

Antifouling bakır pritiyonun midye (*Mytilus galloprovincialis*)'de toplam hemosit sayıları üzerine etkilerinin belirlenmesi

Determinations of the effects antifouling copper pyrithione on total hemocyte counts of mussel (*Mytilus galloprovincialis*)

A. Çağlan Günel¹  • Selma Katalay^{2*}  • Belda Erkmen³  • Melike Merve Ayhan²  •
Gökтуğ Gül⁴  • Figen Erkoç⁵ 

¹ Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri A.B.D, Ankara

² Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Kampüsü, Manisa

³ Aksaray Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Aksaray

⁴ Gazi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Ankara

⁵ Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi Biyoloji Eğitimi Ankara

* Corresponding author: katalayselma@gmail.com

Received date: 12.06.2017

Accepted date: 22.11.2017

How to cite this paper:

Günel, A.Ç., Erkmen, B., Katalay, S., Ayhan, M.M., Gül, G. & Erkoç, F. (2018). Determinations of the effects antifouling copper pyrithione on total hemocyte counts of mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(1): 15-17. doi:10.12714/egejfas.2018.35.1.03

Öz: Bu çalışmada, 24 ve 96 saat süre ile 10 ve 30 µg/L subletal bakır pritiyona (CuPT) maruz kalan denizel kirliliğin indikatör canlılarından kara midyelerin (*Mytilus galloprovincialis*) total hemosit sayıları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Toplam hemosit sayısı (THS) sağlık göstergesi ve stres indikatörü olarak kullanılan bir parametredir. Yapılan mikroskobik sayımlar sonunda Bakır pritiyona maruz kalan midyelerde toplam hemosit sayıları kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Mytilus galloprovincialis*, Hemosit, Bakır pritiyon

Abstract: In the present study, total hemocyte counts of *Mytilus galloprovincialis* (Black mussel), indicator species for marine pollution, was investigated after exposed to 10 and 30 µg/L sublethal CuPT for 24 and 96 hours. The total hemocyte counts were significantly decreased at group exposed to CuPT for control group. Total hemocyte counts are good biomarker for determining the effects of antifouling agents and other contaminants to the marine ecosystems.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, Hemocyte, Copper Pyrithion

GİRİŞ

Teknolojik değişikliklerin getirdiği çevre kirliliğine bağlı olarak, deniz canlıları birçok toksik maddeye maruz kalmaktadır. Son yıllarda antropojenik aktivitenin artmasının ve endüstriyel kirlenmenin sonucunda deniz çevresinde pek çok toksikant birikmektedir. Fouling organizmaların yerleşiminden kaçınmak için en yaygın metot antifouling boyalarla denizel yapıları kaplamaktır. Antifouling ürünlerin aktif maddesi olarak kullanılan tributülin (TBT)'in zararlarının fark edilmesi ve yasaklanmasının ardından bu alanda kullanmaya müsait olan başka aktif maddeler önem kazanmıştır. Zehirli boyalarda (TBT) Tributülin'in yaygın kullanımının ciddi çevre sorunları yaratması sebebiyle diuron, bakır pritiyon (CuPT) ve çinko pritiyon (ZnPT) gemilerin korunması için dünya çapında alternatif bir bileşik olarak tanıtılması gerçekleştirilmiştir (Gatidou vd., 2007) İlk defa 1990'larda piyasaya arz edilen ve antifouling ürünlerde en çok kullanılan aktif maddelerden biri de booster grubu bir biyosit olan bakır pritiyondur (Yebra vd.,

2004). Çinko pritiyon ve bakır pritiyon, deniz suyunda direkt güneş ışığı altında hızlı bir fotodegradasyona uğradığı için toksisitesi düşüktür ve deniz suyunda kalıcılığı yoktur nötr haldedir. ZnPT, CuPT gibi metal pritiyonların ışığın sınırlı olduğu marina ve limanlarda, gemilerin gölgesinde kalan sularda ve sedimentlerde veya yüksek türbiditeli su kolonlarında kalıcı olduğu bildirilmiştir (Turley vd., 2000; Turley vd., 2005).

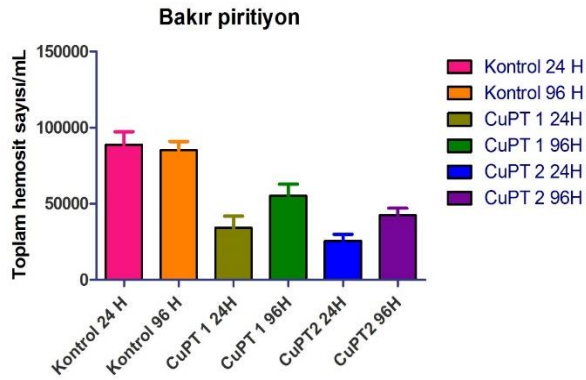
Çinko pritiyon sedimentte bakır varlığında bakır pritiyon ve mangan pritiyon formlarına dönüşmektedir. Sucul çevrede oluşturabileceği olumsuz toksik etkiler, deniz trafiğinin çok yoğun olduğu denizel ekosistemlerde toksisitesinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Bao vd., 2014). Sucul organizmalar arasında önemli bir yer tutan midyeler biyodeneyle ve toksikolojik çalışmalar için biyoidikatör olarak en uygun organizma gruplarından birini

oluştururlar. Bu canlılar sedenter yaşam sürdürmeleri çok miktardaki suyu solungaçlarıyla filtre ederek beslenmeleri ve ekonomik öneme sahip deniz ürünü olarak tüketilmelerinden dolayı toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen indikatör türlerdir.

