

Yabani tip *Calliptamus tenuicercis*
Tarbinski (Orthoptera : Catantopidae)
örneklerinde azinfosmetil uygulamasına
bağlı asetilkolinesteraz inhibisyonu

Murat ÖZMEN* Battal ÇIPLAK** Özfer YEŞİLADA*
Birgül ÖZCAN*** Esin ULUBABA*

Summary

**Acetylcholinesterase inhibition due azinphosmethyl exposure on wild type
Calliptamus tenuicercis Tarbinski (Orthoptera: Catantopidae)**

This is a model study on specimens of *Calliptamus tenuicercis* Tarbinski (Orthoptera: Catantopidae) which collected from the field. Inhibition effect of the organophosphorus insecticide, azinphosmethyl, on acetylcholinesterase (AChE) activity was investigated. During the experiments, mature female locusts which collected from vicinity of Yaygın Village of Malatya-Turkey (step area) were used. Experiments were done during August and September 1994. Insecticide was sprayed to each of six enclosure which built on grass and trifolium planted area in different doses (0, 212.0, 424.1, 841.5, 1694.3 and 3388.5 gr/ha), and than locusts were housed. AChE activity of the specimens, which collected randomly on day 3, day 7 and day 11, was assayed. AChE activity inhibition ratio were determined as % 19.35-30.8, % 7.34-44.29 and % 35.19-35.28 respectively on day 3, day 7 and day 11. In the result, it was found that AChE inhibition is increase due to exposure period and also treatment doses.

Key words: Azinphosmethyl, Orthoptera, Calliptamus, Acetylcholinesterase
Anahtar sözcükler: Azinfosmetil, Orthoptera, Calliptamus, Asetilkolinesteraz

- * İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, Türkiye
** Akdeniz Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye
*** Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hatay, Türkiye

Alınış (Received): 27.12.1996

Giriş

Çevre toksikolojisinde çeşitli biyobelirteçlerin kullanılması amacı ile geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar organizmada çevresel kirleticilerin etkilerinin ve uygulanan madde konsantrasyonlarının saptanmasında kullanılan fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal yöntemler olarak tanımlanabilir (Hugget et al., 1992; Peakall., 1992; Heath et al., 1993). Günümüzde hedef olarak seçilen zararlı böcekleri kontrol etmek amacı ile kullanılan kimyasal insektisitlerin tümü nörotoksik maddelerdir ve etkilerini sinir sistemi üzerinde göstermektedir. Ancak, bu maddeler seçici olmamaları nedeni ile, hedef organizmalar kadar eko-sistemde hedef olmayan canlılar üzerine de benzer etkilere sahiptir (Amdur et al., 1991).

Asetilkolin, böceklerde merkezi sinir sisteminde bulunan, buna karşın nöromusküler bağlantılarda varlığı gösterilmemiş olan nörotransmitter bir maddedir (Burnell and Wilkins, 1988). Kolinerjik sistemin metabolik enzimleri böceklerde fazla miktarlarda bulunmaktadır ve histokimyasal olarak asetilkolinesteraz (AChE) başın nörofillerini ve toraksik ganglionları çevreleyen sinir hücrelerinin korteksinde yüksek oranda bulunmaktadır (Hall et al., 1980). Canlılarda organik fosforlu insektisit uygulamasına bağlı olarak, AChE enzimi inhibe edilmektedir. AChE hedef enzim olduğundan, biyokimyasal biyobelirteç olarak, organik fosforlu insektisit toksisitesi çalışmalarında enzim inhibisyonu saptanmalıdır.

Diğer taraftan, Orthoptera takımına ait herbivor türler dünyada ve yurdumuzda her yıl özellikle ekili alanlarda ürün kaybına ve maddi zararlara neden olabilmektedir. Ancak bu türlerin sürekli hareket halinde olmaları kimyasal olarak savaşımı güçleştirmektedir. **Calliptamus** cinsi yurdumuzda zaman zaman tarımsal zararlara neden olan türleri kapsamaktadır (Uvarov, 1966).

Bu araştırmada, doğal koşullardan toplanan **Calliptamus tenuicercis** Tarbinski (Orthoptera: Catantopidae) örneklerine, laboratuvar koşullarında organik fosforlu bir insektisit olan azinfosmetil'in farklı dozlarının uygulanması ve AChE enzim aktivitesinin inhibisyonunun doz - gün ilişkisinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak, insektisit uygulaması bir çalışma modeli üzerinde denenmiştir.

