



Araştırma Makalesi /Research Article

Tetramethrin'in Tatlı Su Midyelerinde Akut Toksik Etkilerinin Belirlenmesi Determination of Acute Toxic Effects of Tetramethrin in Freshwater Mussels

Yasemin Aktaş¹, Pınar Arslan^{1*}

^{*1} Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye

Öz

Organofosfat, organoklor ve karbamat türevli pestisitlerin ekosistem sağlığı için zararlı etkilerinin anlaşılmasından sonra birçok pestisit türevleri geliştirilmiştir. Bu pestisitlerden biri olan sentetik piretroitler, *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinden elde edilen piretrin maddesinden üretilmektedir. Sentetik piretroitler, tarımsal ve evsel alanda böceklerle karşı kullanılan insektisitlerdendir. Kullanım alanlarının yaygın olmasından dolayı karasal ve sucul ekosisteme karışım gösterirler. Bu nedenle, bu ekosistemlerdeki hedef dışı türler üzerinde etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada, sentetik piretroitlerden biri olan tetramethrinin hedef dışı türler üzerindeki etkisi sucul ekosistem türlerinden biri olan tatlı su midyeleri *Unio delicatus* üzerinde incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında farklı tetramethrin konsantrasyonlarına maruz bırakılan tatlı su midyelerinde 96 saatlik ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değeri belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise midyeler, LC₅₀ değerinin ¹/₁₀ ve ¹/₁₀₀ konsantrasyonlarına 24 ve 96 saat boyunca maruz bırakılarak tetramethrinin etkisi toplam hemosit sayısının incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre tetramethrinin 96 saatlik LC₅₀ değeri tatlı su midyeleri için %95 güven aralığında 8.62 mg/L (6.4183 mg/L -11.4167 mg/L) bulunmuştur. Tetramethrin uygulanan gruplardaki toplam hemosit sayısı sonuçları kontrol gruplarına göre anlamlı bir düşüş göstermiştir (p<0,05). Bu sonuçlara göre, tetramethrinin hedef dışı sucul organizmalar üzerinde toksik etki gösterebileceği gözlenmektedir.


Anahtar Kelimeler: Tetramethrin, Tatlı Su Midyesi, Ortalama Öldürücü Konsantrasyon, Toplam Hemosit Sayısı

Abstract

After understanding the harmful effects of organophosphate, organochlorine and carbamate-derived pesticides on ecosystem health, many pesticide derivatives have been developed. Synthetic pyrethroids, one of these pesticides, are produced from the pyrethrin substance obtained from the flowers of the *Chrysanthemum cinerariaefolium* plant. Synthetic pyrethroids are insecticides used against insects in agricultural and domestic areas. Due to their widespread use, they mix with terrestrial and aquatic ecosystems. Therefore, the effects on non-target species in these ecosystems should also be investigated. In this study, the effect of tetramethrin, one of the synthetic pyrethroids, on non-target species was investigated on freshwater mussel *Unio delicatus*, which is one of the aquatic ecosystem species. Within the scope of the study, the mean lethal concentration (LC₅₀) value of 96 hours was determined in freshwater mussels exposed to different tetramethrin concentrations in the first stage. In the second stage of the study, mussels were exposed to ¹/₁₀ and ¹/₁₀₀ concentrations of LC₅₀ value for 24 and 96 hours and the effect of tetramethrin was evaluated by examining the total hemocyte count. According to the findings obtained at the end of the study, the 96-hour LC₅₀ value of tetramethrin was found to be 8.62 mg/L (6.4183 mg/L-11.4167 mg/L) for freshwater mussels at a 95% confidence interval. The total hemocyte counts results of tetramethrin-exposed groups were statistically decreased compared to control groups (p<0.05). According to these results, it is observed that tetramethrin may have a toxic effect on non-target aquatic organisms.