Midyelerde toplam hemosit sayısı (THS) sağlık göstergesi ve stres indikatörü olan bir parametredir. Toksik maddeye maruz kalan bivalve türlerinde hemosit sayılarında değişimler meydana gelerek immun sistem gücünün zayıflamasına neden olur (Auffet vd., 2006). Toplam hemosit sayısı, deniz organizmalarının hastalığa karşı direncini ve hayatta kalma kapasitesini etkilemektedir (Pipe ve Coles 1995; Dyrnda vd., 2000). CuPT' nin (bakır pritiyon) midyeler üzerindeki immüno toksik etkisi hakkındaki çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmada, 24 ve 96 saat süre ile subletal bakır pritiyona (CuPT) maruz kalan denizel kirliliğin indikatör canlılarından *Mytilus galloprovincialis* türünün total hemosit sayıları üzerindeki etkisi incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

İzmir İli, Foça (N38°40.037' E26°44.748') bölgesinden toplanan (Şekil 1). *Mytilus galloprovincialis* uygun şartlarda



Şekil 1. Bakır pritiyona maruz kalan midyelerin toplam hemosit sayılarındaki (THS) değişim
Figure 1. Changes in total hemocyte counts (THS) of mussels exposed to copper pyriithione

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevresel kirleticilerden olan toksik metaller diferansiyel hemosit sayılarında değişikliğe neden olmaktadır. Hücresel seviyede (Cd) kadmiyumun, Chora vd. (2009) iskelet yapısını, hücre adezyonu ve hücre şeklini bozduğunu, Brousseau vd. (2000), hemosit canlılığı ve hemosit populasyonlarında değişikliklere neden olduğunu belirtmişlerdir (Olabarrieta vd., 2001). Bivalve türlerde hemositler morfolojik olarak granüllü ve granülsüz olmak üzere 2 sınıfa ayrılırlar, granüllü hücreler basofilik ve eosinofilik olmak üzere iki tiptedir (Chandurvelan vd., 2013).

laboratuvara getirilerek bir hafta süre ile akvaryumlarda adaptasyona (pH: 7.88, Sıcaklık: 17.5 ± 1°C) tabi tutulmuşlardır. Yapay deniz suyu olarak Coral Pro Salt (Red Sea Europe, France) %35 tuzlulukta hazırlanmıştır. 15 L'lik akvaryumlarda 15'er midye (ort. boy 4.21 cm, n = 60) stoklanmış, 96 saatlik süre ile 10 ve 30 µg/L bakır pritiyona maruz bırakılmıştır. 24 ve 96 saat sonunda hemolenf örnekleri insülin enjektörü yardımıyla adüktör kası uyarılarak alınmıştır.

Hemolenf örnekleri 1:1 oranında hemolenf ve %4 lük formalin olacak şekilde 2.5 luk enjektörlerle çekilmiştir. Daha sonra ışık mikroskobu altında toplam hemosit sayısı Thoma lamı kullanılarak sayılmıştır. İstatistik değerlendirmede Kruskal Wallis testi uygulanmıştır.

BULGULAR

96 saatlik süre ile ön deneylerle belirlenen 10 ve 30 µg/L bakır pritiyona maruz bırakılan midyelerde 24 ve 96 saat sonunda hemositometre ile yapılan sayım sonucunda bakır pritiyona maruz kalan midyelerde toplam hemosit sayılarının kontrol grubu midyelerine göre azaldığı saptanmıştır (Şekil 1). Yapılan mikroskobik incelemede toplam hemosit sayısındaki azalmanın 24 saat maruziyette daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Granüllü hücrelerin fagositozda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu iki hücre tiplerinin fonksiyonel farkları bu çalışmada ve diğer çalışmalarda tam olarak anlaşılabilmiştir ancak bivalve hemositlerinin hyalünositleri hakkında az da olsa bilgi vardır. Bununla beraber Hyalünositlerin rolü tam olarak bilinmemektedir. Hyalünositlerin ekstrasellüler matris üretilmesi ve homeostatik fonksiyonda rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Wang vd., 2012). Hyalünositler, granüositlere göre daha küçük ve granülsüzdür merkezde büyük nükleusa sahiptir. Bununla beraber her iki hücre tipinin sitotoksik immün cevabla ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Wang vd., 2012). Aynı zamanda epitel regenerasyonun erken evresinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Wang vd., 2012). Ayrıca diferansiyel hemosit sayıları, metal maruziyeti sonucu değişiklik göstermekle beraber Eosinofilde azalma buna karşın bazofilde artış gözlenmiştir (Cima., 1999). Çift kabuklu yumuşakçalarda sistemin hücresel ve humoral komponentleri, çevresel kirlenici ile karşılaştıklarında immün cevabı baskılayabildiği yada harekete geçirdiği belirlenmiştir (Cima., 1999; Pipe vd., 1999).

