

Organik İnsektisit Fipronilin Saf ve Ticari Formülasyonlarının Tavuk Yumurtası Testiyle LD₅₀ Tayini ve Embriyotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*

Haluk ÖZPARLAK¹, Sadettin ÜNSAL

Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

Özet: Organik bir insektisit olan fipronil, pestisitlerin fenil pirazoller veya fiproller olarak bilinen nispeten diğerlerine göre daha yeni ve küçük bir grubuna dahildir. Zararlı böceklerle karşı son derece etkili olup, tüm dünyada kullanımı artmaktadır. Bu çalışmada fipronilin saf ve ticari formülasyonlarının tavuk embriyolarının gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla asetonda çözdürülmüş saf fipronil ve steril bidistile saf suda sulandırılmış ticari fipronil solüsyonları (20 µl/yumurta) kuluçka başlangıcında dömlü tavuk yumurtalarının hava boşluğuna enjekte edildi. Yumurtalar kuluçkanın 15. gününde açılarak grupların ölü ve anormal embriyo sayıları, malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların tepe-kıç boyları (Crown-Rump Length, CRL) belirlendi. 31.25, 62.50, 125 ve 250 µg/yumurta saf fipronil gruplarında mortalite sırasıyla %26.32, %33.33, %40.00 ve %66.67 olarak, 50, 125, 250 ve 500 µg/yumurta ticari fipronil gruplarında ise mortalite sırasıyla %25.00, %31.58, %44.40 ve %61.11 olarak gerçekleşti. Regresyon analizi yöntemiyle saf fipronilin LD₅₀ (Letal Doz %50) değeri 161 µg/yumurta, ticari fipronilin LD₅₀ değeri 383 µg/yumurta olarak tayin edildi. Saf ve ticari fipronil grupları ile kontrol grupları arasında anormal embriyo oranı bakımından farklar istatistiksel öneme sahip değildi ($p>0.05$). Bununla birlikte saf ve ticari fipronil gruplarında canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların CRL değerlerinin kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azalma gösterdiği belirlendi ($p<0.001$). Bu sonuçlar hem saf hem de ticari fipronilin tavuk embriyoları üzerinde önemli embriyotoksik etkiye sahip olduklarını, bununla birlikte teratojenik etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fipronil, LD₅₀, tavuk embriyosu, embriyotoksisite, teratojenite.

Determination of LD₅₀ and Embryotoxicity of Pure and Commercial Formulations of Fipronil, an Organic Insecticide, by means of Hen's Egg Test

Abstract: Fipronil, an organic insecticide, is a member of relatively new and small class of pesticides, the phenyl pyrazoles or fiproles group of chemicals. It is a highly effective against a variety of insect pests and its use worldwide is increasing. The aim of this study was to determine the effects of both pure and commercial formulations of fipronil on the development of chicken embryos. For this purpose, solutions of pure fipronil dissolved in acetone and commercial fipronil diluted with distilled water (20 µl/egg) were injected into the air space of fertilized hen's eggs at the beginning of the incubation. The eggs were opened on the day 15 of the incubation and the following parameters of each group were examined: Dead and abnormal embryo numbers, malformation types, both live and relative embryo weights and Crown-Rump Lengths (CRL). Mortality values of 31.25, 62.50, 125 and 250 µg/egg pure fipronil groups were 26.32%, 33.33%, 40.00% and 66.67% and mortality values of 50, 125, 250 and 500 µg/egg commercial fipronil groups were 25.00%, 31.58%, 44.40% and 61.11%, respectively. Regression analysis estimated the LD₅₀ (the 50% lethal dose) for pure fipronil and commercial fipronil to be 161 µg/egg and 383 µg/egg, respectively. The differences in abnormal embryo rates were not statistically significant among the control and the fipronil groups ($p>0.05$). However, the live and relative embryo weights and embryo CRL values of the fipronil groups were significantly lower than that of the control group ($p<0.001$). Based on the results, it was concluded that both pure and commercial fipronil have significant embryotoxic effects but no teratogenic effects on chicken embryos.

Key words: Fipronil, LD₅₀, chick embryo, embryotoxicity, teratogenicity.

* Bu makale doktora tezinin bir bölümüdür.

¹ E-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Giriş

Zararlı böcek popülasyonlarına karşı kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler, çevre ve besin kirlenmesi, akut ve kronik zehirlenme, biyolojik dengenin bozulması, insan ve hayvanlarda teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri gibi çok yönlü çevre sorunlarının doğmasına sebep olmaktadır. Pestisitlerin hedef türlere olan seçiciliği çok iyi geliştirilememekte ve bu sebeple hedef olmayan türler sıklıkla etkilenmektedir. Tamamen güvenli bir pestisit geliştirilmesi imkanı olmadığından, günümüzde pestisitlerin ve dolayısıyla insektisitlerin çevresel etkilerini yansıtacak olan, su, toprak ve hava kirlenmesi düzeylerinin değerlendirilmesi; bunun yanı sıra toksikolojik ve ekotoksikolojik yan etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Yapısında klor ihtiva ettiği ve yeni nesil bir insektisit olduğu için modern organik klorlu bir insektisit olarak da kabul edilen fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1*R,S*)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile), diğer pestisit gruplarına göre daha yeni ve daha küçük bir grup olan fenil pirazoller (phenyl pyrazoles) veya fiproller (fiproles) olarak bilinen gruba dahil olup tüm dünyada kullanımı artmaktadır [1]. Piretroid, siklodien, organik fosforlu ve karbamat grubu insektisitlere karşı dirençli böcekler fipronile duyarlıdır. Ülkemizde de patates böceğine, ekin kambur böceğine ve mısır tel kurduna karşı ruhsatlı tarım ilacı olarak kullanılmaktadır [2,3].

