

ACUTE BEHAVIORAL CHANGES IN THE GUPPY (*Poecilia reticulata*) EXPOSED TO TEMEPHOS

Mahmut SELVİ*, Rabia SARIKAYA, Figen ERKOÇ
Gazi University Faculty of Education Department of Biology
06500 Teknikokullar, Ankara, TURKEY, e-mail: mselvi@gazi.edu.tr

ABSTRACT

Temephos is an organophosphorus insecticide used to control mosquito, midge and black fly larvae. This study was aimed to determine the acute toxicity of temephos on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). Guppy fish (*Poecilia reticulata*) were selected for the bioassay experiments. Behavioral changes at each temephos concentration were recorded. The experiments were repeated 3 times. The 96 h acute toxicity range of temephos to adult male guppies was within 10 and 100 mg/l (mean >50 mg/l). At 100 mg/l dose, all fish died within 96 hours. In addition, no changes in behavior were observed at the lowest concentration of 1 mg/l. Water temperature was regulated at 21±1°C. Moreover, behavioral changes at each temephos concentration were observed for the individual fish.

Key Words: Acute toxicity; Guppy; Temephos; Bioassay; Organophosphorus insecticide, Behavioral changes

TEMEFOSA MARUZ KALAN LEPİSTES (*Poecilia reticulata*) BİREYLERİNDEKİ AKUT DAVRANIŞ DEĞİŞİMLERİ

ÖZET

Temefos sivrisinek, tatarcık ve karasinek larvalarıyla mücadelede kullanılan organofosforlu insektisitlerden biridir. Bu çalışma temefosun akut toksisitesinin lepistes (*Poecilia reticulata*) bireylerindeki davranış değişimlerinin belirlenmesini amaçlamaktadır. Denemelerde kullanılmak üzere lepistes balıkları (*Poecilia reticulata*) seçilmiştir. Her bir konsantrasyondaki davranış değişiklikleri kaydedilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Temefosun yetişkin erkek lepisteslerde 96 saatlik akut toksisite değeri 10 ila 100 mg/l (ortalama >50 mg/l) arasındadır. 100 mg/l dozda, 96 saat sonunda tüm balıklar ölmüştür. Buna ilave olarak, en düşük konsantrasyon olan 1 mg/l' de davranış değişikliği bulunmamıştır. Denemeler süresince su sıcaklığı 21±1°C'de sabit tutulmuştur. Ayrıca insektisit'in herbir konsantrasyonunda balıklarda meydana gelen davranış değişimleri de gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut toksisite, Lepistes, Temefos, Biyodene, Organofosforlu insektisit, Davranış değişimleri.

1. GİRİŞ

Temefos sivrisinek, tatarcık ve karasinek larvalarıyla mücadelede kullanılan sistemik olmayan organofosforlu insektisitlerden biridir. Göller, göletler ve karasal alanlarda kullanılır. Ayrıca köpek ve kediler üzerindeki pirelerin ve insanlardaki bitlerin kontrolünde kullanılır.

Diğer organofosforlu insektisitlerde olduğu gibi temefos kolinesteraz olarak adlandırılan enzim grubunun aktivitesini inhibe etmektedir. Bu enzimlerin belirli tipleri sinir sistemi, beyin ve kan dahil yaygın olarak bulunmaktadır. Keskin maruz kalmanın semptomları diğer organofosforlu insektisitlerle benzerlik gösterir ve bu semptomlar bulantı, tükürük salgılama güçlüğü, baş ağrısı, kas koordinasyonu kaybı ve solunum güçlüğü olabilir (1).

Temefos sucul organizmalara karşı geniş bir toksisite

1. INTRODUCTION

Temephos is a non-systemic organophosphorus insecticide used to control mosquito, midge and black fly larvae. It is used in lakes, ponds and wetlands. It also may be used to control fleas on dogs and cats and to control lice on humans.

Typical of other organophosphate insecticides, temephos inhibits the action of the group of enzymes called cholinesterases. Specific types of these enzymes are found throughout the body including the nervous system, the brain, and the blood stream. Symptoms of acute exposure are also similar to other organophosphates and may include nausea, salivation, headache, loss of muscle coordination, and difficulty breathing (1).