Key Words: Tetramethrin, Freshwater Mussel, Mean Lethal Concentration, Total Hemocyte Counts

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Pınar Arslan  <https://orcid.org/0000-0001-5910-2835>
Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çankırı Türkiye
E-mail: pinarslan89@gmail.com

Geliş Tarihi/Received:15 Temmuz 2023. Kabul Tarihi/Accepted: 25 Ağustos 2023. Çevrimiçi Yayın/Published Online: 05 Eylül 2023

GİRİŞ

Piretroidler, *Chrysanthemum cinerariaefolium* çiçeklerinden elde edilen piretrin türevlerinden oluşan sentetik kimyasallar olup nörotoksik etki gösteren insektisit madde grubudur. Kimyasal yapılarında alfa-siyano grubu içeren Tip 1 piretroidler nörotoksik etkilerini sinir sistemindeki sodyum kanalları üzerinden gösterirken alfa-siyano grubu içermeyen Tip 2 piretroidler klor ve kalsiyum iyon kanalları üzerinde etki gösterirler. Ayrıca, her iki grup piretroid bileşikleri beyinde asetilkolinesteraz salınımını etkileyerek ATPazları inhibe eder ve endokrin bozucu bir etki gösterir¹.

Piretroid insektisitler, evsel ve tarım alanlarında yaygın kullanımları nedeniyle yüzeysel su akışı, topraktan sızma ve diğer yollarla doğal su döngüsüne girerek sucül ekosistemlerde kirliliğe neden olmaktadır². Sucül ekosistemlere karışan bu maddeler, hedef dışı sucül organizmalar üzerinde toksik etki gesturer istenmeyen etkilere yol açtığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkmıştır. Piretroid türevlerinden fenpropatrin, sipermetrin, ve deltametrin maddelerinin midye dokularında farklı zaman aralıklarında biyokonsantrasyon değerlerinin arttığı bildirilmiştir³. Tatlı su istakozlarının permetrine maruz kalmasından sonra toplam hemosit sayısında ve doku lipid peroksidasyonunda değişimler ile dokularda histopatolojik farklılıklar meydana getirdiği gösterilmiştir⁴.

Tip I piretroid türevlerinden biri olan tetrametrin (CAS: 7696-12-0), evsel ortamlardaki yaban arısı, hamam böceği, karınca, pire ve sivrisinek gibi böceklere karşı genellikle aerosol formülasyonunda (%0.1–0.25), sulu sprelerde (%0.1–0.25) veya emülsifiye edilebilir konsantrelerde (%2.5) kullanılan bir maddedir⁵. Tetrametrinin kullanım alanının yaygın olmasından dolayı sucül ekosistemlere karışmasından sonra su kütlesinde birikim göstererek pelajik türler üzerinde toksik etki gösterdiği belirtilmiştir^{2,6,7}. Tetrametrin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, bentik sucül organizmalarda akut toksik etkilerinin çalışıldığı sınırlı sayıda makale olduğu gözlenmektedir⁸.

Midyeler, sucül bir ekosistemde biyoizleme çalışmalarında ve ekotoksikoloji alanında en

fazla kullanılan bentik türlerden biridir⁹.

Bu çalışmada, hedef dışı sucül organizma olan tatlı su midyeleri üzerinde tetrametrinin akut toksik etkisinin belirlenmesi ve subletal tetrametrin konsantrasyonlarının tatlı su midyelerindeki fizyolojik etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında yapılan tüm deneyler zehirlilik seyreltme faktörü tayin metodu ve APHA metotlarına göre gerçekleştirilmiştir^{10,11}. Deneylerde, yarı statik biyodeny yöntemi kullanılmıştır¹⁰.

Tatlı su midyeleri ve maruz kalma

Tatlı su midyeleri *Unio delicatus* (n=120, kabuk uzunluğu 66.76 ± 8.72 mm, kabuk yüksekliği 34.82 ± 3.98 mm, kabuk genişliği 25.55 ± 4.20 mm ve vücut ağırlığı 40.14 ± 11.12 g) Gölbaşı Gölü (Adıyaman) yerel balıkçılarından temin edilerek laboratuvar ortamına getirilmiştir. Midyeler, kloru giderilmiş akvaryum suyu içeren 80 L akvaryumlarda 18:6 ışık:karanlık döngüsü fotoperiyotlarında laboratuvar koşullarına aklimasyon ve adaptasyonu sağlanmıştır. Bu süre boyunca *Spirulina* sp. tozu ile beslenen midyeler, aklimasyon ve adaptasyon süresinin son 24 saati ve deney süresi boyunca beslenmemiştir. Akvaryum suyu iki günde bir sifonlanıp metabolik atıklar uzaklaştırılarak değiştirilmiş ve su kalitesi (pH: 6.85 ± 0.18 ; doymuş oksijen: 3.02 ± 0.21 mg/L; sıcaklık: 20.43 ± 0.11 °C; tuzluluk: 0.17 ± 0.04 ; iletkenlik 323.37 ± 74.56 µS/cm) korunmuştur.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Tetrametrin teknik standartı (%95) çalışmada kullanılmıştır. Akut ve subletal maruziyet deneylerinden 24 saat önce tetrametrinin stok çözeltileri dimetilsülfoksit (DMSO, Isolab Chemicals, Almanya) kullanılarak hazırlanmış ve buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir. Hemolemf dokusu formaldehit ile fikse edilmiştir (%4 formaldehit, TEKKİM, Türkiye).