Herbisidal etkilere de sahip olan fipronil geniş spektrumlu bir insektisit olup etki şekli bakımından poliklorlusikloalkanlara (α -endosulfan ve lindane gibi) benzer. Fipronil γ -aminobütirikasit (γ -aminobutyric acid, GABA) reseptörlerini bloke ederek, hedef böceklerin merkezi sinir sistemi üzerinde GABA tarafından kontrol edilen klor kanalları içinden klor iyonlarının geçişine müdahale eder. Bu etki böceklerde sonu ölümlü biten kontrolsüz merkezi sinir sistemi aktivitesine sebep olur. GABA kanalları hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda sinirsel uyarıların iletiminde önemli olmasına rağmen, fipronil omurgalı hayvanlarda GABA reseptörlerine omurgasız hayvanlardakinden daha zayıf bağlanır [1,4,5]. Fipronilin GABA reseptörlerine farklı duyarlılığı seçici bir toksisite yaratır ki böceklere ve kenelere memelilerden daha toksik olduğu için veteriner hekimlikte de kullanılmaktadır [6]. Özellikle evde beslenen hayvanlar ve çiftlik hayvanları üzerindeki pire, kene, bit ve akarlara karşı fipronil kullanımına ait denemelerden bahsedilirken [1], tavuklar üzerinde kullanımına ait bir çalışma yoktur.

Fipronilin memeliler üzerindeki akut, kronik ve subkronik toksisitesi, karsinojenik ve genotoksik etkileri ile üreme ve gelişme üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak çalışılmıştır [7,8]. Fipronilin kuşlar üzerindeki etkileri ise akut toksisite düzeyinde çeşitli kuş türleri üzerinde araştırılmış ve LD₅₀ (Letal Doz %50) değerleri belirlenmiştir. Akut toksisite çalışmasında sülün, keklik ve bıldırcın gibi kuşların, fipronile serçe, ördek ve kaz gibi kuşlardan çok daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir [9]. Bununla birlikte fipronilin kanatlı embriyoları üzerindeki etkilerine ait literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu çalışma ile fipronilin saf ve ticari formülasyonlarının metabolize olmamış yani doğal formlarının tavuk embriyoları üzerindeki LD₅₀ tayini ve olası teratojenik ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen kahverengi yumurtacı (*ATE-K*) damızlıklara ait, 59±2.5 g ağırlığındaki 240 adet dömlü kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar enjeksiyon saatine kadar yaklaşık 18°C'de üç gün süreyle depolandı. Her yumurta enjeksiyondan önce tartıldı ve kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat+42 ml formaldehit/m³ karışımıyla elde edilen buharla 15 dakika dezenfekte edildi. Denemelerde kullanılan saf fipronil standardı (%97.7) yurtdışından (*Riedel-De Haen-46451*), ticari fipronil (500g/l) *Basf-Türk* firmasından temin edildi.

Denemeler iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci denemede, steril şartlar altında saf asetonda (*Merck*) çözdürülen saf fipronil stok solüsyonu kullanıldı. Fipronilin tavuk embriyoları üzerindeki etkilerine ait literatür bulunmadığı için yumurtalara enjekte edilen dozlar daha önce geniş doz aralıklarıyla yapılan ön denemelerde belirlendi. Ön denemelerde yumurtaya enjekte edilen 1000 µg/y (mikrogram/yumurta) ve 500 µg/y gibi yüksek dozlardaki fipronil aktif maddesinin yumurtalar açılırken hava boşluğunda iç zar üzerinde kristal şeklinde çökelti bıraktığı ve albümine ulaşmadığı gözlemlendi. Yüksek dozların 20 µl solüsyon hacminde çözünme sorunu oluşturması sebebiyle bu denemede dört doz kullanılmıştır. Her bir doz için deney solüsyonları, stok solüsyonun yine asetonda geometrik seyreltilmesiyle ve iyice karıştırılmasıyla

hazırlandı. Solüsyonlar enjeksiyon saatine kadar steril ve renkli minivial şişelerde 4°C'de saklandı. Birinci deneme için Tablo 1'de görülen deney grupları oluşturuldu. İkinci denemede steril bidistile saf suda sulandırılmış süspanse ticari fipronil solüsyonları kullanıldı. Ön denemelerde 2000 µg/y ve 1000 µg/y ticari fipronil dozları gibi yüksek dozlarda 20 µl solüsyon hacminde çözünme sorunları gözleendiği için ikinci denemede de dört doz kullanıldı ve Tablo 2'de görülen deney grupları oluşturuldu.

Kontrol grubu haricinde diğer gruplardaki yumurtaların küt uçları enjeksiyondan önce %96'lık etil alkollü pamukla silindi ve özel yumurta delicisi ile delindi. Enjeksiyonların ardından delikler derhal sıvı parafinle kapatıldı. Tüm enjeksiyonlar steril şartlar altında laminar flow kabinde, steril uçlu mikropipetle (*Eppendorf*), 20 µl/y (mikrolitre/yumurta) hacminde, hava boşluğu yoluyla ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Takiben yumurtalar 37.5°C'de, %65 nisbi neme sahip kuluçka makinesinde (*VGS*) ilk bir saat test solüsyonlarının diffüze olabilmesi için dik konumda bekletildikten sonra, her iki saatte bir kez 180° çevrilerek inkübe edildi.

Yumurtalar kuluçka makinesine yerleştirilmelerinden 15 gün sonra tartılarak küt uçlarından açıldı ve embriyoların canlı olup olmadıkları belirlendi. Takiben ekstraembriyonik keselerinden ayrılan ölü ve canlı embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton [10] skalasına (HH-skalası) göre belirlendi. Bununla birlikte yumurtalar kuluçkanın 15. gününde açıldığı için ilk üç günde ölen embriyolarda meydana gelen bozulmalardan dolayı, kesin bir evre tespiti yapılamadı ve bu dönemdeki ölümler Erken Embriyonik Ölüm (EEÖ) olarak belirtildi. Canlı embriyolar hassas terazi ile tartıldı ve tepe-kıç mesafeleri (Crown-Rump Length, CRL) saat başlı bir kumpasla ölçüldü. Rölatif embriyo ağırlıkları aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Rölatif embriyo ağırlığı} = \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \times 100$$

Malformasyonlar ve gelişim geriliklerinin tespiti için %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklanan canlı ve ölü embriyolarda çeşitli malformasyon varlığı çıplak göz ve stereo mikroskop yardımıyla incelenerek belirlendi. Genel gelişme geriliği sadece canlı embriyolarda dikkate alındı. Gerekli görülen embriyoların fotoğrafları çekildi.