Temefos shows a wide range of toxicity to aquatic

oranı göstermektedir. En hassas balık türü olan gökkuşağı alabalığına temefos için LC₅₀ değeri 0.16 ile 3.49 mg/kg arasındadır (1). Temefos için tespit edilen diğer LC₅₀ değerleri coho salmon için (0.35 mg/kg), largemouth bass için (1.44 mg/kg), channel catfish için (3.23 ile 10 mg/kg arasında), bluegill sunfish için (1.44 ile 21.8 mg/kg arasında), ve Atlantic salmon için (6.7 mg/kg ile 21 mg/kg) arasındadır (1,15).

Amfipodlar gibi bazı tatlısu omurgasızları ile midyeler gibi bazı deniz omurgasızları da oldukça yüksek miktarlarda temefosa maruz kalmaktadırlar (2). Temefosun LC₅₀ değeri *Gammarus lacustris* için 0.08 mg/kg'dır. Bu bileşik bir böcek öldürücüdür ve sivrisinek, karasinek ve tatarcıkların sucul yaşayan larvalarını kontrol etmek için etkin olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla sucul organizmalar için yüksek toksisite göstermesi şaşırtıcı değildir.

Temefosun, sucul organizmalarda birikme potansiyeli vardır. Bluegill sunfish suda var olan temefos konsantrasyonunun 2,300 katını biriktirir. Maruz kalma bittiğinde bileşiğin neredeyse %75'i balık tarafından dışarıya atılmaktadır (2).

Herhangi bir maddenin sucul sistem ve besin zinciri için tehlikeli olup olmadığına a) memeliler için akut toksisite b) bakteriler için akut toksisite c) balıklar için akut toksisite ve d) biyolojik ayrışabilirlik testleri yapıldıktan sonra karar verilebilir (3). Gerçekte, dünyanın birçok endüstrileşmiş bölgesinde kirlenmeye neden olan kimyasal kullanımının artması ekotoksikite ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesini mutlak bir zorunluluk haline getirmiştir (4).

Kimyasal maddelerin potansiyel risklerini ortaya koymak için ilk basamak alg, balık vb. üzerinde yapılan akut toksisite testleridir (5). İlk akut toksisite testleri bakteriler, *Cladocera* ve *Rotifera* gibi omurgasız hayvanlar ve diğer gruplar kullanılarak yapılmasına rağmen bu testler balıklarla yapılan çalışmaların yerini alamazlar. Burada önemli olan besin zincirinin son halkası olan balıklardaki toksisitedir (6).

Bu çalışmada, temefosun lepistes (*Poecilia reticulata*) bireylerindeki akut toksisitesinin belirlenmesinde statik test sistemi kullanılmış ve diğer balık türleri arasında farklılık gösteren toksisite oranı tespit edilmiştir. Ayrıca, her bir temefos konsantrasyonu için davranış değişimleri gözlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü Biyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Deneylerde kullanılan yetişkin erkek lepistesler Ankara'daki yerel yetiştiricilerden temin edilmiş ve yeterince hava içeren plastik torbalarda 30 dakika içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Plastik torbalar 30-35 dakika akvaryum içerisinde tutularak iklimlendirme yapılmıştır. Daha sonra torbalar kesilerek açılmış ve balıklar akvaryum suyu içerisine bırakılmıştır. Deneylerde yaklaşık 25 l kapasiteli cam akvaryumlar kullanılmıştır. Sıcaklık ısıtıcılar kullanılarak 21±1°C'de sabit tutulmuştur. Havalandırma dozlama sırasında

organizmalar. The most sensitive species of fish is the rainbow trout with a temefos LC₅₀ ranging from 0.16 to 3.49 mg/kg (1). Other LC₅₀ values for temefos are coho salmon (0.35 mg/kg), largemouth bass (1.44 mg/kg), channel catfish (3.23 to 10 mg/kg), bluegill sunfish (1.44 to 21.8 mg/kg), and Atlantic salmon (6.7 mg/kg to 21 mg/kg) (1,15).

Freshwater aquatic invertebrates such as amphipods are very highly susceptible to temefos as are some marine invertebrates such as mysids (2). The LC₅₀ of temefos for *Gammarus lacustris* is 0.08 mg/kg. Because the compound is an insecticide and is used effectively to control the aquatic larval stages of mosquitos, black flies and midges, its highly toxic nature to these organisms is not surprising.

Temefos has the potential to accumulate in aquatic organisms. The bluegill sunfish accumulated 2,300 times the concentration present in the water. Nearly 75% of the compound was eliminated from the fish after exposure ended (2).