Akut toksik maruziyet deneyleri

Bu çalışmanın ilk aşamasında tetrametrinin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀)

değerini belirlemek amacıyla akut toksisite deneyleri yapılmıştır. Çalışma kapsamında midyeler 96 saat boyunca farklı tetrametrin konsantrasyonlarına maruz kalmış ve bu süre sonunda midyelerin canlılık durumları incelenmiştir. Ayrıca kontrol (akvaryum suyu ve midye) ile solvent kontrol (DMSO, akvaryum suyu ve midye) içeren gruplar da bulunmaktadır. Tüm akut deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (5 midye/her konsantrasyon).

Subletal maruziyet deneyleri

Tetrametrinin 96 saatlik LC₅₀ değerinin bulunmasından sonra, tatlı su midyeleri 24 ve 96 saat boyunca bu değer $1/10$ ve $1/100$ konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Subletal konsantrasyonlar Sprague'ye göre seçilmiştir¹². Subletal deneylerde ayrıca kontrol ile solvent kontrol grupları da bulunmaktadır. Tüm subletal deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (5 midye/her deney grubu). Maruziyet sürelerinin sonunda midyelerin metrik ölçümlerinin alınmasını takiben hemolemf dokusu umba bölgesinden enjektör yardımıyla girilerek alınmıştır.

Toplam hemosit sayısı

Tatlı su midyelerinin hemolemf dokusu alındıktan sonra 1 mL hemolemf dokusu %4'lük formaldehit ile fikse edilmiştir. Thoma lamı kullanılarak hemolemf dokusundaki hemosit örnekleri ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Toplam hemosit sayısını belirlemek için Yavuzcan ve Benli¹² metodu kullanılmıştır. Elde edilen bulgular hücre/mL şeklinde ifade edilmiştir.

Deney sonuçlarının istatistiksel analizi

Tetrametrinin 96 saatteki LC₅₀ değeri Finney's Probit Assay kullanılarak EPA bilgisayar programında bulunmuştur¹³. Toplam hemosit sayısının hesaplanmasında veriler ilk olarak Microsoft Excel programına girilmiştir. Ardından sonuçların istatistiksel analizi IBM SPSS 20.0 ve grafiksel gösterimi ise GraphPad Prism 5 programları kullanılarak yapılmıştır. Normal dağılım gösterdiği saptanan verilerin

istatistiksel değerlendirilmesi t-testi ve tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık (p) 0,05 olarak kabul edilmiştir.

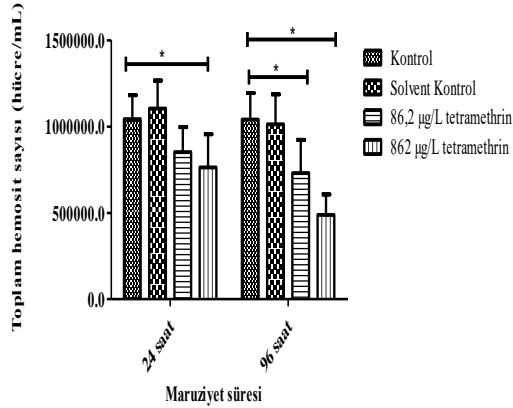
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, tetrametrinin akut ve subletal etkileri hedef dışı sucul organizma olan tatlı su midyeleri *Unio delicatus* üzerinde *delicatus* üzerinde değerlendirilmiştir.

Akut toksisite deneyleri sırasında kontrol ve solvent kontrol gruplarında ölüm gerçekleşmemiştir. Tetrametrin uygulanan gruplarda, ölü midyeler kapaklarının açılması sonucunda tespit edilmiş ve kaydedilmiştir. Akut toksisite deneyleri sonucunda 96 saatlik tetrametrinin LC₅₀ değeri %95 güven aralığında 8.62 mg/L (6.42 mg/L – 11.42 mg/L) olarak tespit edilmiştir.

