenitrothion, bal arısı, örümcek ve Daphnia gibi su invertebratları gibi hedef olmayan türler için oldukça toksiktir (Fawell ve Hedgecote, 1996; EPA, 2003).

Fenitrothion'un balıklar üzerine etkisine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalar bu maddenin bazı balık türlerinde LC50 değerinin tespiti ve yılan balıklarında enzim, birikim ve bazı biyokimyasal etkilerinin incelenmesi şeklindedir (Sancho ve ark., 1997; 1998a; 1998b; 1998c; 1999). Kaynak alabalığında 96 saatlik LC50 değeri (*Salvelinus fontinalis*) 1.7 ppm, mavi solungaç güneş balığında (*Lepomis macrochirus*) 3.8 ppm, has kefalde (*Mugil cephalus*) 2.6 ppm; pullu sazanda (*Cyprinus carpio*) 48 saatlik LC50 değeri 2.6 mg/L olarak saptanmıştır (Extoxnet, 2003). Avrupa yılan balıkları (*Anguilla anguilla*) üzerinde yaptıkları çalışmada 0.02 ppm fenitrothion konsantrasyonunun, plazma glukoz ve laktat düzeylerini kontrol grubuna göre arttırırken, protein düzeylerini azalttığını saptamışlardır (Sancho ve ark., 1997).

Dünyada balık yetiştiriciliğinde ön sıralarda yer alan ve ülkemizde özellikle Adana yöresinde yetiştiriciliği önem kazanmış Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) üzerinde fenitrothion'un etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada subletal fenitrothion konsantrasyonlarının etkisinde kalan Tilapia'da stres yanıtını ölçmede indikatör parametreler olarak belirtilen hematokrit ve plazma glukoz düzeylerinin ölçülerek yarattığı stresin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Deneyler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Balıkçılık Araştırma Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Ortalama boyları 14.73±0.68 cm, ortalama ağırlıkları 52.10±3.76 g olan toplam 150 adet tilapia (*Oreochromis niloticus* L. 1758) kullanılmıştır.

Balıklar deneye başlamadan iki hafta önce deney akvaryumlarına yerleştirilmiş ve günlük olarak vücut ağırlıklarının %2'si oranında %45 ham proteinli ticari

alabalık yemi ile beslenmiştir. Deneylerde dinlendirilerek kloru giderilmiş çeşme suyu kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan suyun parametreleri şu şekildedir; sıcaklık 24±2°C, çözülmüş oksijen 6.6 mg/L ve iletkenlik 0.245 mS/cm, sertlik 21 FS°, total amonyak-N 0.017 mg/L. Deneylerde yaklaşık 100 L kapasiteli cam akvaryumlar kullanılmıştır. Su sıcaklığı termostatlı ısıtıcılar kullanılarak sabit tutulmuştur.

Deney toksik maddesi fenitrothion (%95 etken madde (Shenzen Co. Ltd., China)) Hacettepe Üniversitesi İnsektisit Test Laboratuvarından sağlanmıştır. Stok çözelti, tartılan katı haldeki fenitrothion'un volumetrik cam balon jode belirli hacim analitik saflıkta aseton ilavesiyle çözülerek elde edilmiştir. Diğer uygulama dozları stok çözeltinin belirli hacimlerinin cam kaplarda aseton ile sulandırılması sonucu sağlanmıştır. Stok ve doz çözeltileri kullanılabilecek kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Çözelti kullanım öncesinde ortam sıcaklığına getirilerek deney düzeneğine verilmiştir (Sarıkaya ve ark., 1994). Akvaryumlara fenitrothion ilavesinde yapılması sırasında otomatik pipetler ve Hamilton marka mikroşırıngadan yararlanılmıştır. Havalandırma suyu fenitrothion ilavesi sırasında kapatılmış olup diğer zamanlarda ise açık tutulmuştur.

Deneylerde biyodenyler için standart yöntemler esas alınmıştır (APHA 1975, TSE, 1988; 1990). Deney konsantrasyonlarının belirlenmesi için ön denemeler yapılmıştır. Balıklar için öldürücü olmayan üç farklı konsantrasyon (5, 50 ve 100 µg/L) saptanmıştır. Bu konsantrasyonlarda asıl deney iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Asıl deneyde her akvaryuma rastgele 10 balık stoklanmıştır. Deneylerde su kalitesinin etkilenmemesi açısından deneyden 24 saat önce ve deney boyunca akvaryumlardaki balıklara yemleme yapılmamıştır (APHA, 1975).