The decision whether a certain xenobiotic is dangerous for the aquatic system and the food web, can only be made after the a) mammalian acute toxicity b) bacteria acute toxicity c) fish acute toxicity and d) biological dissociation tests have been carried out in detail (3). The fact that increasing use of contaminating chemicals in many industrialised parts of the world makes the development of ecotoxicity measurement techniques an absolute necessity (4).

The first step is the acute toxicity test on algae, fish etc. in order to show the potential risks of these chemicals (5). Although the initial aquatic toxicity tests were carried by the use of bacteria, invertebrates like Cladocera and Rotifera and other groups, they can in no way replace the actual test performed on fish. What is important is the toxicity in fish which is the last chain in the food web (6).

This study was conducted to determine the acute toxicity of temefos to the guppy (*Poecilia reticulata*) using the static test system, since the toxicity range differs considerably between fish species. In addition, behavioral changes at each temefos concentration were observed.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the Biology Laboratories of Department of Biology Education, Gazi Faculty of Education, Gazi University. Male, adult guppies were obtained from a local breeder in Ankara and brought to the laboratory within 30 minutes in plastic bags with sufficient air. The plastic bags were placed into the maintenance aquarium for about 30-35 minutes for acclimatization. Then the bags were cut open and the fish were allowed to swim into the aquarium water. Test chambers were glass aquaria of about 25 l capacity. Temperature was regulated at 21±1°C by using heaters. At the time of dosing air was turned off; it was on at all times otherwise. The water was

kapatılmış olup diğer zamanlarda ise açık tutulmuştur. Deneysel suyu balıklar içerisine konulmadan birkaç gün önce sürekli olarak havalandırılmış ve kloru giderilmiştir.

Deneysel 20 l çeşme suyu kullanılmıştır. Akvaryum suyunun özellikleri şu şekildedir; sıcaklık $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, çözülmüş oksijen 5.9 – 6.1 mg/l ve iletkenlik 0.200 – 0.245 mS, sertlik 21-24 FS⁰, total amonyak 0.017-0.021 mg/l, nitrit 0.008-0.009 mg/l, nitrat 0.11-0.16 mg/l.

Ön denemeleri takiben tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Havalandırılmalı akvaryum içerisinde bulunan deney hayvanlarından rasgele seçilerek her akvaryuma 10 birey konulmuştur. Deneysel 210 lepestes kullanılmıştır. 48 saatlik adaptasyondan sonra aseton içinde çözünen temefos, farklı konsantrasyonlarda deney akvaryumlarına eklenmiştir. Deneysel 24 saat öncesinde yemleme yapılmamıştır. Ölümle deneyin başlamasından 24, 48, 72 ve 96 saat sonra değerlendirilmiştir. Ölen bireyler derhal akvaryumlardan alınmıştır. Davranış değişimleri sıklıkla izlenmiştir.

Kullanılan temefos %90.3 teknik saflıkta olup, Hacettepe Üniversitesi İnksektisit Test Laboratuvarı'ndan (Ankara) temin edilmiştir. Teknik temefos stok solüsyon hazırlanana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ saklanmıştır. Stok solüsyon hazırlanırken önce temefos oda sıcaklığına getirilmiş daha sonra farklı miktarlarda tartılmış ve stok materyal aseton içerisinde çözülmüştür. Dozlama solüsyonları hazırlanırken stok solüsyon 1 mg/l, 10 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l, 60 mg/l, 70 mg/l ve 100 mg/l'lik konsantrasyonları verecek şekilde aseton ile dilüe edilmiştir. Dozlama hacmi hiçbir zaman 0.2 ml'yi aşmamıştır. Kontrol grubuna ise en yüksek dozun dilüsyonunda kullanılan aseton hacmi kadar aseton verilmiştir. Biyodenedeyde, seçilen türde akut toksisite oranı ve ortalama değer standart metoda (7) ve ulusal düzenlemelere göre belirlenmiştir (8).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Temefosun yetişkin erkek lepestes bireylerindeki 96 saatlik toksisite oranı 10 ile 100 mg/l (ortalama >50 mg/l) arasındadır. 100 mg/l'lik dozda 96 saat içerisinde tüm balıklar ölmüştür. Bu nedenle bu noktada kesin LC₅₀ değerini bildirmek mümkün değildir. Kontrol grubunda ölüm oranı sıfırdır. Bu sonuç temefosun lepestes bireylerine diğer balık türlerinden daha az toksik olduğunu göstermektedir. Diğer balık türleriyle yapılan çeşitli çalışmalarda akut toksisiteye neden olan değerlerin 0.010 mg/l - >50 mg/l arasında olduğu rapor edilmektedir. Bizim sonucumuz *Tilapia melanopleura* bireylerindeki 96 saatlik LC₅₀ değeri 30.2 (20.5- 44.20) mg/l ile yakınlık göstermektedir (9). Temefosun literatürde rapor edilen diğer balık türlerindeki akut toksisitesi Tablo 1'de gösterilmiştir (10).

