

Araştırma Makalesi /Research Article

Karbaril'in Tatlı Su İstakozu (*Astacus leptodactylus*) Hemolemf Biyokimya Parametrelerine Etkisinin Belirlenmesi

Determination of Carbaryl on Hemolymph Biochemical Parameters of Narrow Clawed Crayfish (*Astacus leptodactylus*)

Aysel Çağlan GÜNAL¹, Aylin SEPİCİ DİNÇEL²

¹Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Ana Bilim Dalı, Ankara

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ankara

Öz

Amaç: Bu çalışmada, karbamatlı pestisitlerden karbarilin subletal konsantrasyonlarının sucul ekosistemde yaşayan ve hedef olmayan organizmalardan tatlı su istakozu (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz 1823)'larında hemolemf biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Tatlı su istakozları intermoult döneminde ve av sezonunda balıkçılardan temin edilmiş ve laboratuvar ortamına adaptasyonları sağlanmıştır. 96 saat süre ile 0.1 ve 0.2 mg/L karbaril maruziyeti sonrası hemolemf numuneleri alınmıştır. Hemolemf glukoz, toplam protein, sodyum (meq/L), potasyum (meq/L), klorür (meq/L) ve laktik asit (mmol/L) parametreleri Roche P800 modülünde ticari kitlerle analiz edilmiştir. İstatistik değerlendirmesi One Way ANOVA ile yapılmıştır.

Bulgular: 96 saat süre ile 0.1 ve 0.2 mg/L karbarile maruz kalan tatlı su istakozlarının hemolemf glukoz, sodyum, potasyum ve laktik asit değerlerinin istatistik olarak önemli düzeyde arttığı saptanmıştır (p<0.05). Toplam hemolemf protein seviyeleri ve klorür değerleri kontrol grubuna göre değişmemiştir.

Sonuç: Düşük dozlarda ve kısa süre ile karbarile maruz kalan sucul omurgasız organizmaların hemolemf biyokimya değerlerinin etkilendiği saptanmıştır. Sucul ekosistemlere pestisitlerin ulaşımının engellenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Karbamat, karbaril, tatlı su istakozu, *Astacus leptodactylus*, hemolemf

Abstract

Objective: In the present study, it was aimed to investigate the effects of sublethal concentrations of carbamate pesticides on hemolymph biochemical parameters of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz 1823), non-target organisms living in the aquatic ecosystem.

Material and methods: Freshwater crayfish were obtained from fishermen during the intermoult period and fishing season and adapted to the laboratory environment. Hemolymph samples were taken after exposure to 0.1 and 0.2 mg/L carbaryl for 96 hours. Hemolymph glucose, total protein, sodium (meq/L), potassium (meq/L), chloride (meq/L) and lactic acid (mmol/L) parameters were analyzed with commercial kits in the Roche P800 module. Statistical evaluations were carried out with One Way ANOVA.

Results: Freshwater crayfish exposed to 0.1 and 0.2 mg/L carbaryl for 96 hours were found to have significantly increased hemolymph glucose, sodium, potassium and lactic acid values (p<0.05). The total hemolymph protein and chloride levels were not changed compared to control group.

Conclusion: The hemolymph biochemistry values of aquatic organisms exposed to carbaryl were affected in even low doses and for a short period of time. It is important to prevention of the pesticides to reach to the aquatic ecosystems.

Key Words: Carbamate, carbaryl, freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*, hemolymph biochemistry parameters

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Aysel Çağlan GÜNAL  <https://orcid.org/0000-0002-9072-543X>
Email: caglangunal@gazi.edu.tr

Aylin SEPİCİ DİNÇEL  <https://orcid.org/0000-0001-5847-0556>

GİRİŞ

Karbamatlı pestisitler, insektisit ve fungusit olarak tarımsal mücadelede yaygın kullanılan maddelerdir. Yapılan çalışmalar karbamatların çevrede çok uzun süre kalmadıkları ve biyoakümülyasyona uğramadıklarını göstermektedir. Ancak diğer pestisit gruplarında olduğu gibi karbamatlı pestisitlerde yağmur suları, drenaj suları, yüzey akışları ve sulama sularına karışarak topraktan emilebilmekte ve sucul ekosistemlere bulaşabilmektedir. Karbaril (1-naphthyl N-methylcarbamate) turuncgiller, pamuk, meyve, fındık, ceviz, süs bitkileri, koyu renkli ağaçlar, çimler ve ekinlerde, ayrıca bunlarda olduğu kadar kümes hayvanları, çiftlik hayvanları ve evde beslenen hayvanlar üzerindeki yuzu aşkın çeşitteki böceklerin kontrolünde kullanılan geniş spektrumlu bir karbamat grubu pestisitir¹.