Denemelerde kontrol gruplarında doğal ölümler gözleendiği için LD₅₀ tayininde, her grup için Abbott formülüne göre düzeltilmiş mortalite değerleri kullanıldı. Saf ve ticari fipronilin LD₅₀ değerleri, düzeltilmiş mortalite değerlerinin probit değerlere transforme edilerek regresyon analizi uygulanmasıyla tayin edildi [11]. Kontrol grubu ve diğer grupların anormal ve ölü embriyo oranları arasındaki farklar t-testiyle (bağımsız iki grup oran testi) karşılaştırıldı [12]. Kontrol grubu ve diğer gruplara ait canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyo CRL değerleri için nonparametrik Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için bu teste ait ikili karşılaştırmalar yapıldı [13].

Araştırma Sonuçları

Birinci denemede kontrol grubu yumurtalarında kuluçkanın 15. gününde oluşan ağırlık kaybı %11.00, ikinci denemede %10.20 olarak gerçekleşmiştir. Bu denemelerde kullanılan yumurtalardaki infertilite ise %5.83 olarak hesaplanmıştır.

Birinci ve ikinci denemeye ait grupların fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 3 ve 4'de verilmiştir. Hem kontrol gruplarındaki (Şekil 1a ve Şekil 2a) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormali göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 15. gününde HH-skalasına uygun olarak 41. evrede gerçekleşmiştir. Saf fipronil kullanılarak gerçekleştirilen birinci denemeye ait deney gruplarında parmaklar ve boyunda çarpıklık, iç organları dışa dönük yapışık çift vücut, ödem, tek kanat gelişmemesi, tek ve çift göz anormalliği gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 1b-h). Ticari fipronil kullanılarak gerçekleştirilen ikinci denemeye ait deney gruplarında ise genel gelişme geriliği, fokal ve yaygın hemoraji ve ödem gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 2b-d). Bununla birlikte Tablo 3 ve 4'de görüldüğü gibi negatif kontrol, saf ve ticari fipronil gruplarında görülen anomalilerin sıklığı kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermemektedir ($p>0.05$). Negatif kontrol, 31.25 µg/y saf fipronil ve 50 µg/y ticari fipronil gruplarının mortaliteleri kontrol gruplarının mortalitelerinden fark göstermezken, 62.50, 125 ve 250 µg/y saf fipronil ile 125, 250 ve 500 µg/y ticari fipronil gruplarının mortaliteleri kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 3 ve 4).

Şekil 3'de görüleceği gibi saf fipronilin tavuk embriyolarının mortalitesi üzerindeki etkisi lineer bir doz-cevap ilişkisine sahip iken, ticari fipronil nonlineer bir doz-cevap ilişkisine sahiptir. Artan doza bağlı olarak ölüm oranı artmaktadır ancak kullanılan bu dozlarda %100'e yakın yüksek bir ölüm oranı gözlenmemiştir. LD₅₀ tayininde Tablo 3 ve 4'de görülen düzeltilmiş ölüm oranları kullanılmıştır. Regresyon analizi sonuçlarına göre kuluçka öncesi hava boşluğuna enjekte edilen saf fipronilin tavuk embriyoları için LD₅₀ değeri 161 µg/y (Şekil 4), ticari fipronilin tavuk embriyoları için LD₅₀ değeri ise 383 µg/y (Şekil 5) olarak belirlenmiştir.

Birinci denemeye ait ölü embriyoların HH-skalasına göre gelişme evreleri dağılımı Tablo 5'de, ikinci denemeye ait olanlar Tablo 6'da gösterilmiştir. Saf fipronille gerçekleştirilen birinci denemede tüm dozlarda ve negatif kontrol aseton grubunda ölümlerin özellikle erken dönemde HH-skalasına göre ilk 20 evrede diğer bir deyişle kuluçkanın ilk üç gününde gerçekleştiği dikkat çekmektedir (Tablo 5). Ticari fipronille gerçekleştirilen ikinci denemede ise ölümler en yüksek dozda yine erken dönemde yoğunlaşırken, düşük dozlarda daha geç evrelere yayılmıştır (Tablo 6).

Birinci denemeye ait gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri Tablo 7'de, ikinci denemeye ait sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. Her iki denemede de negatif kontrol, saf ve ticari fipronil gruplarında embriyoların canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile CRL değerlerinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma söz konusudur. Bununla birlikte negatif kontrol grupları ile kontrol grupları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu, saf ve ticari fipronil gruplarının ise tüm dozlarda kontrol grubundan önemli düzeyde fark gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.001$, Tablo 7 ve 8).

Tartışma ve Sonuç

İlaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler ve pestisitlerin embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla tercih edilen materyallerden biridir. Bu amaçla Jelinek [14] döllü tavuk yumurtası kullanılarak Tavuk Embriyotoksitesisi Belirleme Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST), Kemper ve Luepke [15] Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark. [16] Döllü Tavuk Yumurtası Belirleme Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) ve Wolf ve Luepke [17] Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) geliştirmişlerdir. Bu testler kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Tavuk embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi önemli bir diğer avantajdır. Çok sayıda tavuk embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlamaktadır. Aynı zamanda daha sonra memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta, canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalara ile Hayvan Haklarını Koruma Kanununa da aykırı düşmemektedir. CHEST'den elde edilen sonuçların memelilere uyarlanabilmesinin yanı sıra, CHEST ve HET'den elde edilen sonuçların memelilerden elde edilen sonuçlarla büyük oranda uyumlu olduğu bildirilmiştir [14-22].

Organik klorlular [23-26], organik fosforlular [27-39], karbamatlar [40], piretroitler [41], fumigantlar [42,43] ve kitin sentez inhibitörleri [44] gibi klasik insektisitlerin kanatlı embriyoları üzerindeki embriyotoksik ve teratojenik etkilerine ait çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, fenil pirazol grubuna ait yeni nesil insektisitlerin etkilerine ait literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksikite çalışmalarında test edilecek maddenin yumurtaya verilmesinde hava boşluğuna, embriyonun kaudal bölgesine, albümine ve yumurta sarısına enjeksiyon yöntemleri denenmiş, bu çalışmada hava boşluğuna enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olması ve diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava boşluğuna enjeksiyon yöntemi ideal kabul edilmektedir [45,46].

