

BİO - ASSAY'IN GAYESİ VE BİO - ASSAY ÇALIŞMALARINA TESİR EDEN BAZI MÜHİM FAKTÖRLER

Kâmile KAZANCIOĞLU

İkinci Dünya Harbinden sonra başta DDT olmak üzere birbirini takiben sentetik organik ilaçların bulunup Zırai Mücadele sahasında geniş ölçüde kullanılmağa başlamasıyla beraber ortaya bazı problemler çıkmıştır. Meselâ.; Bir ilâcın herhangi bir zararlıya karşı en tesirlisini bulmak, tatbikatta iyi netice almak için ne gibi şartlara riayet etmek gerektiğini ve ilaçların sıcak kanlılara ne dereceye kadar toksik olup olmadıklarını araştırmak bu problemlerden bir kaçıdır.

İşte Zırai Mücadele sahasında sentetik ilaçların da geniş ölçüde kullanılmağa başlanmasıyla meydana çıkan bu problemlerin halline cevap verecek bir araştırma kolu Bio-Assay'dır.

İki kelimededen ibaret olan «Bio-Assay» terkibi; bio; hayat, Assay; tahlil mânasında olup her iki kelime bir arada «hayati tahlil» mânasını ifade etmektedir.

Nasıl, kimyevi yol ile ilaçlarda kalitatif ve kantitatif tahliller yapılır ise, bir maddenin fiziki vasıflarını da bazı metodlara dayanılarak fiziki araştırmalar sayesinde bulmak mümkün ise, Bio-Assay'de bazı metod ve usullerle ilaçların biyolojik vasıflarını inceler ve tahlil eder.

Bir ilâcın kimyevi terkininin ve fiziki vasıflarının bilinmesi ilâcın tesirliliği hakkında bize bir fikir vermeye kâfi gelmeyebilir. İşte o zaman ilâc hakkında Bio-Assay yolu ile bir netice çıkarmak mümkün olabilir.

Biyolojik tahliller muhtelif maksatlarla yapılır. O halde Bio-Assay'ın lüzumlu ve faydalı olduğu sahaları şu şekilde sıralayabiliriz.

1) Bir ilâcın tesirli olup olmadığının aranması: Bilhassa ilâc endüstrisinde ilaçlar sentez edilirken önce Bio-Assay yolu ile o ilâcın tesirli olup olmadığı aranır. Buna ön deneme denir. İyi netice alındıktan sonra ilâc daha ince denemelere tabi tutulur.

2) Aktif maddesinin miktarı bilinmeyen veya miktarı tahkik edilmek istenilen her hangi bir ilâcın aktif maddesini bulur.

3) İnsan ve hayvan sağlığı bakımından zırai mücadele ilaçlarının nebatların üzerindeki bakiyelerini tayin eder.

4) Herhangi bir böceğe karşı çeşitli formülasyon tipleri olan zirai mücadele ilaçlarının hangi tipinin daha etkili olup olmadığını araştırır.

5) Zirai mücadelede kullanılan ilaçların en iyi tesir etmesi için ne gibi muhit şartları icap ettiğini tahkik eder.

6) Herhangi bir zararlıya karşı elimizde mevcut ilaçlardan hangisinin daha etkili olduğunu bulur.

Biolojik tahlillerde güdülen gaye hangisi olursa olsun denemelerden iyi netice alabilmek için daima standart şartlarda çalışmak icap etmektedir. Çünkü denemelerin sonunda aşağıdaki bahsedeceğimiz sebeplerden dolayı farklar doğabilir. Binaenaleyh bu farkları ortadan kaldırmak için buna sebep olan faktörleri standart hale getirmemiz şarttır. Aksi halde biyolojik tahlilden sıhhatli bir netice almamız imkânsızdır.

Buna göre biyolojik tahlillerde nazarı itibare alınması icap eden mühim faktörleri şöyle sıralayabiliriz.