Materyal ve Metot

Bu araştırmada, uygulama materyali olarak *C. tenuicercis* dişileri kullanıldı. Örnekler Ağustos 1994' de Malatya Yaygın Köyü çevresinde toplandı. Örneklerin alındığı bölgede rakım 790 m olarak ölçüldü. Örneklerin toplandığı arazinin tarım alanlarından uzakta ve herhangi bir yerleşim biriminin olmadığı bölgede bulunmasına özellikle dikkat edildi. Çekirgeler yakalandıktan sonra, tür ve eşey teşhisi arazide yapılıp plastik torbalara konuldu. Torbalar hava ile şişirilip bağlandı ve laboratuvara taşındı. Oda sıcaklığında bir gece süre ile aç bırakılan çekirgeler, İnönü Üniversitesi kampüs alanı içerisinde önceden hazırlanmış olan ortamlara bırakılarak barındırıldı.

Çekirgelerin insektisit etkisine maruz bırakılması amacı ile, doğal koşullarda çimen (*Lolium* sp.) ve yonca (*Trifolium* sp.) karışımı ekili olan ve düzenli sulanan bir arazide birbirinden 3 m aralıklarla altı adet 100x100x50 cm ebatlarında tel kafesler hazırlandı. Kafeslere çekirgelerin bırakılmasından 2 saat önce, sırası ile 0, 212.0, 424.1, 841.5, 1694.3 and 3388.5 gr/ha olacak şekilde insektisit homojen bir şekilde dağılıma özen gösterilerek püskürtüldü. Bunun için, ticari olarak satılan Gusathion 2S® (% 35 aktif içerikli) (Bayer-Türk) stok solusyonundan belirtilen miktarlarda olacak şekilde alınan insektisit 100 ml distile su ile sulandırıldı ve bir el pompası yardımı ile her kafes içerisine uygulama dozuna göre püskürtüldü. Bu andan itibaren, uygulama alanları örnek toplamamın son bulduğu 11. güne kadar sulanmadı. İnsektisit püskürtmesini takiben, 2. saat sonunda her kafeste 34 adet çekirge olacak şekilde örnekler bırakıldı. Örneklerin kafese bırakılmasını takip eden 3. günden itibaren farklı günlerde (3.gün, 7.gün ve 11. gün) kafeslerden 7' şer adet çekirge toplandı, naylon torbalara konulup etiketlendi ve öldürülmeden laboratuvara taşındı. Örnekler derhal -40 °C' da derin dondurucuya konularak, enzimatik çalışmalar yapılana kadar saklandı. Onbirinci günde 212.0, 424.1, 841.5 gr/ha insektisit uygulaması gruplarında yeterli sayıda örnek toplanamadığından enzim aktivitesi çalışılmadı.

Çekirgelerle AChE aktivitesinin saptanması amacı ile Ellman et al. (1961)' in spektrofotometrik aktivite tayin yöntemi Özmen ve Bozcuk (1994)' a göre uygulandı. Bunun için örnekler naylon torbadan teker teker çıkarılıp oda sıcaklığında çözünmeleri sağlandı. Bir bistüri yardımı ile baş kısmı thorax bölgesinden ayrıldı ve tartıldı. Ağırlığının 3 katı oranında Trizma tamponu (pH 7.4) (Sigma Corp., MO, USA) eklenerek, cam-teflon homojenizatörde 3 kez 15 saniye süre ile parçalandı. Daha

sonra, ultrasonifikatör kullanılarak iki kez 15 saniye süre ile sonifiye edildi. Enzim çalışmalarında süpernatant kullanıldı. Deneyin tüm aşamalarında örnekler buz kabı içerisinde muhafaza edildi. Enzim aktivitesi spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda 2 dakika süre ile ölçüldü. Enzim aktivitesi doku örneklerinin her gramında bulunan enzim tarafından hidroliz edilen substrat miktarına bağlı olarak hesaplandı.