Avrupa'da Türk tatlı su ıstakozu olarak da bilinen *Astacus (Pontastacus) leptodactylus*, ülkemiz doğal sularında bulunan tek tatlı su ıstakozu türüdür. İntensif, yarı-intensif ve ekstansif yetiştiriciliği yapılabilen bu türün ülkemizde bulunan göllerin çoğunda saptandığı bilinmekte olup, çoğunlukla avcılık yoluyla elde edilmektedir². 1984 yılına kadar en önemli ihraç ürünlerimiz arasında yer alan tatlı su ıstakozlarının, o dönemde çıkan etkeni *Aphanomyces astaci*³ olan mantar hastalığının yarattığı toplu ölümler sonucu soyları tükenmeye yüz tutmuştur⁴. Bu nedenlerle ülkemizde ve dünyada tatlı su ıstakozu türümüz üzerinde yapılan çalışmalar daha çok yetiştiricilik olanakları ve ıstakoz vebası başta olmak üzere hastalıklarının incelenmesi üzerine olmuştur. Günümüzde göller gibi birçok su kaynağımızda kendisini yenilemiş olan tatlı su ıstakozları yine ülkemiz için üretimi ve ihracatı yapılabilecek potansiyel türler arasında yer almakta; dolayısıyla da ekonomik öneme sahiptir. Ayrıca tatlı su kaynaklarında ekotoksikolojik açıdan indikatör ve standart test organizması kabul edilmektedir. Ancak günümüzde birim alandan daha fazla ürün elde etmek için tarımsal mücadelede kullanılan kimyasalların artması, hedef olmayan canlılar üzerine potansiyel olumsuz etkiler konusunda endişe duyulması konusunu gündeme taşımaktadır.

Tatlı su ıstakozları sucul ekosistemde dipte beslenmesi, besin zincirindeki önemi, EPA ve OECD gibi uluslararası kuruluşlar tarafından standart test organizması olması yönüyle ekotoksikolojik çalışmalarda tercih edilmektedir⁴.

Yapılan literatür taramasında Karbaril'in tatlı su ıstakozlarının (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) hemolemf parametrelerine etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada OECD tarafından toksisite deneylerinde standart türler arasında bulunan akuatik invertebratlardan tatlı su ıstakozunda (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) karbamatlı pestisit olan Karbaril'in subletal konsantrasyonlarının hemolemf glukoz, toplam protein, sodyum (meq/L), potasyum (meq/L), klorür (meq/L) ve laktik asit (mmol/L) parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tatlı su ıstakozlarının temini ve adaptasyonu

Tatlı su ıstakozları *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz,1823) intermoult döneminde ve av sezonunda balıkçılardan temin edilmiştir. Kullanılan tatlı su ıstakozlarının ortalama boyu 11.72±0.78 cm, ağırlığı 36.68±6.14 g'dır. Tatlı su ıstakozları deneye başlanmadan önce bir ay akvaryumda adaptasyon dönemine tabi tutulmuştur. Bu dönemde tatlı su ıstakozları, dinlendirilmiş çeşme suyu bulunan akvaryumlarda stoklanarak, günlük olarak taze alabalık ile beslenmiş, saklanmaları için borular yerleştirilmiş ve akvaryumları sürekli havalandırılmıştır.

Pestisit çözeltilerinin hazırlanması

Deneyler de kullanılan pestisit madde, Hacettepe Üniversitesi İnkite Test Ünitesinden temin edilmiştir. Karbaril stok çözeltilerini hazırlamak için, katı haldeki madde tartılarak; volumetrik cam balon jode belirli hacime analitik saflıkta DMSO ile tamamlanarak elde edilmiştir. Stok ve doz çözeltileri kullanılabilecek kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Deneyin Gerçekleştirilmesi

Adaptasyon periyodundan sonra tatlı su ıstakozları 96 saat süre ile 0.1 ve 0.2 mg/L karbaril maruz ve bir kontrol grubu kullanılmıştır. Sudaki karbaril konsantrasyonunun sabit kalması için deney

ortamı 48 saat aralıklarla yenilenmiştir. 96 saat sonunda tatlı su ıstakozlarının ikinci yürüme bacağından hemolemf numuneleri steril enjektörlerle alınmıştır. Numuneler, analizler yapılana kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

Biyokimyasal analizler

Hemolemf biyokimyasal analizleri, Roche P800 Modül ve kitleri kullanılarak; glukoz (mg/dL), toplam protein (g/dL), sodyum (meq/L), potasyum (meq/L), klorür (meq/L) ve laktik asit (mmol/L) analizleri yapılmıştır.