Tetrametrin toksisitesinin araştırıldığı diğer çalışmalar incelendiğinde sucul organizmalarda yüksek bir akut toksisiteye sahip olduğu görülmektedir. Tetrametrinin 96 saatlik LC₅₀ değeri sazan balıkları *Cyprinus carpio* için 14.84 µg/L¹⁵, çipura balıkları *Lepomis macrochirus* için 21 ppb¹⁶ ile 48 saatlik LC₅₀ değeri medaka balıkları *Oryzias latipes* için 0.20 ppb¹⁷ olarak tespit edilmiştir. Sucul model organizma olan su piresi *Daphnia magna* için tetrametrinin 72 saatlik ortalama etki konsantrasyon (EC₅₀) değeri 1.8 mg/L bulunmuştur¹⁸. Literatürdeki bu akut toksisite değerlerinin µg/L ile mg/L arasında değişmesi bu çalışmada elde edilen değer ile uyumluluk göstermektedir.

Tatlı su midyeleri, tetrametrinin LC₅₀ değerinin $1/10$ konsantrasyonu (862 µg/L) ve $1/100$ konsantrasyonuna (8.62 µg/L) 24 ve 96 saat boyunca maruz kalmasını takiben toplam hemosit sayısı incelenmiştir (Şekil 1). Her iki maruziyet süresinde kontrol gruplarında yüksek toplam hemosit sayısı gözlenmiştir. 24 saat maruziyet süresi deneylerinde kontrol grubuna göre 862 µg/L tetrametrin uygulanan grupta ve 96 saat süreyle her iki konsantrasyondaki tetrametrin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre önemli derecede azalma olmuştur (p<0.05).



Şekil 1. Tatlı su midyelerinin toplam hemosit sayısı (*: $p < 0.05$)

Sucul omurgasız canlıların hemolemf dokusu memeli organizmaların kan dokusunun benzeri bir dokudur. Dolayısıyla sucul organizmaların hematolojik parametrelerinin incelenmesinde hemolemf dokusu hücreleri olan hemosit hücreleri oldukça önemlidir. Bu canlılarda, ortam koşullarında meydana gelen bir değişim (sıcaklık artması, pH değişimi, kirlilik yükü artışı gibi) veya parazitik bir enfeksiyona karşı fizyolojik yanıt olarak hemosit sayılarında bir değişim oluşur¹⁹.

Sucul ekosistemlerdeki piretroit kaynaklı kirlenme sonucunda ortaya çıkan toplam hemosit sayılarındaki değişimler bu kirlenici maddelerin hemositler üzerinde neden olduğu kimyasal strese bağlı olabilir¹⁹. Güncel literatür araştırmasında, tetrametrinin sucul organizmalar üzerindeki toplam hemosit sayılarındaki etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak diğer piretroit türevlerinin sucul omurgasız türler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, toplam hemosit değerlerinin incelendiği görülmektedir. Tip I piretroitlerden biri olan permetrin, tatlı su ıstakozlarında (*Astacus leptodactylus*) 0.09 µg/L konsantrasyonunda 48 ve 96 saat maruziyette toplam hemosit sayılarında bir artış meydana getirmiştir⁴. Tip II piretroitlerden biri olan h tatlı su midyelerinde (*Unio delicatus*) 1 ve 10 µg/L konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat maruziyetlerde toplam hemosit sayılarında

azalma meydana getirmiştir²⁰. Bir başka tip II piretroit olan sifulitrin ise tatlı su midyelerinde (*Unio delicatus*) 24 ve 48 saat maruziyette toplam hemosit sayılarında düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru bir artış göstermiştir²¹. Bu çalışmada elde edilen bulgular literatür ile benzerlik göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, tetrametrinin tatlı su ekosistemlerinde biyoizlemede kullanılan bir tür olan *Unio delicatus* üzerinde toksik etkisi değerlendirilmiştir. Akut toksik değerinin bulunmasından sonra subletal iki farklı konsantrasyonda tetrametrine 24 ve 96 saat maruz kalan midye örneklerinde toplam hemosit sayılarında anlamlı düşmeler olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları, tetrametrin kontaminasyonunun bentik sucul organizmalar üzerinde de toksik etkilere neden olabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2022/1 tarafından desteklenmiştir.