Enjeksiyon zamanı için, test edilecek maddenin embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa çok erken embriyonik dönemde, test edilen maddenin karaciğerde metabolize

edilmesi sonucu oluşacak metabolitlerinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa daha geç dönemde yapılacak enjeksiyonun tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir [18,47]. Özcan [20] gıda katkı maddeleri ve pestisitlerin teratojenik etkilerini belirlemek için kuluçka başlangıcında hava boşluğu veya yumurta sarısına enjeksiyonu, ilaçların teratojenik etkilerini belirlemek için ise kuluçkanın 3. ve 4. gününde enjeksiyon yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Tavuk embriyosunda karaciğer farklılaşması embriyonik dönemin 4. günüdür [48]. Wolf ve Leupke [17] kanatlılarda karaciğerin erken farklılaşmasına bağlı olarak, memeli embriyosunun aksine kanatlı embriyosunun gelişiminin erken evrelerinde de yoğun bir metabolik aktivasyon bulunduğunu vurgulamışlar ve promutajenlerin etkisini belirlemek için enjeksiyonları 8. günde gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada fipronilin metabolize olmamış yani doğal (intact, native) formunun etkilerinin belirlenmesi amaçlandığından, kuluçka öncesi dönemdeki enjeksiyon tercih edilmiştir.

Enjekte edilecek solüsyon hacmi için çeşitli çalışmalarda 3-100 µl/y kullanılırken, hava boşluğuna yapılacak enjeksiyonlar için Çelik ve ark. [49] 20 µl'den daha fazla hacimdeki test solüsyonunun yumurta içi basıncı artırarak embriyonik ölümlere sebep olabileceğini ve bu durumun test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmesi dikkate alınarak bu çalışmada 20 µl/y solüsyon hacmi kullanılmıştır.

Jelinek ve ark. [18] tavuk yumurtası ile yaptıkları embriyotoksitesite çalışmalarında her grup için 6-10 yumurta kullanırken, Kemper ve Luepke [15] ve Prelusky ve ark. [47] sonuçların güvenilirliği açısından her grup için en az 20 yumurta kullanılmasını önermişler, bu çalışmada da gruplar 20'şer yumurtadan oluşturulmuştur.

Denemelerde kontrol grubu yumurtalarında kuluçka boyunca oluşan ağırlık kaybı önerilen oranlara [50] yakındır. Bu durum kuluçka şartlarının optimal olduğunu göstermektedir.

Bir deney hayvanı grubunun %50'sini öldürebilen bir kimyasal maddenin tek bir dozunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi olan LD₅₀ tayininde Trevan yöntemi, Behrens Karber yöntemi, Miller Tainter yöntemi ve Litchfield Wilcoxon yöntemi gibi yöntemler uygulanmaktadır [51]. Bu çalışmada hem saf hem de ticari fipronille yapılan denemelerde %100'e yakın yüksek bir ölüm oranı gözlenmediği için regresyon analizi tercih edilmiştir. Saf fipronilin LD₅₀ değeri ticari fipronilden çok daha düşük bulunmuş, diğer bir deyişle saf fipronil daha güçlü toksik etki göstermiştir. Bu durum fipronil aktif maddesi için en iyi çözücü olan asetonda (545.9 g/l) [2] çözdürülmesi ile ilişkili olabilir. Asetonda iyi çözünme toksik etkiyi artırmıştır. Ameenuddin ve Sunde [52] tavuk embriyotoksitesite testlerinde kullanılacak olan çözücünün seçiminde, öncelikle test edilecek maddenin o çözücünde çok iyi çözünmesine, daha sonra çözücünün uygun seviyede toksisiteye sahip olmasının önemine dikkat çekmiştir. Aseton (negatif kontrol) grubundaki mortalite ve anormal embriyo oranının kontrol grubundan önemli fark göstermemesi asetona bu çalışmada ideal bir çözücü olduğuna işaret etmektedir. Pestisit aktif maddeleri zirai mücadelede zararlılara karşı daha emniyetli, daha ekonomik, insan ve çevre sağlığı açısından daha az zararlı olacak şekilde bazı yardımcı maddeler (emülgatörler ve dolgu maddeleri gibi) ile karıştırılarak ticari formülasyon şeklinde kullanılır [53]. Fipronilin ticari formülasyonunda bulunan yardımcı maddeler ve ticari formülasyonun sulandırılarak kullanılması embriyotoksitesitesini etkilemiş olabilir. İnsektisit olarak kullanılan ticari formülasyonun daha düşük toksisiteye sahip olması hedef olmayan canlılara daha az zarar vereceği için arzu edilen bir durumdur. Benzer şekilde ticari formülasyonun sıçanlar üzerinde yapılan laboratuvar testlerinde çok az nörotoksik etkiye sahip olduğu, saf fipronilin ise çok daha kuvvetli nörotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [1].

Hem saf hem de ticari fipronil gruplarında anormal embriyolar gözlenmekle birlikte anormal embriyo oranları kontrol gruplarından önemli düzeyde fark göstermemiştir. Bu durum fipronilin tavuklar üzerinde teratojenik bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Yüksek dozlardaki fipronille sıçanlarda yapılan üreme çalışmalarında da teratojenik etki gözlenmemiş, ancak yavru boyutlarında ve vücut ağırlığında azalma ve fiziksel gelişmede gecikmelerin söz konusu olduğu bildirilmiştir [1,6]. Bu çalışmada ise saf ve ticari fipronilin tüm dozlarında embriyoların canlı ve rölatif ağırlıkları ile CRL değerleri kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azalmıştır. Bu sonuçlar fipronilin tavuklarda da önemli düzeyde embriyotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Fipronilin embriyotoksik etkisine işaret eden bir diğer nokta ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaşmasıdır. Saf fipronille gerçekleştirilen denemede dozlardaki artışa paralel olarak tüm dozlarda, ticari fipronille gerçekleştirilen denemede ise en yüksek dozda embriyo ölümleri özellikle HH-skalasına göre ilk üç günde meydana gelmiştir. Bu durum, mitoz bölünme

ve hücre farklılaşmasının son derece hızlı olduğu erken gelişme evrelerinde, embriyonun fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı son derece duyarlı olmasıyla açıklanabilir. Kuluçkanın ilk üç gününde ortaya çıkan ve embriyonal gelişmeyi bozan etkiler, embriyonik ölümlere sebep olmaları yanında, önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olmaktadır [54]. Daha geç dönemlerdeki ölümler ise albümine bağlanan fipronilin, albüminin embriyo tarafından kullanılması sonucu etkisini daha geç göstermesinden ileri gelebilir.