I — DENEME HAŞERESİ:

- 1) Türler arasındaki farklılık:
- 2) Test haşeresinin hayat devresi safhaları arasındaki farklılık:
- 3) Yaş:
- 4) Cinsiyet ve vücut büyüklüğü:
- 5) Beslenme:
- 6) Populasyon kesafeti:
- 7) Aynı populasyondan olma keyfiyeti:

II — ISI

III — RUTUBET

IV — IŞIK

Bunları ayrı ayrı inceleyelim:

I — DENEME HAŞERESİ

- 1) Türler arasındaki farklılık:

Denemelerde kullanılacak haşerenin daima aynı türden olması lazımdır. Meselâ kullanacağımız test haşeresi *Tribolium* cinsinden ise denememizde yalnız bunun bir türünü kullanmamız icap eder. Ya sadece *T. Castaneum* veya *T. Confisum* kullanılmalıdır. Çünkü farklı türler ilaçlara karşı farklı reaksiyon gösterirler.

- 2) Test haşeresinin hayat devresi safhaları arasındaki farklılık:

Biliyoruzki her böcek hayat devresini tamamlayıncaya kadar bazı safhalar geçirir. Bir kısım böceklerde yumurta, larf, pup ve ergin, bir kısmında ise yumurta nymph ve ergin olmak üzere hayat devrelerini tamamlarlar. Böcek bu safhalarında ilaçlara karşı çeşitli mukavemetler gösterir. İlaçlara karşı böceklerin en mukavim oldukları devre pup devresidir. Sonra yumurta devresi gelir. En hassas devre ise larf ve nymph devresidir. Bu devrelerde yine kendi içlerinde ilaçlara karşı farklı mukavemetler gösterirler. Bir larfı ele alacak olursak, larf yumurtadan çıktığından itibaren pup oluncaya kadar muhtelif gömlekler değiştirir ve bu suretle büyümesini temin eder. Bu gömlek değiştirme esnasında larfın bünyesinde anato-

mik, fizyolojik ve vücut büyüklüğü itibariyle değişiklikler olur. Bu bakımdan larfın gömlek değiştirmesinin ilk günlerinde ilâçlara karşı mukavemeti daha azdır. Kütikül tabakası sertleştikçe mukavemet artar. Bu itibarla Bio-Assayda kullanılacak böceğin belirli bir devrede olması lâzım geldiği gibi aynı devre içinde de aynı yaşta olması icap etmektedir.

Meselâ: *Agrotis ypsilon* larflarının Bio-Assayda dördüncü gömleğin 8. ve 9. günlerinde kullanılması Harris, Beyg ve Mazurek tarafından tesbit edilmiştir.

3) Yaş:

Umumiyetle böcekler genç iken ilâçlara karşı daha hassas, ömürlerinin ortalarına doğru mukavim, sonlarına doğru yaşlandıkça yine hassaslaşırlar. İlâçlamalarda en iyi netice böceğin ilâca uzun müddet aynı mukavemeti gösterdiği devredir. Bu devre umumiyetle böceğin hayatının ortalarına raslar. R. W. Keer (1954) tarafından muhtelif yaşlardaki *Drosophila melanogaster* lar ile yapılan denemenin (Tablo I) tetkikinde yaş ile ilâç arasındaki münasebeti açıkça görebiliriz. (Tablo I) de erkek sinek üzerine yapılan ilâçlama incelenecek olursa; böceğin beş yaşında ilâca en mukavim, ilk yaşlarda ve sonraları ise hassas olduğu görülmektedir. Dişi üzerine yapılan denemede ise ilâca karşı böcekteki mukavemetin dokuz yaşına kadar devam ettiği müşahede edilmektedir. Bunu şöyle izah edebiliriz; dişiler umumiyetle erkeklere nazaran daha uzun ömürlü olurlar şayet bu deneme daha yaşlı dişiler üzerinde devam ettirilmiş olaydı yaş yükseldikçe dişilerde de mukavemetin azaldığı görülecekti.