Davranış değişiklikleri, potansiyel toksik etkilerin en duyarlı belirteçleridir. Optomotor cevaplar balıkların hareket örneklerindeki değişiklikleri anlamak için faydalıdır (11).

Akut toksisite testleri süresince lepesteslerin davranışsal cevapları 1-8 ve her 12 saatte gözlenmiştir. Kontrol grubu test süresince normal davranışlar göstermiştir. Davranış

continuously aerated for several days before putting the fish in, to remove chlorine.

Test chambers were filled with 20 l of tap water. Characteristics of this aquarium water were as follows; temperature $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, dissolved oxygen 5.9 – 6.1 mg/l and conductivity 0.200 – 0.245 mS, French hardness 21-24 FS⁰, total ammonia 0.017-0.021 mg/l, nitrite 0.008-0.009 mg/l, nitrate 0.11-0.16 mg/l.

Following the preliminary experiment, all determinations were repeated three times. Groups of experimental animals, each consisting of 10 individuals, were selected at random and placed into aerated aquaria. Total of 210 guppy fish were used in the experiment. After 48 hours of adaptation, the different concentrations of temephos in acetone were added to the experimental aquaria. During the last 24 hours of adaptation, and throughout the duration of the experiment, animals were not fed. Mortality was assessed at 24, 48, 72 and 96 hours after the start of the tests. Dead individuals were removed immediately. Behavioral changes were followed closely.

Technical grade (90.3%) temephos was from the Insecticide Testing Laboratory of Hacettepe University, Ankara. Technical temephos was stored at $+4^{\circ}\text{C}$ until stock solution preparation. Stock solution was prepared by bringing temephos to room temperature then weighing a certain amount and diluting it in acetone to give the stock material. Dosing solutions were prepared from this stock by diluting with acetone to give the dosing concentrations of 1 mg/l, 10 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l, 60 mg/l, 70 mg/l and 100 mg/l. The dosing volume never exceeded 0.2 ml. Control group received acetone at the maximum acetone volume used in the dilution of the dosing concentrations. The bioassay system, the selected species, acute toxicity range and mean value were as described in standardized methods (7) and the national regulation (8).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The 96 h acute toxicity range of temephos to adult male guppies was within 10 and 100 mg/l (mean >50 mg/l). At 100 mg/l dose, all fish died within 96 hours. Therefore at this point, it is not possible to report definitive LC₅₀ value. Control mortality was zero. The results show that temephos is highly toxic to other fish; but it is less toxic to guppies than to most other species. Values causing acute toxicity were in the range of 0.010 mg/l - >50 mg/l have been reported for various studies on other fish species. Our results are close to the 96 h *Tilapia melanopleura* LC₅₀ value, 30.2 (20.5- 44.20) mg/l (9). Table 1 shows that acute toxicity of temephos to other fish species as reported in the literature (10).

Behavioral changes are the most sensitive indication of potential toxic effects. Optomotor responses are very useful in evaluating of the behavioral changes of fish (11).

Observations of behavioral response of guppies were conducted at 1-8, and every 12 h during the acute toxicity tests. The control group showed normal behavior during the test period. The changes in behavioral response started 1 h after dosing. The 1 mg/l (lowest) concentration had similar behavior with the control group. Observed