[phenyl(U)-¹⁴C]-fipronil kullanılarak yapılan kanatlı metabolizma çalışmasında fipronil yumurtacı tavuklara oral yolla üç farklı dozda 28 gün boyunca uygulanmıştır. Deney sonunda fipronil kalıntılarında tavuk dokuları içerisinde en çok yağ dokuda rastlanmış, bunun yanı sıra yumurtalarda da yüksek oranda belirlenmiştir [55]. Diğer bir deyişle fipronilin yağ dokuda birikimi ve yumurtaya geçişi söz konusudur. Sonuçlarımız hem saf hem de ticari fipronilin metabolize olmamış doğal formlarının tavuk embriyoları üzerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde teratojenik etkiye sahip olmadıklarını, bununla birlikte embriyotoksik etkiye sahip olduklarını göstermektedir. Fipronilin metabolitlerinin tavuklar üzerindeki olası teratojenik ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi için daha geç embriyonik dönemlerde enjeksiyon yapılan çalışmalara, fipronilin olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi için ise HET-MN [17] çalışmalarına ihtiyaç vardır. Elde edilen ve elde edilecek veriler fipronilin kimyasal mücadelede insektisit olarak kullanımının hedef olmayan canlılar üzerindeki olumsuz etkilerine, bunun yanı sıra kümes hayvancılığında tavuklarda pire ve keneye karşı kullanımına ışık tutacaktır.

Kaynaklar

1. Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S. and King, W.J. **Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns.** Rev. Environ. Contam. Toxicol. 176: 1-66 (2003)
2. Tomlin, C.D.S. **The pesticide manual 2000.** British Crop Protection Council, Twelfth Edition (2000)
3. Aydınoglu, H., Dursun, H.Y. ve Bayraktar, L. **Bitki Koruma Ürünleri.** T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara (2002)
4. Ishaaya, I. **Biochemical processes related to insecticide action: An overview.** In: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Ishaaya, I. (ed.) Springer-Verlag Berlin, pp. 1-16 (2001)
5. Casida, J.E. and Quistad, G.B. **Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects.** J. Pestic. Sci. 29: 81-86 (2004)
6. Hovda, L.R. and Hooser, S.B. **Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats.** Vet. Clin. Small Anim. 32: 455-467 (2002)
7. USEPA. **Fipronil pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005.** U.S. Environmental Protection Agency. Washington, USA (1996)
8. ACP. **Evaluation of fipronil use as a public hygiene insecticide.** Advisory Committee on Pesticides. Food and Environment Protection Act 1985, part III. Control of Pesticides Regulations 1986. No. 187. Issue No. 52. Pesticides Safety Directorate, MAFF, York, UK (1999)
9. Hamon, N.M., Gamboa, H. and Garcia, J.E.M. **Fipronil: A major advance for the control of boll weevil in Columbia.** In: Herzog, G.A. Hardee, D.A. (chairs), Ottens, R.J., Ireland, C.S., Nelms, J.V. (eds.). Proceedings, Beltwide Cotton Conferences USA, Vol. 2, Jan. 9-12 1996, Nashville, T.N. Cotton Insect Research and Control Conference. N.C.C., Memphis, TN, pp. 990-994 (1996)
10. Hamburger, V. and Hamilton, H.L. **A series of normal stages in the development of chick embryo.** J. Morphol. 88: 49-92 (1951)
11. Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V. **Biyoistatistik.** Hatipoğlu Yayınevi, 3. Baskı, Ankara (1990)
12. Fischer, L.D. and Van Belle, G. **Biostatistics: A Methodology for The Health Sciences.** John Wiley&Sons, New York (1993)
13. Conover, W.J. **Practical Nonparametric Statistics.** Second Edition, John Wiley&Sons, New York (1980)

14. Jelinek, R. **The chick embryotoxicity screening test (CHEST)**. In: Methods in prenatal toxicology. Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.), Georg Thieme, Stuttgart, pp. 381-386 (1977)
15. Kemper, F.H. and Luepke, N.P. **Toxicity testing by the hen's egg test (HET)**. *Fd. Chem. Toxic.* 24 (6/7): 647-648 (1986)
16. Nishigori, H., Mizumura, M. and Iwatsuru, M. **The hen's fertile egg screening test (HEST): A comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodents of 20 drugs**. *Cell Biol. Toxicol.* 8 (4): 255-265 (1992)
17. Wolf, T. and Luepke, N.P. **Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity**. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 394: 163-175 (1997)
18. Jelinek, R., Peterka, M. and Rychter, Z. **Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested**. *Indian J. Exp. Biol.* 23: 588-595 (1985)
19. Vesely, D. and Vesela, D. **The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals**. *Vet. Med. Praha.* 36 (3): 175-181 (1991)
20. Özcan, M. **Hidrokinon'un gelişim toksitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi**. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (1992)
21. Jelinek, R. and Marhan, O. **Validation of chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study**. *Funct. Dev. Morphol.* 4 (4): 317-323 (1994)
22. Davies, W.J. and Freeman, S.J. **Chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II)**. In: Methods in Molecular Biology. In vitro toxicity testing protocols. O'Hare, S. and Atterwill, C.K. (eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43: 307-310 (1995)
23. Bryan, T.E., Gildersleeve, R.P. and Wiard, R.P. **Exposure of Japanese quail embryos to o,p'-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology, and feather morphology**. *Teratology* 39: 525-535 (1989)
24. Seifert, J. **Teratogenesis of polychlorocycloalkane insecticides in chicken embryos resulting from their interactions at the convulsant recognition sites of the GABA (Pro) Receptor Complex**. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 42: 707-715 (1989)
25. Powell, D.C., Aulerich, R.J., Meadows, J.C., Tillitt, D.E., Giesy, J.P., Stromberg, K.L. and Bursian, S.J. **Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) injected into the yolks of chicken (*Gallus domesticus*) eggs prior to incubation**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31 (3): 404-409 (1996)
26. Powell, D.C., Aulerich, R.J., Meadows, J.C., Tillitt, D.E., Stromborg, K.L., Kubiak, T.J., Giesy, J.P. and Bursian, S.J. **Organochlorine contaminants in double-crested cormorants from Green Bay, Wisconsin: II. Effects of an extract derived from cormorant eggs on the chicken embryo**. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 316-322 (1997)
27. Paul, B.S. and Vadlamudi, V.P. **Teratogenic studies of fenitrothion on white leghorn chick embryos**. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 15 (2): 223-229 (1976)
28. Schom, C.B. and Abbott, U.K. **Temporal, morphological, and genetic responses of avian embryos to azodrin, an organophosphate insecticide**. *Teratology* 15 (1): 81-87 (1977)
29. Meiniel, R., Lavergne, J. and Autissier-Navarro, C. **Teratogenic effect of dicrotophos on the embryonic chick tibia; histological and cytological studies**. *Toxicol. Eur. Res.* 2 (3): 133-140 (1979)
30. Rashev, Z. and Vasilev, V.K. **Teratogenic effect of the pesticide preparation metathion**. *Vet. Med. Nauki* 19 (1): 79-89 (1982)
31. Misawa, M., Doull, J. and Uyeki, E.M. **Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone**. *J. Toxic. Env. Heal.* 10 (4-5): 551-563 (1982)
32. Wyttenbach, C.R. and Hwang, J.D. **Relationship between insecticide-induced short and wry neck and cervical defects visible histologically shortly after treatment of chick embryos**. *J. Exp. Zool.* 229: 437-446 (1984)