İstatistik Değerlendirme

Deney sonuçları Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve TUKEY Kramer testi yapılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Karbarile maruz kalan tatlı su ıstakozlarının ortalama hemolemf glukoz (mg/dL), toplam protein (g/dL), sodyum (meq/L), potasyum (meq/L), klorür (meq/L) ve laktik asit (mmol/L) değerleri Tablo 1. de gösterilmektedir.

Tablo 1. Karbarile (CB) maruz kalan tatlı su ıstakozlarının hemolemf parametreleri

Hemolemf Parametresi	Kontrol	0.1 mg/L CB	0.2 mg/L CB
Glukoz (mg/dL)	22.00±0.71 ^a	58.00±0.37 ^b	63.60±0.51 ^b
T.Proteini (g/dL)	2.26±0.25	2.20±0.37	2.17±1.58
Sodyum (meq/L)	177.60±6.39 ^a	178.67±2.08 ^a	187.75±4.03 ^b
Potasyum (meq/L)	3.73±0.15 ^a	4.37±0.02 ^b	4.57±0.17 ^b
Klorür (mmol/L)	189.17±7.22	200.40±6.79	192.5±2.93
Laktik Asit (meq/L)	0.29±0.06 ^a	0.35±0.09 ^b	0.63±0.18 ^b

*Aynı satırda küçük harfler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir (p<0.05)

TARTIŞMA

Bu çalışmada, karbamatlı pestisitlerden karbarilin subletal konsantrasyonlarının sucul ekosistemde yaşayan ve hedef olmayan organizmalardan tatlı su ıstakozu (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz 1823)'larında hemolemf biyokimyasal etkilerinin araştırılmış ve 96 saat süre ile 0.1 ve 0.2 mg/L karbarile maruz kalan tatlı su ıstakozlarının hemolemf glukoz, sodyum, potasyum ve laktik asit değerlerinin istatistik olarak önemli düzeyde arttığı saptanmıştır (p<0.05). Toplam hemolemf protein seviyeleri ve klorür değerleri kontrol grubuna göre değişmemiştir.

Hemolemf biyokimya parametreleri, omurgasız canlılarda hastalık, toksik madde maruziyeti gibi etkenler sonucu oluşabilecek etkilerin incelenerek patofizyolojik durumun ortaya konmasında indikatör olarak kullanılabilir. Omurgalı canlılarda kan parametrelerinin etkilendiği tüm çevresel (sıcaklık, fotoperiyot, salinite, amonyak, yoğun stoklama vb.), fizyolojik (üreme siklusu, yaş, beslenme, cinsiyet vb.) ve sosyal faktörler omurgasızların kan sıvısı olan hemolemf etkilemektedir. Çalışma bulguları da bu savı destekler niteliktedir.

Bu çalışmada her iki konsantrasyonda karbarile maruz kalan tatlı su ıstakozlarının hemolemf glukoz seviyelerinde kontrol grubuna göre artış saptanmıştır. Hiperglisemi oluşumu çeşitli stres parametrelerine maruz kalan birçok krustaselerde gözlenmiştir⁵. Hemolemf glukoz regülasyonu, krustaselerde hiperglisemik hormonun salgılanması ile ayarlanır. Glikojen depolarının tükenmesine hemolemf glikoz içeriğinde bir artış eşlik eder². Elektrolit değerleri, çevreden gelen dış etkiler için indikatör olarak kullanılabilir^{6,7}. Hemolemf elektrolit parametreleri çevresel izlemede krustacea sağlığı için göstergelerdir⁸. Bu çalışmada hemolemf sodyum ve potasyum değerleri kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli düzeyde artarken, hemolemf klorür düzeyleri değişmemiştir. Chang vd. trichlorfona maruz kalan karideslerde Hemolemf sodyum değerinin ise kontrol gruplarını göre azaldığını saptamışlardır⁹. Jensen, yaptığı çalışmada *Astacus astacus* cinsi ıstakozlar 7 gün boyunca 0.08 mM çevresel nitrite maruz bırakıldıktan sonra hemolemf sodyum oranında az miktarda düşüş olduğunu gözlemlemiştir¹⁰. Hemolemf sodyum değerleri, farklı maddelerde bulgularımıza zıt olarak azaldığı yönde bir yanıt oluşturmuştur.

