

FMC ve Malaşit Yeşili Sağaltım Dozlarının *Oreochromis niloticus* (L., 1758)'un Bazı Kan Parametrelerinde Meydana Getirdiği Değişimler

*A. Erdem Dönmez, Mustafa Kalay, Ferbal Özkan, C. Erkin Koyuncu

Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yenişehir kampüsü, 33169, Mersin, Türkiye

*E mail: donmezerdem@yahoo.com

Abstract: *The variations in the some blood parameters caused by therapeutic concentration of FMC and malachite green in Oreochromis niloticus (L., 1758).* This study was investigated to the variations in some blood parameters in relation to the seconder stres caused by FMC (the mixture of formalin, malachite green and methylene blue) and malachite green in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L., 1758). These chemicals are widely used especially in fresh water fish culture for prophylactic and disinfection purposes. FMC and malachite green were prepared as 1 mg/lit concentration and fish were immersed into the solutions for 10 and 60 minute durations. Following the immersion times, serum glucose, cortisol, lactate, calcium, phosphorus, magnesium, sodium, clore, potassium and hematocrite levels are measured. The serum phosphorus, magnesium, possium ions, glucose, cortisol and lactate levels were increased with FMC by time whereas only the serum glucose and cortisol levels were increased with malachite green by increasing immersion times in the Nile tilapia.

Key Words: *Oreochromis niloticus*, FMC, malachite green, stress, blood.

Özet: Bu araştırma, Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*, L., 1758)'nda FMC (formalin, malaşit yeşili ve metilen mavisi karışımı) ve malaşit yeşili'nin oluşturduğu sekonder stres gelişimine ilişkin bazı kan parametrelerinde oluşan değişimler gözlemek amacıyla yapılmıştır. Bu kimyasal maddeler, özellikle tatlısu balıkları yetiştiriciliğinde, sıklıkla profilaktik ve dezenfektan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. FMC ve malaşit yeşili, 1 mg/lit konsantrasyonunda hazırlanmış ve balıklar bu konsantrasyonlara 10 ve 60'ar dakikalık sürelerle daldırılmışlardır. Uygulama sürelerini takiben serumda glikoz, kortizol, laktat, kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum, potasyum, klor ve hematokrit değerleri değerlendirilmiştir. Nil tilapya'sında FMC etkisinde serum fosfor, magnezyum, potasyum iyonları ile glikoz, kortizol, laktat düzeyleri, malaşit yeşili etkisinde ise serum glikoz ve kortizol düzeyleri kontrol grubuna göre artan süreye bağlı olarak yükselmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Oreochromis niloticus*, FMC, malaşit yeşili, stres, kan.

Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğinde kimyasal maddeler, çoğunlukla lokal olarak gelişen bakteriyel, protozoer ve fungal enfeksiyonların ortaya çıkması olasılığını azaltmak için profilaktik amaçla ve yetiştiricilik sırasında balık yumurtaları ile akvaryum balıklarında yüzeysel enfeksiyonların kontrolünde kullanılmaktadırlar (Yavuzcan Yıldız ve Pulatsü, 1999). Bu kimyasal maddelerden malaşit yeşili, formalin ve metilen mavisi, maliyetlerinin düşük olması nedeniyle, özellikle fungal enfeksiyonlarda profilaktik ve sağaltım amacıyla yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Meinelt ve diğ., 2001).

Malaşit yeşilinin orijinal kullanım alanı tekstil ürünlerinin boyanması olup, ayrıca gıda renklendirme ajanı, gıda katkı maddesi, akrilik, kağıt ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde ektoparazitik, fungusit ve antiseptik amaçlar için ilk olarak kullanımı 1933 yılında gerçekleşmiştir. Geniş fungusit ve antiparaziter spektrumu yanında alabalıklarda proliferatif böbrek hastalığına karşı da etkili olması, su ürünleri üreticileri açısından bu kimyasal maddeyi daha önemli hale getirmektedir (Bergwerff ve Scherpenisse, 2003, Srivastava ve diğ., 2004). Malaşit yeşilinin, tedavi amacıyla kullanıldığı balıkları tüketen insanlarda, immun ve

reproduktif sistemlerde genotoksik ve karsinojenik etkiler oluşturması nedeniyle kullanımının riskli ve tartışmalı olduğu belirlenmiştir (Srivastava ve diğ., 2004). Ayrıca potansiyel karsinojenik, genotoksik, mutajenik ve teratojenik etkileri pek çok hayvan türünde ve hücre kültürlerinde de belirlenmiştir (Bergwerff ve Scherpenisse, 2003). Bu etkileri nedeniyle de birçok ülkede kullanımı yasaklanmıştır (Srivastava ve ark, 2004).