DDT nin Topical metod ile muhtelif konsantrasyonlarının değişik yaşlardaki *Drosophyla melanogaster* larlarında sebep olduğu ölümler

Sex	Yaş (gün)	Doz	24 saatte alınan % ölüm			
			Test I	Test II	Test III	ortalama
♂	1	0,01 µ 1 % 25 lık	80	90	100	90
	3	DDT Solisyonu (= 0,025 mgr DDT)	60	40	80	60
	5		40	20	40	33
	7		60	80	90	77
	9		90	70	100	87
♀	1		0,014 µ 1 % 25 lık	100	100	100
	3	DDT Solisyonu (= 0,025 mgr DDT)	20	30	10	20
	5		10	10	20	13
	7		20	20	30	23
	9		0	0	54,5*	18
*) Denemede, bir fazla sinek kullanılmış						

4) Cinsiyet ve vücut büyüklüğü :

Böceklerde ilâca hassasiyet bakımından cinsiyetin de oldukça mühim rolü vardır. Bilhassa erkekler dişilere nazaran daha hassastır. Vücut büyüklüğü arttıkça ilâca karşı mukavemetde artar. Bu böceğin cinsine ve ilâca arzetme şekline göre de değişir. Triboliumlar erkek ve dişi arasında büyük bir fark göstermez. Fakat Drosophyla melanogasterlerde bu fark mühimdir. Tablo I de görüldüğü üzere dişi sineklerde ilâcın dozu da fazla tutulduğu halde erkek sineklerdeki ölü nisbetinin dişilere nazaran daha yüksek olduğu görülmektedir.

İlâca karşı dişi ve erkeği farklı mukavemetler gösteren haşereler Bio-Assayde kullanılırken daima aynı cinsiyette olanların seçilmesi icap etmektedir.

5) Beslenme :

Böceklerin ilâçlara karşı mukavemetinde gıdanın, miktarı ve cinsi bakımından iki türlü tesiri olabilir. Gıda, üzerinde yetiştirilen böceklerin vücut büyüklüklerine ve yaşama kapasitelerine tesir eder. Bunun için Bio-Assay de kullanılan böcekler aynı cins ve aynı miktar gıda ile beslenmektedir.

İlâca arzedildiği güne kadar beslenen böceklerle denemeden bir kaç gün önce aç bırakılan böcekler arasında ilâca mukavemet bakımından farklılıklar görülmüştür. Markos, B,G ve Campbell, F,L. (1943) Prodenia eridania larfları üzerine yaptıkları denemede larflar 6. gömleğe kadar altı değişik nebat üzerinde beslenmişler ve calcium arsenata arzedildiklerinde her gurubun ilâca karşı farklı mukavemetler gösterdikleri görülmüştür. Kırmızı örümcek (Tetranychus urticae) selenium'a arzedildiğinde güllerde beslendiği zaman, fasulyede beslenmelerine nazaran daha mukavim, domateslerde beslendiklerinde ise çok hassas oldukları Neiswander, C. R. (1950) tarafından müşahede edilmiştir.

6) Populasyon kesafeti :

Populasyon kesafeti böceklerde ilâca karşı hassasiyete direkt olarak tesir etmez. Her hangi bir gıda vasatı üzerinde beslenen böcek kesafeti arttıkça böceklerin vücut büyüklüklerinin normalden küçük olduğu görülür. Bir nebat üzerinde populasyon kesafeti yüksek olan zararlıyı öldürmek daha kolaydır. Meselâ: Üzerinde çok miktarda koşnil bulunan Narenciye meyvelerinde ağır bulaşma dolayısıyla pörsümüş hale gelen meyvalardaki koşnillerin hydrogen cyanide ile kolayca öldükleri Yust, H. R ve Howard (1942) tarafından tesbit edilmiştir.

7) Aynı populasyondan olma keyfiyeti :

Böcek yetiştirme sırasında hernekadar harici faktörleri ayarlıyorsakda her böceğin kendine has bir şahsiyeti de vardır. Bu fark ayrı populasyonlardan gelme ebeveynlerden olan döllerde daha çok göze çarpar. Halbuki bir ana ve babadan meydana gelen döllerin teşkil ettiği populasyondaki farklılık daha azdır. Binaenaleyh Bio-Assay de kullanacağımız test haşerelerini aynı ana ve babadan elde etmemiz ideal bir çalışma şeklidir.

II — ISI :

Isı, Bio-Assayde iki kısımda mütalâa edilebilir.