Elde edilen enzim aktivite değerleri istatistik paket program (SPSS Inc., USA) kullanılarak varyans analizi (ANOVA)' ne göre (Peterson, 1985), Kruskal-Wallis yöntemi ile test edildi. Gruplar arası farklılık bulunduğu durumda, kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki farklılık Mann Whitney-U testi ile saptandı. Enzim aktivite değerleri standart hata (\pm SEM) değerleri ile gösterildi.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Cetvel 1' de uygulama dozları ve örneklerin deney düzeneğinden toplandığı günlere bağlı olarak, enzim aktivite değerleri ve enzim inhibisyon yüzdesi gösterilmiştir. Azinfosmetil uygulamasına bağlı olarak, *C. tenuicercis*' de AChE aktivitesinin incelendiği bu çalışmada kontrol grubu örneklerinde, enzim aktivitesi günlere bağlı olarak 4.36-4.5 ($\pm 0.23-0.29$) $\mu\text{mol/dakika/gr}$ olarak saptandı. İstatistiksel olarak, enzim aktivite değerleri arasında fark önemli düzeyde bulunmadı. Diğer taraftan, uygulama dozlarına bağlı olarak, enzim aktivitesinin azaldığı ve en yüksek uygulama dozunda 2.43 (± 0.09) $\mu\text{mol/dakika/gr}$ olduğu, en düşük uygulama dozunda ise enzim aktivitesinin kontrol değerlerine yakın olduğu, uygulamanın 7. gününde enzimin % 7.34 oranında inhibisyona uğradığı belirlendi. AChE aktivitesi uygulama dozlarına bağlı olarak incelendiğinde, 3. günde toplanan örneklerde 841.5 gr/ha uygulama dozu hariç, aktivitenin doza bağlı olarak kademeli bir azalış gösterdiği görülmektedir. Her grup kendi arasında incelendiğinde, günlere bağlı olarak, enzim aktivite değerlerinin özellikle yüksek dozda insektisit uygulaması ile azaldığı görülmektedir. Örneklerin üç farklı günde toplandığı yüksek dozda insektisit uygulanan gruplarda doz-gün-enzim aktivitesi ilişkisi ortaya konulmaktadır. Diğer taraftan, kontrol grubu sonuçları ile uygulama grupları karşılaştırıldığında en düşük uygulama dozunda istatistiksel olarak farklılık saptanmazken, diğer tüm uygulama gruplarında enzim aktivitesinin önemli düzeyde inhibisyona uğradığı ortaya konulmuştur ($p < 0.05$; $p < 0.02$; $p < 0.005$).

Cetvel 1. Test günlerine insektisit uygulamasına bağlı olarak AChE aktivitesi ve enzim inhibisyonu

Uygulama Dozu (gr/ha)	n	3. gün		n	7. gün		n	11. gün	
		Aktivite	% İnh.		Aktivite	% İnh.		Aktivite	% İnh.
Kontrol (0)	5	4.50±0.29	-	5	4.36±0.23	-	10	4.43±0.17	-
212.0	7	4.95±0.23	-	5	4.04±0.22	7.34	-	-	-
424.1	7	3.62±0.09a	19.35	6	3.65±0.12a	16.28	-	-	-
841.5	7	3.41±0.17a	30.13	5	3.50±0.28b	19.72	-	-	-
1694.3	5	3.58±0.17a	20.44	7	3.28±0.12c	24.63	7	2.87±0.12c	35.19
3388.5	7	3.11±0.24a	30.80	7	2.43±0.09c	44.29	3	2.86±0.18a	35.28

Azinfosmetil' in hayvanlarda AChE enzimini inhibe ederek toksik etkisini gösterdiği bilinmektedir (Durda et al., 1989; Özmen and Bozcuk, 1994; Meyers and Wolff, 1994). Ancak, diğer organik fosforlu insektisitler gibi azinfosmetil de seçici bir etkiye sahip olmadığından, ekosistemde hedef organizmalar kadar hedef olmayan birçok canlı üzerinde de etkisini göstermektedir. Özellikle besin zincirindeki birikimler nedeni ile canlılarda ikincil zehirlenmelere yol açtığı bildirilmiştir (Rattner and Hoffman, 1984). Bu araştırmada deney materyali olarak kullanılan tür ve diğer *Calliptamus* türleri Orthoptera takımının zararlı grubunu teşkil etmektedir (Uvarov, 1966). Diğer taraftan, Orthoptera takımına ait türlerden bazıları herbivor iken, bir kısmı da diğer bazı böceklerin predatörüdür. Ancak, bu canlılar besin zinciri içinde özellikle kuş, sürüngen ve bazı omurgasız hayvanların besinlerini teşkil etmektedir. Böylece, insektisit ile maruz kalan canlılar besin zinciri yolu ile de hasarlara neden olmaktadır. Organik fosforlu insektisitlerin tarım alanlarında uygulanmasını takiben, toplu halde kuş, memeli ve balık ölümlerinin görüldüğü rapor edilmektedir (Coppage, 1971; Hill and Fleming, 1982). Ancak, özellikle çekirgeler gibi yer değiştirme özelliğinin fazla olduğu canlıların insektisit ile maruz kalmalarını takiben besin zincirindeki predatörlerince avlanmalarının da eko-sistemde önemli hasarlara neden olacağı düşünülmektedir. Bu araştırmada çeşitli dozlarda insektisite maruz kalan hayvanlarda azinfosmetil'in doğal koşullardaki etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Araştırmada kullanılan örneklerin insektisitten etkilenme olasılığı çok az olan bir bölgeden toplanmış olması, doğal ortamlarda canlıların insektisitlere karşı duyarlılığını ortaya koymak bakımından önemli bir sonuç olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, besin zincirinde hedef olmayan, ancak hedef canlıların predatörü olan türler

üzerine de insektisitlerin etkilerinin araştırılması, bilinçsiz ve doğal dengeyi tahrip edecek düzeyde pestisit kullanımının çevre ve eko-sistem üzerine etkilerinin ortaya konulması bakımından da önem taşımaktadır.