33. Varnagy, L. and Deli, E. **Comparative teratological study of insecticide wofatox 50 EC (%50 methyl-parathion) on chicken and pheasant fetuses.** Anat. Anz. 158: 1-3 (1985)
34. Garrison, J.C. and Wyttenbach, C.R. **Notochordal development as influenced by the insecticide dicrotophos (Bidrin).** J. Exp. Zool. 234: 243-250 (1985)
35. Rao, J.V., Swamy, A.N., Yamin, S., Rao, S.H. and Rahman, M.F. **Teratism induced in the developing chick by RPR-V, an organophosphate.** Fd. Chem. Toxic. 30 (11): 945-951 (1992)
36. Kumar, K.B. and Devi, K.S. **Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos.** Vet. Hum. Toxicol. 34 (5): 408-410 (1992)
37. Lenselink, D.R., Midtling, J.E. and Kolesari, G.L. **Teratogenesis associated with oxydemeton-methyl in the stage 12 chick embryo.** Teratology 48: 207-211 (1993)
38. Varga, T., Cravedi, J-P., Füzesi, I. and Varnagy, L. **Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide.** Revue Med. Vet. 153: 275-278 (2002)
39. Sahu, C.R. and Ghatak, S. **Effects of dimecron on developing chick embryo: malformations and other histopathological changes.** Anat. Histol. Embryol. 31: 15-20 (2002)
40. Farage-Elawar, M. and Blaker, W.D. **Chick embryo exposure to carbamates alters neurochemical parameters and behavior.** J. Appl. Toxicol. 12 (6): 421-426 (1992)
41. David, D. **Influence of technical and commercial decamethrin, a new synthetic pyrethroid, on the gonadic germ population in quail embryos.** Arch. d'Anat. d'Hist. d'Embryol. Norm. Exp. 65: 99-110 (1982)
42. Dusek, Z., Holejsovska, I., Novotna, B. and Zemanova, Z. **Embryotoxicity of 1,2-dibromoethane in chick embryos in ovo: early and late effects.** Eur. J. Morphol. 39 (2): 105-112 (2001)
43. Dusek, Z., Novotna, B., Vodickova, L., Naprstkova, I., Dostal, M. and Vilhelmova, M. **Effects of 1,2-dibromoethane on haematopoiesis in the chick embryo.** Xenobiotica 33 (4): 443-458 (2003)
44. El-Sayyad, H.I., El-Gammal, S.A. and Kariem, S.A. **Some aspects of growth deformities of chick embryos induced by flufenoxuron.** J. Union. Arab. Biol. 5 (A): 313-329 (1996)
45. Sur, E. **Yumurtaya verilen Aflatoksin B1 (AFB1)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması.** Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya (2001)
46. Öznurlu, Y. **Yumurtaya verilen Aflatoksin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.** Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya (2003)
47. Prelusky, D.B., Hamilton, R.M.G., Foster, B.C., Trenholm, H.L. and Thompson, B.K. **Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites.** J. Assoc. Off Anal. Chem. 70 (6): 1049-1055 (1987)
48. Hamilton, J.W., Denison, M.S. and Bloom, S.E. **Development of basal and induced aryl hidrocarbon (benzo[α]pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo *in ovo*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3372-3376 (1983)
49. Çelik, I., Oguz, H., Demet, O., Boydak, M., Dönmez, H.H., Sur, E. and Nizamlioglu, F. **Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus NRLL 2999.** Br. Poult. Sci. 41 (4): 401-409 (2000)
50. Mauldin, J.M. **Quality control procedures for the hatchery.** Poult. Sci. 93 (1): 1-24 (1993)
51. Tuncer, A. **Zaman aşımında ilaç aktivitesindeki değişikliklerin LD50 tayin yöntemiyle araştırılması.** Yüksek Lisans Tezi, T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne (2002)
52. Ameenuddin, S. and Sunde, M.L. **Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175: 176-178 (1984)
53. SBYKP. **Kimya Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Tarım İlaçları Alt Komisyon Raporu.** Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı. DPT: 2591-ÖİK: 603. Ankara (2001)

54. Kucera, P. and Burnand, M.B. **Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro.** Teratogen. Carcin. Mut. 7: 427-447 (1987)
55. USEPA. **Fipronil for use on rice (Regent, Icon) and pets (Frontline). HED risk assessment.** United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C., Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (1998)

Tablo 1. Birinci denemede oluşturulan gruplar ve yumurtalara uygulanan işlemler ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$)

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=20)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif Kontrol (Aseton) (n=20)	20 μl hacminde saf aseton enjekte edildi.
31.25 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözündürülmüş 31.25 μg saf fipronil enjekte edildi.
62.50 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözündürülmüş 62.50 μg saf fipronil enjekte edildi.
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözündürülmüş 125 μg saf fipronil enjekte edildi.
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözündürülmüş 250 μg saf fipronil enjekte edildi.