değişimleri dozlamadan bir saat sonra başlamıştır. En düşük konsantrasyon olan 1 mg/l'de kontrol grubundakine benzer davranışlar gözlenmiştir. Gözlenen davranış değişimlerinin, kontrol grubuna göre daha az hareketlilik, denge kaybı, düzensiz yüzmeye ve belli bir alanda genellikle suyun orta seviyesinde uzun süreli hareketsiz kalma gibi tipik neurotoxin zehirliliği özelliğinde olduğu saptanmıştır. 10 mg/l'ye maruz kalan balıklar arasında denge kaybı göstermişlerdir. Denge kaybı 30 mg/l'lik konsantrasyonda sıklaşmaya başlamıştır. 50 mg/l'lik konsantrasyonda hareketsiz kalma, su yüzeyine toplanma ve sonrasında kontrolsüz biçimde akvaryum tabanına düşme hareketleri gözlenmiştir. Balıklar 60 mg/l ve 70 mg/l'lik konsantrasyonlarda denge kaybı, genel hareketlerinde daha fazla azalma ve akvaryum tabanında sırt üstü uzanma şeklinde davranışlar göstermişlerdir. En yüksek konsantrasyon olan 100 mg/l'de tüm cevaplar en güçlü şekilde olup; denge kaybı, su içerisinde dikey olarak asılı durma, hızlı solunum hareketleri, düzensiz yüzmeye, spiral şeklinde ani yüzmeye hareketi, uzun süreli hareketsiz kalma, uzun süreli ve hareketsizce akvaryumun dip kısmında uzanma ve aniden harekete geçme şeklinde olmuştur. Bu sonuçlar Sancho ve arkadaşlarının sonuçları ile uygunluk göstermektedir (12).

Ferrando ve arkadaşları (13), yapmış oldukları çalışmada seçtikleri 8 organofosforlu ve organoklorürlü pestisit (örneğin endosülfan, diazinon, fenitrothion ve metilparation) yılan balığındaki 96 saatlik LC₅₀ değerini belirlemişler ve davranış değişimlerini rapor etmişlerdir. Balıklarda huzursuzluk, yüzmeye şeklinde düzensizlik, denge kaybı, mukus salgısında artış ve renk açılması gibi değişimler gözlemlenmiştir. Belirlemiş oldukları davranış değişimleri bu çalışmadaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Sucul ortamlarda oldukça toksik olan organofosfatların (temefos) akut toksisitesi ile ilgili olarak literatürde yalnızca birkaç çalışma bulunması oldukça ilginçtir. Temefos tarımda yaygın olarak kullanılan toksisitesi yüksek bir insektisittir. Burada özellikle dikkat edilmesi gereken nokta, sivrisineklerle mücadelede oldukça yoğun kullanılan temefosun balıklar ve hedef olmayan diğer türler üzerindeki subkronik ve kronik etkilerinin detaylı olarak incelenmesinin zorunluluğudur.

Zirai kimyasallar tüm abiyotik ortamı özellikle de su ve toprağı kirletmektedirler. Yeraltı sularının ve diğer su kaynaklarının zirai ilaçlar yoluyla kirlenmesi sucul organizmalar ve balıklar için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Toksik ilaçlar sucul ekosistemdeki besin zincirinin son halkası olan balıkları etkiler. Bu da balıklar ile beslenen diğer hayvanların aynı toksik etkiye maruz kalmalarına neden olur. Bu çalışmada kullanılan temefos larvasiti balıklar için oldukça toksik bulunmuştur. İlaçın hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Temefos dokularda birikerek akut zehirlenmeye neden olmaktadır (14). Bu durumda yapılması gereken çeşitli insektisitlerin akut ve kronik toksisitelerinin araştırılmasına yönelik çalışmaların artırılmasıdır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar açıkça göstermektedir ki, günümüzde tarımda yaygın olarak kullanılan bazı insektisitlerin kullanımının kontrol altına alınması zorunludur.

behavioral changes/effects were typical of neurotoxin toxicity: less general activity than control group, loss of equilibrium, erratic swimming and staying motionless at a certain location generally at mid-water level for prolonged periods. Fish exposed to 10 mg/l showed less general activity with occasional loss of equilibrium. Loss of equilibrium become more frequent in the 30 mg/l concentration. The 50 mg/l concentration group stayed motionless close to the water surface and later fell to the aquarium bottom in an uncontrolled manner. Fish in the 60 mg/l and 70 mg/l concentrations showed loss of equilibrium, much decreased general activity and lying motionless on the bottom on their backs.

The highest concentration of 100 mg/l showed all responses at high intensities: the loss of equilibrium, hanging vertically in water, rapid gill movement, erratic swimming, sudden swimming motion in a spiral fashion, after long periods of motionlessness, prolonged and motionless lying down on the aquarium bottom and suddenly starting to move. Our results are in agreement with Sancho et al. (12).