A) Böceğin yetiştirilmesi esnasındaki ısı :

B) İlâç ile böceğin münasebeti esnasındaki ısı :

A) Laboratuvarda deneme böceklerinin yetiştirilmesi sırasındaki ısı gayet mühimdir. Isı böcekler üzerinde mühim faktör olmasına rağmen kontrolü mümkün olduğundan Bio-Assay çalışmalarında bir problem teşkil etmez. Muhtelif aletler vasıtasıyla istenilen ısıyı temin etmek mümkündür. Böceklerin yetiştirilmelerinde en ideal ısıyı bulmak için onların biyolojilerinin iyi bilinmesi lâzımdır. Normal hararet hudutları içinde yetişen her hangi bir böcek bu hudutların içindeki azami ısıda yetiştikleri zaman vücut büyüklükleri daha küçük ve ilâçlara karşıda daha hassas olabilirler.

Kısa zamanda haşere yetiştirmeyi temin etmek için harareti yüksek tutmak icap eder. Fakat bu harareti yükseltirken haşerenin yetişmesine menfi tesir eden bir hudut vardır ki o hududu geçmemek lâzımdır.

Meselâ : *Ephestia kühniella* 25-26°C da iyi yetiştiği halde hararet daha yükseldiği zaman *Ephestialar* tamamen steril hale gelirler.

Jonisch, E (1935) tarafından tahtakuruları (*Cimex lectularius*) ile yapılan denemede haşere 32°C da muhafaza edildiğinde gömlek değişmelerinde bazı uzamalar ve muhtelif değişiklikler tesiriyle ölüm nisbetinin arttığı, ve diğer şartlar mevcut olduğu halde ısı 34°C da çıkarıldığında dört beş nesil sonra popülasyonun tamamen ortadan kalktığı müşahede edilmiştir.

B) İlâç ile böceğin münasebeti esnasındaki ısı :

İlâca arzedilen böcek ile ısı arasındaki münasebetin üç safhada incelenmesi uygun olur.

a) Böcekler ilâca arzedilmeden evvelki ısı :

Böcekler denemeye hazırlanırken meydana gelen ısı farklarının tesiri, denemenin diğer safhalarında görülür. Böcek ilâca arzedilmeden evvel hazırlık safhasındaki ısı 1-24 saat içinde yapılan denemelerde çok mühim rol oynamaz.

Muson tarafından (1953) *Blatella germanica*'lar üzerinde enjeksiyon ve damlatma metodları ile DDT tatbik edildikten sonra denemeden evvel yüksek ısıda (34°C) sakladıklarının düşük ısıda (17°C) sakladıklarına nazaran daha az mukavim oldukları müşahede edilmiştir. Ancak mukavemetin azalması için *Blatellaların* düşük ısıda uzun bir müddet bekletilmeleri icap etmiştir. Araştırmacı bunları ilâç tatbik etmeden evvel 2-8 hafta gibi bir zaman müddetince bekletmiştir.

b) Deneme esnasındaki ısı :

Böceğe tatbik edilen ilâç böcek tarafından teneffüs ve mide yoluyla veya kütikül vasıtasıyla veyahutda farklı miktarlarda her üç şekilde vücuduna alınır. Isı; zehirin difizyon, absorpsiyon ve kısmende zehirlenme ameliyelerine tesir eder. İlâç ile böceğin teması esnasında ısının değişmesi, ilâcın tatbik şekline, formülasyon çeşidine ve böcek cinsine tabi olarak farklılıklar meydana gelmesine sebep olur.

İlâç buhar halinde iken ısı arttıkça ilâcın böcek vücuduna absorbe olması azalır. Halbuki kütikülden geçmesi mevzubahis olan katı insektisitlerin, sıcaklık arttıkça böceğe nüfuzu umumiyetle artmaktadır.

Calandra oryzae'ye karşı HCN gazı 30°C da 20°C dakinden üçte bir nisbetinde daha az tesirli olduğu Carpenter, E.L Moore, W (1938) tara-

ından tespit edilmiştir. Diğer taraftan, katı olarak DDT Blatella'lara 35°C da arzedildiğinde 15°C da arzedilmiş olana nazaran 2-2,5 defa daha çok nüfuz ettiği Vinson, E.B ve Kearns C. W (1947) tarafından müşahede edilmiştir.