Ana deneyler, yarı statik biyodeny yöntemi kullanılarak yapılmış ve 96 saat sürdürülmüştür. Sudaki fenitrothion konsantrasyonunun sabit tutulması için 24 saatte bir balıklar yeni hazırlanmış deney ortamına aktararak deney ortamı değiştirilmiştir. 1. ve 96. saat sonunda kan örnekleri alınmıştır. Kontrol balıklarına da aynı işlemler yapılmıştır.

Kan, heparinize şırınga ile kalpten tüm balıklardan alınmıştır. Plazma 1500 g devirde 15 dakika santrifüjle elde edilmiştir. Hematokrit ölçümü mikrohematokrit yöntemiyle 12500 rpm'de 4 dakika santrifüjle saptanmıştır (Siwicki ve Anderson, 1993). Plazma glukoz, GOD-PAP enzimatik kolorimetrik yöntemle göre Dialab (Avusturya) analiz kiti ile ölçülmüştür.

Verilerin istatistik değerlendirilmesinde varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (p<0.05) (Düzgüneş ve ark., 1993).

Bulgular

Subletal fenitrothion konsantrasyonları (5, 50 ve 100 µg/L) etkisinde kalan tilapia'lara ilişkin hematokrit ve plazma glukoz değerleri Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. Subletal fenitrothion konsantrasyonlarına (5, 50 ve 100 µg/L) maruz kalan tilapia'lara (*Oreochromis niloticus*) ilişkin hematokrit ve plazma glukoz değerleri
Table 1. Hematocrit and plasma glucose values of Nile tilapia exposed to sublethal fenitrothion concentrations (5, 50 and 100 µg/L)

Fenitrothion konsantrasyonu/ Fenitrothion Concentration	Örneklem zamanı/sampling period	
	1. saat/ 1 h	96. saat/96 h
	Hematokrit (%)	
5 µg/L	16,76±5,48Ab	15,62±2,36Ab
50 µg/L	16,93±3,44Ab	15,52±2,23Ab
100 µg/L	15,01±3,81Ab	14,14±5,07Ab
Kontrol/control	23,35±2,80Aa	19,48±5,84Ba
	Plazma glukoz (mg/dl)/plasma glukoz	
5 µg/L	99,17±1,17Ab	103,08±1,35Ab
50 µg/L	142,22±1,42Aa	103,28±1,19Bb
100 µg/L	142,47±1,66Ba	226,39±2,82Aa
Kontrol/control	49,47±3,55Ac	53,79±0,26Ac

Aynı satırda büyük harflerle ve sütunda küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).
Different letters above in the same column and in the same line indicate significant differences ($p < 0.05$).

Plazma glukoz değerleri, 1. ve 96. saat sonunda kontrol grubuna göre artmıştır. 1. saat sonunda 50 ve 100 µg/L etkisinde kalan balıkların plazma glukoz değerlerinde istatistik olarak önemli bir fark görülmezken, 5 µg/L fenitrothion konsantrasyonuna göre önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). 96. saat sonunda ise 5 ve 50 µg/L etkisinde kalan balıkların plazma glukoz değerlerinde istatistik olarak önemli bir fark görülmezken, 100 µg/L fenitrothion konsantrasyonuna göre önemli olduğu belirlenmiştir. ($p < 0.05$).

Hematokrit değerleri, 1. ve 96. saat sonunda kontrol grubuna göre azalmıştır. Her iki örneklem zamanında da farklı fenitrothion konsantrasyonları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır.

Tartışma

Tilapia'da organik fosforlu pestisitlerden fenitrothion'un etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada farklı fenitrothion konsantrasyonları etkisinde kalan Tilapia'nın plazma glukoz değerlerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Çalışma bulgularımıza benzer olarak Sancho ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada 0.02 ppm fenitrothion konsantrasyonunun etkisinde kalan yılan balıklarında 8, 12, 24, 48 ve 96 saatin sonunda yaptıkları ölçümlerde plazma glukoz değerlerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir.

Plazma glukoz değerleri, subletal stres yanıtının belirlenmesinde hassas bir indikatör olarak değerlendirilmiştir (Hatting, 1976). Kan glukoz seviyeleri balığın stresli herhangi bir uyarımını izleyerek hızla arttığı (Pottinger ve Carrick, 1999), kısa ve hatta orta şiddetteki stres sonrasında ise 200 mg/100 mL'yi aştığı bildirilmiştir (Smith, 1991). Stres sonrası kan glukoz seviyelerinin artması, stresin ilk fazında kanda katekolomin artışıyla ilgili olduğu, kan glukozunun ölçülmesi, stres yanıtının büyüklüğünü belirleme açısından indirekt alternatif bir gösterge olarak kabul edildiği ifade edilmiştir (Pottinger ve Carrick, 1999).