Ülkemizde özellikle tatlısu balıkları yetiştiriciliğinde balıkların bazı dış parazitleri ile fungal enfeksiyonlarında profilaktik ve sağaltım amacıyla çok yoğun olarak kullanılan bir diğer kimyasal madde de kısaca FMC olarak adlandırılan formalin, malaşit yeşili ve metilen mavisi karışımıdır. Formalin ve malaşit yeşili, balıklarda *Ichthyophthirius multifiliis* etkeninin oluşturduğu beyaz benek hastalığının sağaltımında sinerjistik bir etki göstermekte ve FMC'nin, akvaryum balıklarının dış parazitlerinin sağaltımında geniş spektruma sahip olduğu belirtilmektedir (Mienelt ve diğ., 2001).

Farklı balık türlerinde, formalin ve malaşit yeşilinin kan parametreleri üzerine karakteristik etkileri konusunda yapılan araştırmalar bulunmakla birlikte FMC ve sekonder stres arasındaki etkileşime dair araştırmalar daha az sayıdadır. Sekonder stres yanıtların, birincil yanıt sırasında serbest kalan

faktörlerin fizyolojik etkileriyle açığa çıktığı ve hematolojik parametrelerdeki değişimlerin belirlenmesiyle ölçülebildiği bildirilmiştir (Yavuzcan Yıldız ve Pulatsü, 1999).

Hematolojik parametreler, su ürünleri yetiştiriciliğinde balıkların fiziksel durumlarının belirlenmesi ile stres ve hastalıkların kontrolünde her geçen gün daha yaygın olarak kullanılan indikatörlerdir. Ayrıca bu parametreler, çevre şartlarındaki değişikliklere kısa sürede yanıt verdiği için, toksikolojik çalışmalarda da yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Atamanalp ve diğ., 2003).

Pek çok stres etkeni, balıklarda Genel Adaptasyon Sendromu olarak tanımlanan stres yanıtına neden olabilir. Stres yanıtı, stres etkenine karşı koymak veya onunla başa çıkmaya çalışmak amacıyla doku ve organ fonksiyonlarında değişimlerle başlar ve homeostasis'den uzaklaşmayla sonuçlanır. Bu değişimler, bireyler arasında farklılıklar gösteren fakat benzer karakteristiğe sahip fizyolojik yanıtlardır (Schreck ve diğ., 2001). Stres sonrası gelişen primer yanıt süresince açığa çıkan faktörlerin fizyolojik etkilerinden sekonder yanıt gelişmekte ve bu yanıt hematolojik parametrelerdeki değişim oranlarına bakılarak değerlendirilmektedir (Yavuzcan Yıldız ve Pulatsü, 1999).

Stres yapıcı etkenlerin etkisinde kalan farklı balık türlerinde, plazma kortizol, glikoz ve laktat düzeylerinde artışlar gözlenmiştir (Mathalakath ve diğ., 1997; Quabius ve diğ., 1997; Yıldız Yavuzcan ve Pulatsü, 1999; Acerete ve diğ., 2004; Small, 2004; Biswas ve diğ., 2005). Balıklarda gelişen stres sonrası homeostazisi sağlamak amacıyla hematolojik, osmolalitik, hormonal ve enerji metabolizmasını içeren birtakım fizyolojik değişiklikler şekillenmektedir (Acerete ve diğ., 2004).