Bu misallerde de görüldüğü gibi; ısı'nın artması veya azalması ile insektisidin böceğin bünyesine girmesi arasında bir münasebet vardır. Umumiyetle böcek ilâç ile temas ettiği zaman ısının artması zehirlenmenin sü-ratini arttırdığı görülmüştür. Fakat bu henüz münakaşalı bir mevzudur. Yüksek ısıda zehirin vücuda yayılması daha çabuk olabilir ve vücuda giren zehir kristallerinin kan ve nesigelerde erimesi ile hareket arasında müsbet bir orantı olduğu umumiyetle kabul edilmektedir.

C) Denemeden sonraki ısı:

Denemelerden sonraki ısı ilâcın böcek içinde akümüle olmasına, zehirlenme ameliyesine ve ilâcın dekompose olmasına tesir eder.

A. H. Mc Intosh (1957) tarafından yapılan araştırmalar neticesin-de insektisitlerin böceğe arzedildikten sonraki ısı ile yüzde ölüm nisbeti ara-sında negatif veya pozitif bir münasebet olduğu tespit edilmiştir. Yani yük-sek ısıda ilâcın verdiği yüzde ölüm nisbeti yüksek ise o ilâç ile ısı arasında pozitif bir münasebet, alçak ısıda ilâcın verdiği yüzde ölüm nisbeti yüksek ise o ilâç ile ısı arasında negatif bir münasebet vardır.

Araştırmacı, DDT nin negatif bir öldürme emsali olduğunu bulmuş-tur. Triboliumları DDT ile temas ettirdikten sonra böcekleri başka ye-re alıp değişik ısılarda muhafaza etmiş, neticede alçak ısıdaki ölüm nis-betinin daha fazla olduğunu müşahede etmiştir. Aynı denemeyi tekrar et-miş, bu defa böcekleri değişik ısılarda ilâca arzetmiş, fakat muameleden sonra böcekleri aynı ısıda saklamış, neticede, muamele esnasında yüksek ısıdaki böceklerde ölüm nisbetinin yüksek olduğunu görmüştür. İkinci de-nemede bu pozitif görünme keyfiyeti yüksek ısıda böceklerin daha aktif ol-maları hasebiyle üzerlerine fazla dozda ilâç almalarından ileri gelmektedir. Araştırmacı bazı denemeler yaparak ilâcın tatbikinden sonraki ısı değişikliği ile husule gelen böcek ölüm nisbetinin; kullanılan ilâcın cinsine, fizikî durumu-na ve dozuna, ilâçlama metoduna, haşerenin cinsine, suhnet hududuna (range) ve reaksiyon zamanına da (ilâcın tatbik edildiği zamandan sayımın yapıldığı ana kadar geçen zaman) tabi olduğu neticesine varmıştır.

III — RUTUBET:

Böcek ile rutubet arasındaki münasebeti iki safhada mütalâa edebiliriz.

A) Deneme böceklerinin yetiştirilmesinde lüzumlu olan rutubet:

B) Böceğin ilâç ile münasebeti esnasındaki rutubet:

A) Deneme böceklerinin yetiştirilmesindeki rutubet çok mühim-dir. Çünkü her böceğin yaşaması ve üremesi için istediği optimum bir rutu-bet vardır. Rutubetin ayarlanması aynen ısıda olduğu gibi böceğin biolo-jisini bilmekle mümkündür. Bazı böcekler yetişmeleri sırasında fazla rutu-bete ihtiyaç gösterirler. Böcekler yetiştirildikleri esnada istedikleri rutubeti

bulamazlarsa hayat devrelerini tamamlamaları zorlaşacağı gibi hayat kapasiteleride zayıflıyacağından ilâçlara karşıda hassas olurlar.