Etik Onay: -

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: TÜBİTAK

Ethical Approval: -

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest

Financial Support: TUBITAK

KAYNAKLAR

1. Werner, I., Young, T. M. *Pyrethroid insecticides—exposure and impacts in the aquatic environment*. Della Sala, D.A., Goldstein, M.I., editors, 2018, 119-126.
2. Guo, Y., Huang, Y., Pang, S., Zhou, T., Lin, Z., Yu, H., et al. Novel mechanism and kinetics of tetramethrin degradation using an indigenous *Gordonia cholesterolivorans* A16, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17), 9242. <https://doi.org/10.3390/ijms22179242>
3. Wu, M., Tang, X., Sun, C., Miao, J., Wang, Q., Pan, L. Kinetics of uptake and depuration of synthetic pyrethroid insecticides in manila clam (*Ruditapes philippinarum*), *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30, 76246–76252. <https://doi.org/10.1007/s11356-023->

- 28064-0
4. Günal, A. Ç., Tunca, S. K., Arslan, P., Gül, G., Dinçel, A. S. How does sublethal permethrin effect non-target aquatic organisms?, *Environmental Science and Pollution Research*, 2021,28(37), 52405-52417. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14475-4>.
 5. Nguyen, H. T., Polimati, H., Annam, S. S. P., Okello, E., Thai, Q. M., Vu, T. Y., et al. Lobaric acid prevents the adverse effects of tetramethrin on the estrous cycle of female albino Wistar rats. *Plos one*, 2022,17(7), e0269983 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269983>
 6. Hladik, M.L., Kuivila, K.M. Assessing the occurrence and distribution of pyrethroids in water and suspended sediments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(19), 9079-9085. <https://doi.org/10.1021/jf9020448>
 7. Rösch, A., Beck, B., Hollender, J., Singer, H. Picogram per liter quantification of pyrethroid and organophosphate insecticides in surface waters: a result of large enrichment with liquid-liquid extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411, 3151–3164. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01787-1>
 8. Arslan, P. Pyrethroid-induced oxidative stress and biochemical changes in the primary mussel cell cultures. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023,30, 48484–48490.<https://doi.org/10.1007/s11356-023-25845-5>
 9. Petersen, J.K. Grazing On Pelagic Primary Producers – The Role Of Benthic Suspension Feeders In Estuaries. In: Nielsen, S.L., Banta, G.T., Pedersen, M.F. (eds) *Estuarine Nutrient Cycling: The Influence of Primary Producers. Aquatic Ecology Book Series*, vol 2. Springer, Dordrecht. 2004. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3021-5_5
 10. 10, APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: APHA, 1975, 14.
 11. Anonymous. Biological indicators and their use in the measurement of the condition of the environment, USA: Gesamp Reports and Studies, 1989,55, 1-56.
 12. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish—III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Research*, 1971, 5, 245–266. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(71\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(71)90171-0)
 13. Yavuzcan, H.Y., Benli, A.Ç.K. Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts, and hemolymph glucose. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59, 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.007>
 14. LC50 Software Program, Version 1.00. Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM). US EPA: Washington, DC, USA, 1999.
 15. Günde, E.G., Yerli S.V. A comparative study on the acute toxicity of cyfluthrin and tetramethrin on carp (*Cyprinus carpio* L. 1758), *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 2011,17(3), 260-268.
 16. Worthing C.R., Walker S.B. The pesticide manual. 7th ed, Croydon The British Crop Protection Council 1983,695 pp .
 17. Miyamoto, J. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environmental Health Perspective*, 1976,14, 15-28. <https://doi.org/10.1289/ehp.761415>
 18. Greño, M., Amariei, G., Boltes, K., Castro-Puyana, M., García, M. A., Marina, M. L. Ecotoxicity evaluation of tetramethrin and analysis in agrochemical formulations using chiral electrokinetic chromatography. *Science of The Total Environment*, 2021, 800, 149496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149496>
 19. Salama, W.M., Lotfy, M.M., Mona, M.M. Depuration effect on the total hemocytes count and heavy metals concentration in freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2022,48(3), 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.04.003>
 20. Arslan, P. How Does Cyphenothrin Affect the Freshwater Mussel as In Vitro and In Vivo Models?. *Water Air and Soil Pollution*,2022, 233, 386 <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05860-x>
 21. Arslan, P. Determinations of the effects of cyfluthrin on the hemocytes parameters of freshwater mussel (*Unio delicatus*). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2022, 39 (1), 39-45.