Tablo 2. İkinci denemede oluşturulan gruplar ve yumurtalara uygulanan işlemler ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$)

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=20)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif Kontrol (Bidistile su) (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile saf su enjekte edildi.
50 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile saf suda sulandırılmış 50 μg ticari fipronil enjekte edildi.
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile saf suda sulandırılmış 125 μg ticari fipronil enjekte edildi.
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile saf suda sulandırılmış 250 μg ticari fipronil enjekte edildi.
500 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile saf suda sulandırılmış 500 μg ticari fipronil enjekte edildi.

Tablo 3. Birinci denemede gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen sonuçlar ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$)

Gruplar	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%) [*]	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)	Düzeltilmiş Mortalite (%)
Kontrol	20	0	0	1	5.00	-
Negatif Kontrol (Aseton)	19	0	0	3	15.79	-
31.25 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil	19	2	10.53	5	26.32	22.30
62.50 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil	18	2	11.11	6	33.33 ^{**}	29.70
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil	20	2	10.00	8	40.00 ^{**}	36.70
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil	18	1	5.56	12	66.67 ^{**}	64.80

^{*}Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

^{**}Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 4. İkinci denemedeki gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen sonuçlar ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$)

Gruplar	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%) [*]	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)	Düzeltilmiş Mortalite (%)
Kontrol	18	0	0.00	1	5.56	-
Negatif Kontrol (Bidistile su)	19	1	5.26	1	5.26	-
50 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil	20	2	10.00	5	25.00	20.60
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil	19	2	10.53	6	31.58**	27.60
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil	18	0	0.00	8	44.44**	41.20
500 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil	18	1	5.56	11	61.11**	58.90

^{*}Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$).

^{**}Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 5. Birinci denemedeki gruplarda HH-skalasına göre gelişim evreleri belirlenen ölü embriyoların sayıları ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$, EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm)

Gruplar	HH-Skalasına Göre Evreler					
	HH-1-20 (EEÖ)	HH-22	HH-30	HH-36	HH-37	HH-39
Kontrol (n=1)	1	-	-	-	-	-
Negatif Kontrol (Aseton) (n=3)	3	-	-	-	-	-
31.25 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=5)	4	-	-	-	1	-
62.50 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=6)	4	-	-	-	-	2
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=8)	6	-	-	1	1	-
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=12)	10	1	1	-	-	-

Tablo 6. İkinci denemedeki gruplarda HH-skalasına göre gelişim evreleri belirlenen ölü embriyoların sayıları ($\mu\text{g}/\text{y}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$, EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm)

Gruplar	HH-Skalasına Göre Evreler							
	HH-1-20 (EEÖ)	HH-21	HH-26	HH-27	HH-28	HH-33	HH-35	HH-38
Kontrol (n=1)	1	-	-	-	-	-	-	-
Negatif Kontrol (Bidistile su) (n=1)	-	-	-	1	-	-	-	-
50 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=5)	2	-	1	-	-	-	1	1
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=6)	3	-	1	-	-	-	2	-
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=8)	2	-	-	-	1	1	4	-
500 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=11)	8	1	-	-	1	-	1	-

Tablo 7. Birinci denemede gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen ortalama ağırlık ve uzunluk ölçüm sonuçları ($\mu\text{g}/\text{y}$ =mikrogram/yumurta, CRL: Tepe-kıç uzunluğu)

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$	Rölatif embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$	CRL (mm) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$
Kontrol (n=19)	11.92 \pm 1.83	21.99 \pm 3.59	61.43 \pm 2.42
Negatif Kontrol (Aseton) (n=16)	10.98 \pm 1.09	20.33 \pm 1.99	60.52 \pm 1.74
31.25 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=14)	9.61 \pm 1.39*	18.07 \pm 2.88**	59.24 \pm 2.26 [†]
62.50 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=12)	9.52 \pm 1.68*	17.47 \pm 3.10**	57.88 \pm 2.22 [†]
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=12)	10.00 \pm 1.69*	18.45 \pm 3.63**	59.76 \pm 1.56 [†]
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ saf fipronil (n=6)	8.92 \pm 1.18*	16.40 \pm 2.43**	57.33 \pm 2.23 [†]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=26.918, $p<0.001$)

**Rölatif embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.685, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=26.197, $p<0.001$)

Tablo 8. İkinci denemede gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen ortalama ağırlık ve uzunluk ölçüm sonuçları ($\mu\text{g}/\text{y}$ =mikrogram/yumurta, CRL: Tepe-kıç uzunluğu)

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$	Rölatif embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$	CRL (mm) $\bar{x} \pm \text{S.S.}$
Kontrol (n=17)	11.69 \pm 1.00	21.36 \pm 2.09	61.88 \pm 2.89
Negatif Kontrol (Bidistile su) (n=18)	11.03 \pm 1.56	19.97 \pm 2.80	61.51 \pm 1.81
50 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=15)	9.63 \pm 1.11*	17.70 \pm 2.10**	59.45 \pm 1.34 [†]
125 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=13)	9.84 \pm 1.36*	18.02 \pm 2.35**	59.43 \pm 1.90 [†]
250 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=10)	10.55 \pm 0.53*	19.14 \pm 1.11**	59.63 \pm 0.91 [†]
500 $\mu\text{g}/\text{y}$ ticari fipronil (n=7)	9.59 \pm 0.89*	17.29 \pm 1.86**	57.73 \pm 3.54 [†]