Bu çalışmada hemolemf laktik asit düzeyleri 96 saat süre ile 0.2 mg/L karbarile maruz kalma sonucunda artmıştır. Laktat, dekapodlarda anaerobik glikolizin ana ürünü olarak, genellikle glikozla paralel olarak ancak daha yavaş bir hızda artmaktadır¹¹. Glukogenez, hemolemf laktat konsantrasyonunun düzenlenmesine katkıda bulunan bir yoldur¹². Çalışma sonuçları, farklı stresörlere maruz kalan çeşitli krustacealara benzerdir. Bhavan ve Geraldine, 21 gün boyunca endosulfan (10.6, 16.0 ve 32.0

ng/L) maruz kaldıktan sonra *Macrobrachium malcolmsonii*'de hemolemf laktat düzeyinin arttığını¹³, Xuan vd., kadmiyuma maruz kalan yengeç türü olan *Sinopotamon yangtsekiense* de yüksek hemolemf laktat düzeyleri bildirmiştir¹⁴.

SONUÇ

Çalışma sonuçları, düşük dozlarda ve kısa süre ile karbarile maruz kalan sucul omurgasız organizmaların hemolemf biyokimya değerlerinin etkilendiği saptanmıştır. Pestisit uygulamalarında denetimlerinin iyi yapılmasının önemi ve sucul ekosistemlere ulaşımının engellenmesi gerekmektedir.

Etik Onay:-

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: -

Ethical Approval:-

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest

Financial Support: -

KAYNAKLAR

1. Vioque-Fernandez, A., De Almeida, E.A. Lopez-Barea, J., Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions". *Biomarkers*, 2009;14, 299-310. DOI: 10.1080/1354750090291321.
2. Benli ACK. The influence of etofenprox on narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823): Acute toxicity and sublethal effects on histology, hemolymph parameters, and total hemocyte counts. *Environ Toxicol*. 2015; 8;30(8):887-94. doi: 10.1002/tox.21963.
3. Kokko, H., Koistinen, L. Harlioğlu, M.M., Makkonen, J. Aydın H., Jussila J., Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst.*, 404 (2012) 12. DOI: <https://doi.org/10.1051/kmae/2012006>.
4. Harlioğlu AG, Harlioğlu MM. The status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz) Fisheries in Turkey. *Rev Fish Sci*. 2009; 17(2):187-189. DOI:10.1080/10641260802645311.
5. Siddiqui, M. I., Al-Khalifa M. S. Review of haemocyte count, responseto chemicals, phagocytosis, encapsulation and metamorphosis in insects, *Italian Journal of Zoology*, 2014; 81:1, 2-15, DOI: 10.1080/11250003.2013.858780.
6. Schippers, C., Rojas-Ulloa, J. B., Booms, G. H. R., Machiels, M. A. M., Verdegem, M. C. J. and Boon, J. H., A dietary effect on some cellular and humoral blood parameters of

rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture and Fisheries Management*, 1994; 25, 649-657

7. Yıldız, H. Y., Pulatsu, S. and Kurtoglu, F. Baseline haematological and serological parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Science Papers and Reports*, 15 (4), 213-217. (1997)
8. Noga EJ (2000) Hemolymph biomarkers of Crustacean health, in: Fingerma, R., Nagabhushanam., R. (Eds.), *Immunobiology and Pathology*, 5. Science Publishers Inc., NH, pp. 125-163.
9. Chang C.C., Lee P.P., Hsu J.P., Yeh S.P., Cheng W., Survival and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. *Aquaculture*. 2006; 253 (1-4), 653-666. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.011.
10. Jensen, F.B., Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status and haemolymph acid-base balance and gas transport, *Aquatic Toxicology*, 1990; 18, 51-60. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90035-N](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90035-N)
11. Hill, A.D., Strang, R.H.C., Taylor, A.C., Radioisotope studies of the energy metabolism of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and recovery. *J. of Experimental Marine Biol. and Ecology*, 1991; 150, 51-62. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90104-5).
12. Maciel, J.E., Souza, F., Valle, S., Kucharski, L.C., da Silva, R.S., Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 2008; 151, 61-65. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.05.178.
13. Bhavan, P. S., Geraldine P., Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat. Toxicol*. 2000; 50, 331-339. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00096-5).
14. Xuan, R., Wang, L., Sun, M., Ren, G., Jiang, M., Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolisms in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C*. 2011; 154 ,268-274. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2068-0>