B) Böceğin ilâçla münasebeti esnasındaki rutubet:

Rutubetin, ilâçların toksisitelerine tesiri umumî olarak izah edilememiştir ve münakaşalı bir mevzudur. Çünkü rutubetin tesirini denemeler sırasında, yalnız böcek üzerine mi yoksa insektisit üzerine mi veyahut her ikisine de mi tesir ettiğini tespit etmek imkânsızdır.

Şurası muhakkaktır ki denemeler sırasında böcek ile ilâcın temas zamanı kısa ise rutubet çok önemli değildir. Fakat denemelerden sonra böceklerin muhafaza edildikleri rutubet önemlidir.

Tribolium castaneum kuru film metodu ile DDT ye arzedildikten sonra % 84 nisbi rutubette muhafaza edildiğinde % 30-50 nisbi rutubette muhafaza edilmesine nazaran daha hassas olduğu Prathan (1952). tarafından müşahede edilmiştir. Aynı araştırmacı (1949) *Plutella maculipennis* larvalarını DDT ye arzettiğinde yüksek rutubetlerde ilâcın toksisitesinin arttığını, fakat aynı larvalar DNOC un filmine arzedildiğinde ise düşük rutubetlerde ilâca karşı daha çok hassasiyet gösterdiklerini tespit etmiştir. Bu misallerde de görüldüğü üzere rutubetin ilâçla olan münasebeti hususunda kesin bir fikir vermek mümkün değildir.

IV — IŞIK :

Işık kesafeti muhtemelen bir çok böceklerin hareketine esir eder. Bu ya direkt olarak metalolizmada kendini gösterir veya indirekt olarak ilâçlanmış bir muhitte böceğin hareketi suretiyle üzerine ilâç almasında rolü görülür. Bu iki faktörde aynı anda varft olabilir.

Ev sinekleri (*Musca domestica*) ile yapılan denemelerde sineklerin DDT bakiyelerine ışıkta arz edildiklerinde karanlıkta arzedildiklerine nazaran daha hassas oldukları Kettle (1949) ve Kunkel (1950) tarafından müşahede edilmiştir.

Buraya kadar Bio-Assay çalışmalarında iyi bir netice alabilmek için ne gibi faktörler üzerinde durmamız lâzım geldiğini gördük. Bunlara bir de şunu ilâve edebiliriz ki iyi bir deneme yapabilmek için denemeyi önceden iyi plânlamak ve en uygun deneme metodunu seçmemiz icap etmektedir.

SUMMARY

Object of Bio-Assay and some important factors affecting Bio-Assay work:

There are definite and indefinite sytoms of toxic effect. Under the influence of chemicals, population may increase, inhibition of growth organisms may occur.

The effect of chemical may be varied on different species because:

- 1 — Variation between species
- 2 — » » stages
- 3 — » » sex'es

4 — Variation due to differences of environment before, during and after treatment.

5 — Variation in dose received by each individual organisms.

In order to get a correct dose-mortality count, we must overcome above mentioned difficulties,

1 — Use populations not individuals

2 — Use one species for each experiment

3 — Regulate stage and age

4 — Use one sex if possible

5 — Employ controlled laboratory conditions (temperature, Relative humidity and light) or make allowance for these variations in your design.

6 — Design proper apparatus.

L I T E R A T Ü R

1 — BUSVINE. J. R. (1957) — A critical review of the techniques for testing insecticides the eastern press. Ltd. London and Reading.

2 — HARRIS C. R. BEEG. J. A. AND MAZUREK J. H. — A laboratory method of mass rearing the black cutworm, *Agrotis ypsilon* (rot) for insecticides tests the Canadian entomologist volum exc, Number 6. June 1958.

3 — KERR. R. W. (1954) ENTOMOLOGICAL RESEARCH — Variation with age in the susceptibility to DDT and the respiration rate of male and female *Drosophila melanogaster* mg. Vol: 45 Part 2. June 1954.

4 — PETERSON. A. (1955) — A. Manual of entomological techniques Edward brothers Inc. Ann Arbor, Michigan U.S.A.

5 — SHEPARD, H.H. (1958) — Methods of testing chemical on insects, Burgess Publishing Com. 426 So. 6 tr St. Minneapolis 15 Minn.