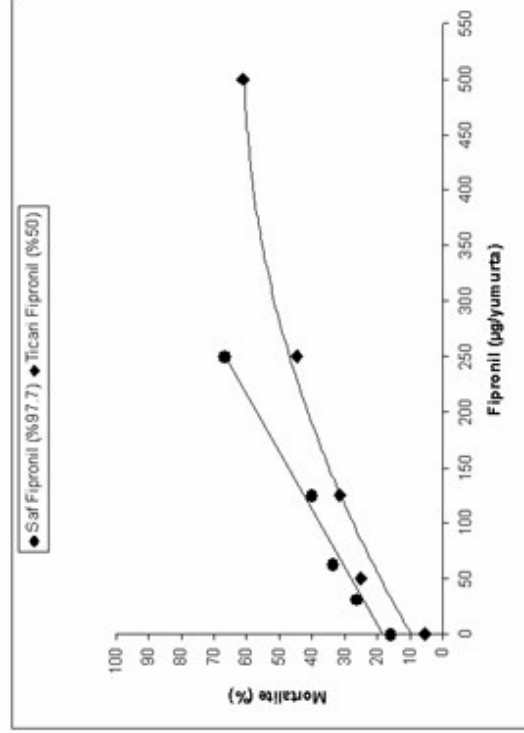
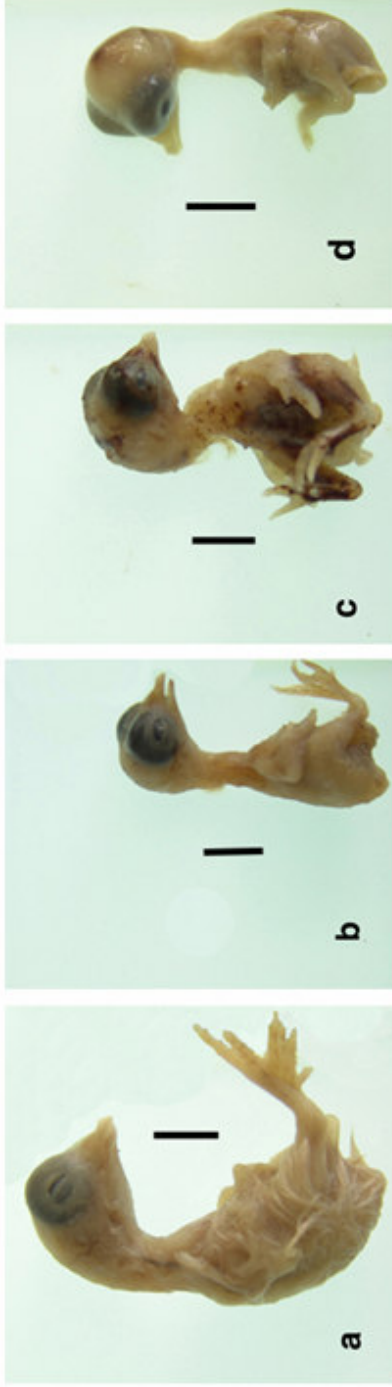
*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=27.921, $p<0.001$)

**Rölatif embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.797, $p<0.001$)

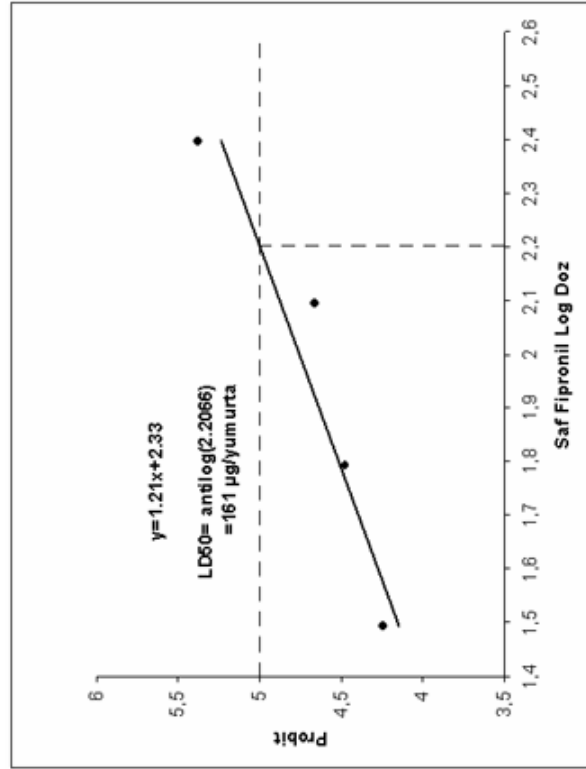
[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=32.856, $p<0.001$)



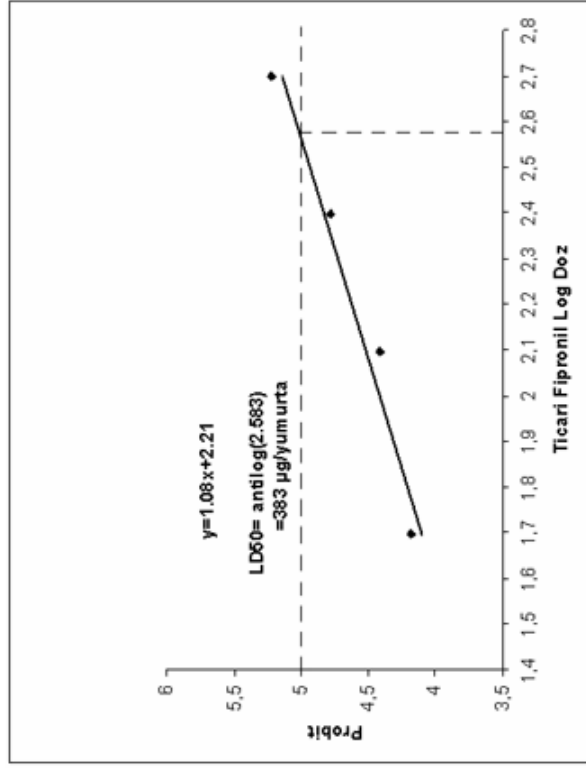
Şekil 1. a) Kontrol grubundan bir embriyo b) 31.25 µg/y (mikrogram/yumurta) saf fipronil grubundan iç organları dışı dönük, yapışık çift vücutlu embriyo c) 31.25 µg/y saf fipronil grubundan boyun ve parmaklarda çarpıklık gözlenen embriyo d) 62.50 µg/y saf fipronil grubundan aşırı ödemli bir embriyo e) 62.50 µg/y saf fipronil grubunda hafif şişlik ve parmaklarda çarpıklık gözlenen embriyo f) 125 µg/y saf fipronil grubundan bir kanadı gelişmeyen embriyo g) 125 µg/y saf fipronil grubundan çift göz anormallığı ve çarpık gaga gözlenen embriyo h) 250 µg/y saf fipronil grubundan tek göz anormallığı ve çarpık gaga gözlenen embriyo (Bar=1 cm).



Şekil 3. Saf ve ticari fipronilin doz-cevap ilişkisi



Şekil 4. Tavuk embriyolarında regresyon analizi ile saf fipronilin LD₅₀ değeri



Şekil 5. Tavuk embriyolarında regresyon analizi ile ticari fipronilin LD₅₀ değeri