Bu çalışmada, Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus* L., 1758)'nda malaşit yeşili ve FMC'nin profilaktik ve sağaltım dozlarının iki farklı sürede uygulanması sonrasında gelişen strese bağlı kan parametrelerinde oluşan değişimler incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada materyal olarak *O. niloticus* kullanılmış ve balıklar 40 x 120 x 40 cm ebatlarındaki akvaryumlara konulmuştur. Balıkların ortalama ağırlığı 51.25 ± 3.41 g boyları ise 15.00 ± 0.32 cm olarak belirlenmiştir. Deney üç tekrarlı yapılmış olup her tekrarda 5'er balık kullanılmıştır. Balıklara uygulanan FMC solüsyonu; 3,7 g malaşit yeşili ve 3,7 g metilen mavisi'nin 1 litre formalin (% 37'lik) içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır (Yavuzcan Yıldız ve Pulatsü, 1999). Balıklara profilaktik ve sağaltım dozu olarak, Srivastava ve ark (2004)'larının bildirdiği LC50 değerine göre 1 mg/lt hazırlanan malaşit yeşili okzalit ve FMC konsantrasyonları 10 ve 60 dakika sürelerde uygulanmıştır. Belirlenen uygulama süreleri sonunda balıkların kaudal yüzgeç saplarının kesilmesiyle elde edilen kan örnekleri, biyokimyasal analizleri için mikrotüplere ve hematokrit ölçümleri için ise heparinli mikrohematokrit tüplerine alınmıştır. Mikrotüplerdeki kan örnekleri, serum elde

etmek amacıyla 3500 devir/dk.'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Serum örneklerinde, kalsiyum, fosfor, magnezyum, sodyum, potasyum ve klor iyon düzeyleri Cobas Integra 800 otoanalizator cihazında belirlenmiştir. Serum glikoz düzeyi; heksokinaz ile enzimatik analiz yöntemi, laktat düzeyi; laktat oksidaz ve 4 aminoantipürin ile enzimatik kolorimetrik yöntemi ve serum kortizol düzeyide; ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay) yöntemi kullanılarak yine Cobas Integra 800 otoanalizator cihazında ölçülmüştür. Hematokrit tayini mikrohematokrit yöntemle (Yılmaz, 1984) yapılmış ve değerlendirilmiştir.

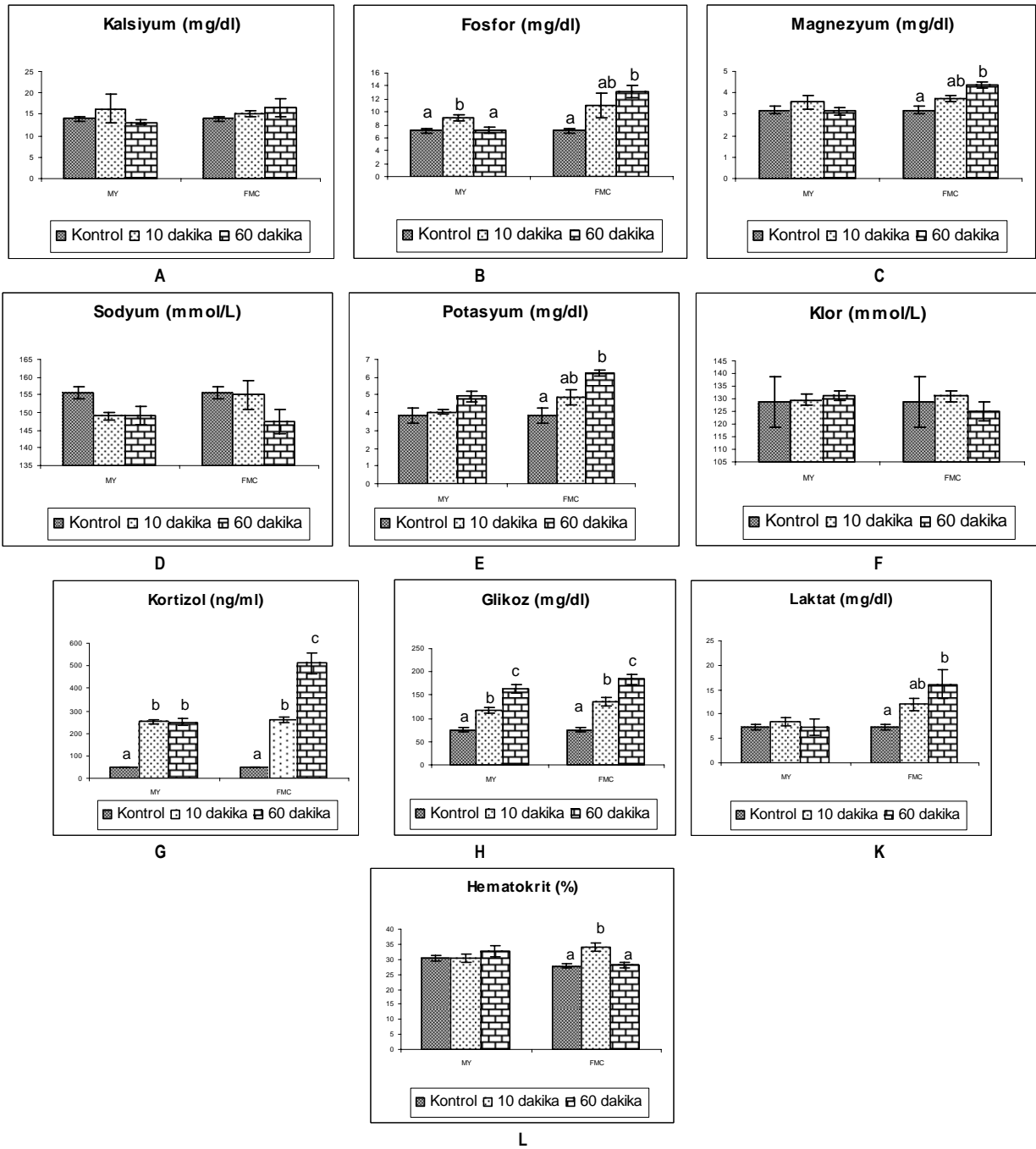
Hematolojik bulgularda, gruplar arası farklar Student-Newman Keul's Test (SNK) uygulanarak değerlendirilmiştir. Bu istatistiki değerlendirmeler için SPSS 10.0 for Windows paket programından yararlanılmıştır. Grafiklerde, a ve b harfleri uygulanan sağaltım dozunda, artan sürenin etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.05$ düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Bulgular