Bu çalışmada, bakır pritiyona maruz kalan midyelerde toplam hemosit sayıları kontrol grubuna göre azalmıştır (Tablo1). Toplam hemosit sayısındaki düşüşü hasat sonrası elden geçirme sırasında stresin artışı ve sağlık durumunun kötüleşmesinin bir göstergesi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Le Moullac ve Haffner., 2000). Çevresel stres, hemopoetik dokuların mitotik aktivitesini değiştirebilir, bu durum hemosit dönüşümünde düşüşle sonuçlanmaktadır (Le Moullac ve Haffner., 2000). Bu bulgulara benzer olarak çalışmamızda bakır pritiyonun yarattığı strese bağlı olarak toplam hemosit sayılarının düştüğü söylenebilir.

Sonuç olarak, total hemosit sayısının biyosidal ürün kullanımının denizel ekosisteme etkisini göstermede basit, hızlı

ve iyi bir biyobelirteç olduğu ve hedef olmayan organizmalara etkilerinin incelenmesinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D. & Duchemin, M., (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63: 393–405. doi: [10.1016/j.ecoenv.2005.10.016](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.016)
- Bao, V.W.W., Lui, G.C.S. & Leung, M.Y. (2014). Acute and chronic toxicities of zinc pyriithione alone and in combination with copper to marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 157:81-93. doi: [10.1016/j.aquatox.2014.09.013](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.09.013)
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H. & Fournier, M., (2000). Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology*, 142:145–156. doi: [10.1016/S0300-483X\(99\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00165-1)
- Chandurvelan.R., Marsden I.D., Gaw.S., Chris N. & Glover.C.N. (2013) Waterborne cadmium impacts immunocytotoxic and cytogenotoxic endpoints in green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Aquatic Toxicology*, 142– 143: 283– 293. doi: [10.1016/j.aquatox.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.002)
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guignonis, J.-M., Samson, M., Romeo, M., & Bebianno, M.J., (2009). Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* 94:300–308. doi: [10.1016/j.aquatox.2009.07.014](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.014)
- Cima F, Martin MG, Matozzo V, DaRos L & Ballarin L (1999) Biomarkers for TBT immunotoxicity studies and the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Marine Pollution Bulletin*, 39:112–115. doi: [10.1016/S0025-326X\(98\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00203-3)
- Dyrynda, Elisabeth. A., Law, Robin.J., Dyrynda, Peter. E. J., Kelly, Carole. A., Pipe, Richard. K., Ratchliffe & Norman. A. (2000). Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* population following a major oil spill ('Sea Empress', Walles,UK). *Marine Ecology Progress Series*, 206:155-170. doi: [10.3354/meps206155](https://doi.org/10.3354/meps206155)
- Gatidou, G.; Thomaidis, N.S. & Zhou, J.L. (2007). Fate of Irgarol 1051, Diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. *Environmental. International*. 33: 70– 77. doi: [10.1016/j.envint.2006.07.002](https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.07.002)
- Le Moullac, G. & Haffner, P., (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191:121–131. doi: [10.1016/S0044-8486\(00\)00422-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1)
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J. & Cajaraville, M.P. (2001). In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, 15:511–517. doi: [10.1016/S0887-2333\(01\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00056-X)
- Pipe, R.K. & Coles, J.A., (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, 5:581–595. doi: [10.1016/S1050-4648\(95\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80043-3)
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M. & Ramathan, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 46: 43-45. doi: [10.1016/S0166-445X\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00114-3)
- Turley, P.A., Fenn, R.J. & Ritter, J.C. (2000). Pyriithiones as antifoulants: environmental chemistry and preliminary risk assessment. *Biofouling*, 15:175–182. doi: [10.1080/08927010009386308](https://doi.org/10.1080/08927010009386308)
- Turley, P.A., Fenn, R.J., Ritter, J.C. & Callow, M.E. (2005). Pyriithione as antifoulants: environmental fate and loss of toxicity. *Biofouling*, 21:31–40. doi: [10.1080/08927010500044351](https://doi.org/10.1080/08927010500044351)
- Wang, Y., Hu, M., Chiang, H, W, L., Shin, P, K, S. & Cheung, S, G. (2012). Characterization of subpopulation and immune-revealed parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 31:381-390. doi: [10.1016/j.fsi.2011.08.024](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.08.024)
- Yebra, D.M., Kiil, S. & Dam-Johansen., K. (2004). Antifouling technology past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Organic Coating*, 50:75– 104. doi: [10.1016/j.porgcoat.2003.06.001](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001)