Bu çalışmada farklı fenitrothion konsantrasyonlarının etkisinde kalan Tilapia'da hematokrit değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Fenitrothionun hematokrit değerine etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hematokrit, balığın hemapoietik aktivitesinin bir göstergesi olup, anormal hematokrit değerleri bir sağlık probleminin varlığını yansıtabilmektedir. Azalan hematokrit nedenlerinden birisinin de akut stres olduğu bildirilmiştir (Wedemeyer ve ark., 1990).

Sonuç

Son yıllarda tatlısu yaşamını korumak amacıyla akuatik omurgalılar üzerinde fizyolojik stres yanıtının belirlenmesi ilgi gören konular arasındadır. Ancak birçok pestisit subletal düzeylerinin balıklar üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Morgan ve Brunson, 2002). Bu çalışma sonucunda suda çok düşük bir konsantrasyon olan 5 µg/L fenitrothion bulunmasının balıklarda stres yarattığı saptanmıştır.

Kaynaklar

- APHA, 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition. Washington. APHA, USA.
- APWMA, 2004. http://www.apvma.gov.au/chemrev/downloads/fenitrothion_2004.pdf (erişim: 17.09.2008)
- Arende, R. J., Mancera, J. M., Munoz, J. L., Bonga, S. E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.*, 163, 149-157.
- Atamanalp, M., Yanık, T., 2001. Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri. *EÜ Su Ürün. Derg.*, 18: (3-4) 555-563.
- Davis, K. B., Parker, N. C., 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*, 91, 345-358.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Gürbüz, F., 1993. *İstatistik Metotları (II. Baskı)*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1291, Ders Kitabı: 369, 218 s., Ankara

- EPA -www.epa.gov/pesticides/a-z (EPA Reregistration Eligibility Decision (RED) document)- (erişim: 10.02.2003).
- Exttoxnet -http://ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/fenitrot.htm-(erişim: 10.02.2003).
- Fawell, J. K., Hedgecote, S., 1996 . Derivation of acceptable concentrations for the protection of aquatic organisms. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2: 115–120.
- Hatting, J., 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish. *Labeo copensis* (Smith). *J. Fish Biol*, 10,191-195.
- Morgan, E. R., Brunson, M. W., 2002. *Toxicities of Agricultural Pesticides to Selected Aquatic Organisms*. SRAC Pub. No. 4600. 1-28.
- Post, G., 1987. *Textbook of Fish Health*. USA: T. F. H. Publications.
- Pottinger, T. G., Carrick, T. R., 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout, *Aquaculture*, 175: 351-365.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C. R., Trant, J. M., 1987. Plasma Cortisol and Secondary Stress Responses of Red Drum to handling, Transport, Rearing Density and a Disease Outbreak. The Prog. *Fish-Culturist*, 49: 1-12.
- Sancho E., Ferrando, M. D, Andreu-Moliner, E., 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European Eel. *Ecotox. Environ. Saf.*, 36: 57-65.
- Sancho E., Ferrando, M. D, Andreu-Moliner, E., 1998a . Uptake and elimination kinetics of a pesticide in the liver of the European eel. *J. Environ. Sci. Health Part B*, 33: 83–98.
- Sancho E., Ferrando, M. D, Andreu-Moliner, E., 1998b. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotox. Environ. Saf.*, 41: 168–175.
- Sancho E., Ferrando, M. D, Andreu-Moliner, E., 1998c . In vivo inhibition of AChE activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to technical grade fenitrothion. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*, 120: 389–395.
- Sancho E., Ferrando, M. D., Andreu-Moliner, E., 1999. Fenitrothion induced changes in the European eel metabolism. *Ecotox. Environ. Restor.*, 2(1): 7-13.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., Erkoç, F., 2004. Investigations of acute toxicity of fenitrothion on peppered corydoras (*Corydoras paleatus*). *Chemosphere*, 56: 697–700.
- Siwicki, A. K., Anderson D. P.,1993. *Immunostimulation in fish. In: Proceedings of Nordic Symposium on Fish Immunology*. Sweden. 19-22 May.
- Smith, S. L., 1991. *Introduction to Fish Physiology*. Argent Lab. Redmond,WA, USA.
- TSE, 1988. *Su Kirliliği Kontrolü -Zehirlilik Deneyleri-Kısım 1*. TSE. TS 5676.
- TSE, 1990. *Endüstriyel Sıvı Atıklar ve Atıksular -Akut Zehirlilik Deneyleri- Canlılık Deney Metodları*. TSE TS 8264/Nisan 1990.
- Wedemeyer, G. A., Barton, B. A., Mcleay, D. J., 1990. Stress and acclimation. In *Methods for Fish Biology* (Ed. by C. B. Shreck and P. B. Boyle) American Fisheries Society, *Bethesda*, 451-489.