Malaşit yeşili ve FMC'nin balıklara uygulanması sonrasında 10 ve 60'ar dakikalık sürelerde serum iyonları ile glikoz, kortizol ve laktat değerlerinde oluşan değişimler grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 1A-L).

Malaşit yeşili, serum fosfor, glikoz ve kortizol düzeylerinde kontrole göre artışa neden olmuştur. Malaşit yeşilinin 10 dakika süreyle uygulandığı grupta, serum fosfor düzeyi (9.07 ± 0.42 mg/dl) diğer iki gruba göre istatistik fark gösterecek düzeyde yüksektir. 10 dakika ve 60 dakika süreyle uygulanan gruplarda serum kortizol düzeyi (251.89 ± 8.41 ng/ml, 250.38 ± 17.25 ng/ml) kontrol grubuna göre yükselmiştir. Ancak deney grupları arasında fark yoktur. Serum glikoz düzeyi ise, etkide kalma süresine bağlı olarak belirgin bir yükselme göstermiştir. Örneğin 60 dakika uygulama süresinin sonunda serum glikoz düzeyi kontrol grubunda belirlenen düzeyin yaklaşık 2,5 katına çıkmıştır (164.00 ± 8.72 mg/dl). Serum kalsiyum, magnezyum, sodyum, potasyum, klor, laktat düzeyleri ile hematokrit değerlerinde gruplar arasında istatistik fark belirlenmemiştir ($P < 0.05$).

FMC uygulaması sonrasında kan parametrelerinde oluşan değişikliklerin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. FMC solüsyonu, serum fosfor, magnezyum, potasyum, glikoz, kortizol, laktat ve hematokrit düzeylerinde kontrole göre artışlara neden olmuştur. Söz konusu parametrelerin tamamında etkide kalma süresine bağlı olarak yükselme eğilimi belirlenmiştir. Serum kortizol düzeyi, kontrol grubuna göre yaklaşık 10 kat (511.31 ± 46.95 ng/ml), serum glikoz düzeyi (184.50 ± 10.50 mg/dl) ve laktat düzeyi ise (16.12 ± 2.97 mg/dl) yaklaşık 2,5 kat kadar yükselmiştir. FMC'nin 10 dakika süreyle uygulandığı grupta hematokrit değer (% 34.00 ± 1.29) diğer iki gruba göre istatistik fark gösterecek düzeyde yükselmiştir. Serum kalsiyum, sodyum ve klor değerleri arasında istatistik fark belirlenmemiştir.