Özet

Bu araştırmada, araziden toplanan *Calliptamus tenuicercis* Tarbinski (Orthoptera : Catantopidae) türüne ait örnekler kulanılarak, model bir çalışma yapılması amaçlanmıştır. Çekirgelerde organik fosforlu bir insektisit olan azinfosmetil uygulamasına bağlı olarak, asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibisyonu incelendi. Deneylerde, Malatya, Yaygın Köyü çevresi kırsal alanından toplanan dişiler kullanıldı. Ağustos-Eylül 1994 ayları arasında sürdürülen deneylerde, çimen ve yonca bitkileri karışımı ekili bir alanda kurulan kafeslere farklı dozlarda (0, 212.0, 424.1, 841.5, 1694.3 and 3388.5 gr/ha) insektisit püskürtüldü. İnsektisit uygulamasını takiben çekirgeler ortama bırakıldı. Deneyin 3.gün, 7.gün ve 11.gününde kafeslerden tesadüfi olarak yakalanan örneklerde AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile saptandı.

Enzim aktivitesinin uygulama dozuna bağlı olarak 3.gün, 7.gün ve 11.gün örneklerinde sırası ile % 19.35-30.8, % 7.34-44.29 ve % 35.19-35.28 oranında inhibisyona uğradığı saptandı. Araştırma sonuçlarına göre, AChE inhibisyonunun çekirgelerde, arazi koşullarında uygulanan insektisit dozu ve maruz kalınan süreye bağlı olarak arttığı saptandı.

Literatür

- Amdur, M.O., J. Doull and C.D. Klassen, 1991. Casarett' s and Doull Toxicology: The Basic Science of Poisons. Pergamon Press, New York, 1033 pp.
- Burnell, A.N and N.P. Wilkins, 1988. An investigation of the in vitro inhibition of acetylcholinesterase by the carbamate inhibitor eserine sulphate in eserine resistant strains of *Drosophila melanogaster*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **90C** (1): 215-220.
- Coppage, D.L., 1971. Charecterization of fish brain acetylcholinesterase with an automated pH stat for inhibition studies. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **6** (4): 304-310.
- Durda, J.L., R.A. Powell and G.T. Barthalmus, 1989. Physiological and behavioral effects of Guthion on pine voles, *Microtus pinetorum*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **43**: 80-86.
- Ellman, G.L., D.K. Courthey, V. Andres and R.M. Featherstone, 1961. A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharm.**, **7**: 88-95.
- Hall, J.C., S.N. Alahiolis, D.A. Strumpf and K. White, 1980. Behavioral and biochemical defects in temperature sensitive mutants of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, **96**: 939-965.
- Heath, A.G., J.J. Cech, J.G. Zinkl and M.D. Steele, 1993. Sublethal effects of three pesticides on Japanese medaka. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **25**: 485-491.

- Hill, E.F. and J.W. Fleming, 1982. Anticholinesterase poisoning of birds: Field monitoring and diagnosis of acute poisoning. **Environ. Toxicol. Chem.**, 1: 27-38.
- Hugget, R.J., R.A. Kmerle, P.M. Mehrle, H.L. Bergman, K.L. Jackson, J.A. Fava, J.F. Mccarty, R. Parrish, P.B. Dorn, V. McFarland and G. Lahvis, 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress, Introduction, Ch. 1, p. 1-3, Lewis Pub. Boca Raton, FL.
- Meyers, S. M. and J.O. Wolff, 1994. Comparative toxicity of azinphos-methyl to house mice, laboratory mice, deer mice and gray-tailed voles. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 26 (4), 478-482.
- Özmen, M. and A.N. Bozcuk, 1994. Inhibition patterns of brain acetylcholinesterase following exposures to azinphosmethyl in laboratory voles (*Microtus canicaudus*). **Tr. J. Biol.**, 18 (4): 274-281.
- Peakall, D., 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators, Chapman Hall, London, 330 pp.
- Peterson, R.G., 1985. Design and Analysis of Experiments, Marcel Dekker Pub., 429 pp.
- Rattner, B.A. and D.J. Hoffman, 1984. Comparative toxicity of Acephate in laboratory mice, white footed mice and meadow voles. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 13: 483-491.
- Uvarov, B.D., 1966. Grasshoppers and Locusts: A Handbook of General Acridology, Vol. 1, Cambridge University Press, England, 481 pp.