Ferrando et al., in their study (13) on the effects of 8 selected organophosphate and organochloride pesticides such as endosulphan, diazinone, fenitrothion and methylparathion on eels, determined their 96 h LC₅₀ values and reported behavioral changes in fish. They also observed anxiety, disorders in swimming pattern, loss of balance, excessive mucus secretion and lightening in color. Behavioral changes observed are similar to the results of this study.

It is interesting to note that only a few studies on the acute toxicity of one of the most aquatic toxic organophosphates, namely temephos, to fish exist in the open literature. Temephos is a highly toxic insecticide widely used in agriculture. Here special attention is drawn to its' heavy use in mosquito control programs which necessitates in-depth sub-chronic and chronic toxicity tests to fish species and to non-target species to be undertaken.

The agricultural chemicals contaminate all abiotic media particularly water and soil. The contamination of underground waters and other water sources by agricultural chemicals poses a potential threat to aquatic organisms and fish. Toxic compounds effect fish, which are the last chain of the feeding cycle in aquatic ecosystem, and cause other animals, which feed on fish, to be subjected to the same toxic effect. The larvacide temephos used in this study is highly toxic to fish and has very adverse effects on both humans and animals. It also accumulates in tissues and causes acute poisoning (14). It is clear that the number of studies directed to the investigation of acute and chronic toxicity of various insecticides is to be increased. The results obtained in this study clearly reveal the fact that it is necessary to control the use of some insecticides commonly employed in agriculture today.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. "Hazardous Substance Data Base", TOXNET. National Library of Medicine, Bathesda, MD (1993).
2. Pierce, R.H., R.B. Brown, K.R. Hardman, M.S. Henry, C.L. Palmer, T.W. Miller and G. Witcherman., "Fate and Toxicity of Temephos Applied to an Intertidal mangrove Community", *Journal of the American Mosquito Control Association*, December, 5 (4): 569-578 (1989).
3. Ardali, Y., "Endüstriyel Atık Sulardan Ağır Metallerin Adsorbsiyon ile Uzaklaştırılması" "Heavy Metal Expurgation from Industrial Waters by Absorption", MS. Thesis, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.*, Samsun (In Turkish), (1990).
4. Brando, C., Bohets, H.L., Vvyer, I.E. and Dierickx, P.J., "Correlation Between the In vivo Cytotoxicity to Cultured Fathead Minnow Fish Cells and Fish Lethality Data for 50 Chemicals", *Chemosphere*, 25 (2): 553-62 (1992).
5. OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), "OECD Guidelines for Testing of Chemicals", OECD, Paris, (1993).
6. Castano, A., Cantarino, M.J., Castillo, P. and Tarazona, J.V., "Correlation Between the RTG-2 Cytotoxicity Test EC50 and In vivo LC50 Rainbow trout Bioassay", *Chemosphere*. 32 (11): 2141-57 (1996).
7. APHA, AWWA, WEF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", Washington, D.C. (1998).
8. Turkish Official Gazette (Resmi Gazete), "Su Kirliliği ve Kontrolü Yönetmeliği Numune Alma ve Analiz Metodları Tebliği. Zehirlilik Seyreltme Faktörü (ZSF) Tayini", Tarih: 7.1.1991, Sayı: 20106 (1991).
9. Anadu, D.I., Anaso, H.U. and Onyeka, O.N.D., "Acute toxicity of the insect larvacide Temephos on the fish Tilapia melanopleura and Dragonfly larvae Neurocordella virginensis.", *J. Environ. Sci. Health*, b31 (6): 1363-1375 (1996).
10. Mayer, F.L. and Ellersieck, M.R., *Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals*, United States Department of the Interior Resource Publication (U.S. Fish and Wildlife Service), Washington D.C., 442-444 (1986).
11. Richmonds, C. and Dutta, H.M., "Effect of Malathion on the Optomotor Behavior of Bluegill Sunfish, Lepomis macrochirus", *Comp. Biochem. Physiol.*, 102 (3), 523-26 (1992).
12. Sancho, E., Ferrando, M.D., Gamon, M., Andreu-Moliner, E., "Uptake and Elimination Kinetics of a Pesticide in the Liver of the European Eel", *J Environ Sci Health Part B* 33:83-98 (1998).
13. Ferrando, M.D., Sancho, E. and Moliner, E.A., "Comparative Acute Toxicities of Selected Pesticides to Anguilla anguilla", *Environ. Sci. Health*, B26 (5-6): 491-8 (1991).
14. "World Health Organization", Temephos, Environmental Health Criteria 29, *World Health Organization*, Geneva, (1984).