Şekil 1. Malaşit Yeşili ve FMC uygulamaları sonrası serum kalsiyum (A), fosfor (B), magnezyum (C), sodyum (D), potasyum (E), klor (F), kortizol (G), glikoz (H), laktat (K) ve hematokrit (L) düzeyleri. (mg/dl: miligram / desilitre, mmol/L: milimol / litre, ng/dl: nanogram / desilitre).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada malaşit yeşili ve FMC solüsyonlarının uygulandığı Nil tilapyasında plazma kortizol, glikoz ve laktat düzeyleri yükselmiştir. Schreck ve diğ., (2001)'e göre teleost'larda predominant stres hormonu olan kortizol, böbreküstü bezlerinden salgınmakta ve balıklarda hem karbonhidrat metabolizması hem de hidromineral dengenin

sağlamasında önemli bir rol oynamaktadır (Kajimura ve diğ., 2004). Özellikle akut gelişen stres sonrasında, plazma kortizol ve glikoz düzeylerinin yükseldiği belirlenmiştir (Biswas ve diğ., 2005). Tort ve diğ. (1996), stres sonrasında kortizol düzeyinin *Sparus aurata*'da bazal düzeyin 3 katı, Arends ve diğ. (1999), yine *S. aurata*'da 50 katı, Waring ve diğ. (1996)'da *Scopthalmus maximus*'ta 10 katına kadar yükseldiğini belirlemişlerdir (Acerete ve diğ., 2004). Bu araştırmada

kortizol düzeyinin, malaşit yeşilinin uygulandığı balıklarda kontrol grubunda belirlenen düzeylere göre 5 kat (250.38 ± 17.25 ng/ml), FMC uygulanan balıklarda ise 10 kat kadar yükseldiği (511.31 ± 46.95 ng/ml) tespit edilmiştir.

Plazma kortizol düzeyinin yükselmesinin, dokular için en önemli enerji substratı olan glikoz düzeyinde de yükselmelere neden olduğu ve stres durumlarında artan enerji gereksiniminin karşılanmasını sağlama amacıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Mathalakath ve diğ., 1997). Bu araştırmada glikoz düzeylerinin, malaşit yeşili ve FMC'ye maruz kalma sürelerine bağlı olarak, yükseldiği tespit edilmiştir. Vijayan ve Moon (1994), stres sonrasında kateşolamin düzeylerindeki ani yükselmeler ile gerçekleşen hızlı glikojen yıkımının da plazma glikoz düzeyini yükselttiğini belirtmişlerdir (Mathalakath ve diğ., 1997).

Bu araştırmada laktat düzeyinin, FMC'nin uygulandığı balıklarda kontrol grubunda belirlenen düzeylere göre 2,5 kat kadar yükseldiği belirlenmiştir. Plazma laktat düzeyindeki artışın ise bu substratın; stres sonrası kaslarda glikoliz ve karaciğerde glikojen doyunluğunun sağlanması veya glikoz üretimi amacıyla kullanılmasının bir sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Mathalakath ve diğ., 1997). Ayrıca stres sonrası oluşan yoğun hareketlilik veya hipoksiya'ya bağlı olarak serum laktat düzeylerinde artışlar olabildiği de bildirilmiştir (Acerete ve diğ., 2004).

Larsson ve diğ. (1985), hematokrit düzeylerinde yükselmelerin stres sırasında, osmotik değişiklikler sonrası olası solungaç hasarları ve polisitemiye bağlı olarak geliştiğini belirtmiştir. Ayrıca stres sırasında yüksek metabolik hasara bağlı olarak, alyuvar sayısının ve dolayısıyla hematokrit düzeyinin artması ile oksijen taşıma kapasitesinin artışı sağlama amaçlı olabilmektedir (Acerete ve diğ., 2004). Biswas ve diğ. (2005), farklı fotoperiyot rejimlerinde gelişen primer ve sekonder stresi inceledikleri çalışmalarında, stres sonrası hematokrit düzeylerinde yükselme belirlemiş ve bu durumun organizmada alyuvar üretiminin artması ve alyuvarlarda rastlanan şişkinlikle açıklamışlardır. Bu araştırmada FMC'nin 10 dakika süreyle uygulandığı grubun hematokrit düzeyi diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur.

Stres faktörlerine bağlı olarak balıklarda plazma elektrolit konsantrasyonu da etkilenebilmektedir, fakat bu etkilenmenin primer stres faktörlerine karşı doğrudan bir yanıt mı yoksa sudaki değişimlere bağlı dolaylı bir gelişme mi olduğu tam olarak açıklanamamaktadır (Schreck ve diğ., 2001). Ayrıca, McDonald ve Milligan (1997), plazma elektrolit düzeyindeki dengesiz görünümün plazma kortizol düzeyinin artışıyla ilgili olduğunu öne sürmüşlerdir (Acerete ve diğ., 2004).

Sucul ortamlardaki stres faktörleri balıklarda hastalıklara karşı duyarlılığı artırarak hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmelerde profilaktik yada tedavi amaçlı kullanılan kimyasal madde, antibiyotik ve dezenfektanlar da stres yapıcı etkiye sahiptirler. (Buhan ve diğ., 1996). Oluşan stres, söz konusu

maddelerin uygulanması sırası ve sonrasında oluşacak sekonder etkiler açısından önemlidir. Bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliğinde ilaç olarak uygulanan maddelerin oluşturduğu sekonder stres düzeyinin belirlenmesinde göz önünde bulundurulması gereken parametrelerin değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada, deney gruplarında özellikle serum kortizol, glikoz ve laktat düzeylerinde, kontrol grubuna göre gözlenen artışlar, bu parametrelerin malaşit yeşili ve FMC maddeleri uygulamaları sonrasında oluşan stresin etkisinin belirlenmesi açısından daha önemli parametreler olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaynakça

- Acerete, L., J.C. Balasch, E. Espinosa, A. Josa, L. Tort. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167-178.
- Atamanalp, M., A. Bayır, A.N. Sirkecioğlu, M. Cengiz. 2003. The Effects of Sublethal Doses of a Disinfectant (Malachite Green) on Blood Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), (in Turkish). *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23 (3): 177-187.
- Bergwerff, A.A., P. Scherpenisse. 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *Journal of Chromatography B*, 788: 351-359.
- Biswas, A.K., M. Seoka, K. Takii, M. Maita, H. Kumai. 2005. Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. *Aquaculture*, (Baskıda).
- Buhan, E., N. Akalın, H.Yılmaz, 1996. Fish health environmental relation and stress mechanism. *Vet.Kontr. ve Araşt. Enst. Md. Derg.* 20 (34): 173-188.
- Kajimura, S., T. Hirano, S. Moriyama, O. Vakkuri, J. Leppaluoto, E.G. Grau. 2004. Changes in plasma concentrations of immunoreactive ouabain in the tilapia in response to changing salinity: is ouabain a hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 135: 90-99.
- Larsson, A., C. Haux, M.L. Sjöbeck. 1985. Fish Physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9: 250-281.
- Mathalakath, M.V., C. Pereira, E.G. Grau, G.K. Iwama. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116 C, No 1: 89-95.
- Meinelt, T., R. Playle, K. Schreckenbach, M. Pietrock. 2001. The toxicity of the antiparasitic mixture FMC is changed by humic substances and calcium. *Aquaculture Research*, 32: 405-410.
- Quabius, E.S., P.H.M. Balm, S.E. Wendelaar Bonga. 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology*, 108: 472-482.
- Schreck, C.B., W. Contreras-Sanchez, M.S. Fitzpatrick. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24.
- Small, B.C. 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. *Aquaculture*, 238: 469-481.
- Srivastava, S., R. Sinha, D. Roy. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 66: 319-329.
- Yavuzcan Yıldız H. ve S. Pulatsü. 1999. Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) after treatment with a mixture of formalin, malachite green and methylene blue. *Aquaculture Research*, 30: 379-383.
- Yılmaz, B. 1984. Physiology (in Turkish), Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara.