

Glifosat Bazlı Herbisit Erkek Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) Üreme Dokuları ve Sperm Hücreleri Üzerine Etkileri

Ümit ACAR^{1*}, Burak Evren İNANAN², Fahriye Zemheri NAVRUZ³, Sevdan YILMAZ⁴

¹Ormanlık Bölümü, Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

²Su Ürünleri ve Hastalıkları Bölümü, Veteriner Fakültesi, Aksaray Üniversitesi, Aksaray, Türkiye

³Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Bartın Üniversitesi, Bartın, Türkiye

⁴Yetiştiricilik Bölümü, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

*Sorumlu Yazar: umitacar@comu.edu.tr

Geliş Tarihi: 25.05.2022 Düzeltme Geliş Tarihi: 09.08.2022 Kabul Tarihi: 12.08.2022

Öz

Glifosat bazlı formülasyonlar, dünyada en yaygın kullanılan herbisit tarım ilaçlarıdır. Bu çalışmada, su kaynaklı glifosatın erkek Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) testis, sperm kanalı, testiküler ve sağım yolu ile elde edilmiş spermatozoa örnekleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla, balıklar 14 gün boyunca 0, 5, 10, 20, 30 ve 40 mg/L glifosat içeren deneme akvaryumlarında tutulmuşlardır. >10 mg/L glifosatın, sağım yoluyla ve testislerden alınmış olan spermatozoa örneklerinin motilite, canlılık süresi ve vitalite değerlerini azaltıcı etkisi gözlemlenmiştir. 40 mg/L glifosat grubunda hem testiküler hem de sağım yoluyla elde edilmiş spermatozoa örneklerinde en düşük vitalite değerleri saptanmıştır. >10 mg/L üzerindeki glifosat maruziyetinin, spermatozoa hücrelerinin oksidatif dengesinde değişimlere yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca, testis ve sperm kanalı dokularında glifosat etkisi ile oluşan lipid peroksidasyon seviyelerindeki azalmaların, kontrol grubuna alınan testis örneği haricinde istatistik açıdan önemli farklar göstermediği saptanmıştır. Katalaz aktivitesi ise kontrol grubuna kıyasla >5mg/L glifosat gruplarında özellikle testis dokularında artış göstermektedir. Sperm kanalı dokusundaki oksidatif cevap, testis dokusundan farklı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile glifosat bazlı yaygın olarak kullanılan ticari bir herbisit, erkek Nil Tilapyası balığı üreme sistemi üzerine etkileri gösterilmiştir. Ortamda bulunan özellikle 5 mg/L'den fazla olan glifosat konsantrasyonunun spermatozoa parametrelerine olumsuz yansıdığı saptanmıştır. Bununla birlikte daha yüksek konsantrasyonların bu herbisit üreme sistemi dokularındaki oksidatif stres koşullarını etkileyebileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Glifosat, *Oreochromis niloticus*, testis, sperm kanalı, spermatozoa

Effects of Glyphosate-Based Herbicide in Male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Reproductive Tissues and Spermatozoa

Abstract

Glyphosate-based herbicide formulations are one of the most used herbicides worldwide. In this study, effects of waterborne glyphosate on testis, sperm duct, testicular and stripped spermatozoa samples of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). For this purpose, fish were kept in aquariums containing 0, 5, 10, 20, 30, and 40 mg/L of glyphosate for a 14-day. It was observed that >10 mg/L of glyphosate reduced motility, longevity, and vitality levels in both testicular and stripped spermatozoa. The lowest vitality levels were found in both kind of spermatozoa samples of fish in aquariums with 40 mg/L of glyphosate. Moreover, alterations in oxidative balance of spermatozoa were detected at concentrations above 10 mg/l of glyphosate. Also, lipid peroxidation levels in tissues from testis and sperm duct were decreased by increasing glyphosate concentrations. On the other hand, catalase activities particularly in testis tissues were increased in >5mg/L of glyphosate concentrations compared to the control. It was determined that oxidative response in sperm duct were different than those in testis tissues. Consequently, effects of a commonly used commercial glyphosate-

based herbicide on the reproduction system of male Nile Tilapia were determined. Glyphosate at concentrations above 5 mg/L affected spermatozoa parameters negatively.

Key words: Glyphosate, Oreochromis niloticus, testis, spermatid duct, spermatozoa

Giriş

Pestisitler tüm dünyada tarımsal uygulamaların bir parçası olarak kabul edilmişlerdir. Bu ürünlerin en tehlikeli gruplarından olan herbisitler su kütlelerine topraktan ulaşmaktadır (Guilherme ve ark., 2010). Herbisitler arasında glifosat bazlı formülasyonlar dünya genelinde en çok kullanılan herbisitlerden olup, yüksek çözünürlükleri nedeniyle sucul ortamlarda canlıların varlığını tehdit eden ekolojik bir sorundur (Cavalcante ve ark., 2008). Roundup®, su bitkilerini kontrol etmek için kullanılan seçici olmayan bir herbisittir ve ticari formülünde, aktif bileşen olarak, glifosatın izopropilamin tuzunun (N-fosfonometil glisin) asit eşdeğerinin %48'ini içerir (Jiraungkoorskul ve ark. 2003).

Balıklar, çevresel kirlenmeler için biyoidikatör türler olarak akuatik ekosistemlerin kalitesinin değerlendirilmesinde geniş çapta kullanılan organizmalardır (Köck ve ark., 1996). Çevresel kirlenmelerin subletal etkileşiminde balıkların kanında meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin ölçülmesi, balığın hayatta kalma, üreme ve büyüme süreçleri hakkında yararlı bilgiler sağlar (Adams ve ark., 1989). Çevresel kirlenmelerin balık üreme sistemini ve dolayısıyla balık popülasyonu üzerinde bir baskıya yol açması söz konusu olabilmektedir. Bu kirlenmelerden özellikle pestisitlerin, kullanımlarının artışına paralel olarak diğer etkileri yanında balık üreme sistemi üzerine etkilerinin ortaya konulması gerekliliği gün geçtikçe daha önemli hale gelmektedir.

Bu çalışmada tarımsal faaliyetler doğrudan alıcı ortamlara glifosat bazlı herbisit, model olarak seçilen erkek Nil Tilapya (Oreochromis niloticus) spermatozoa kalitesine ve üreme sistemi dokularına etkilerinin ortaya koymak amaçlanmaktadır. Bu amaç ile farklı subletal konsantrasyonlardaki (0, 5, 10, 20, 30 ve 40 mg/L) glifosat bazlı herbisite 14 gün boyunca maruz bırakılmış erkek tilapya balıklarından hem sağım yolu ile hem de testislerden elde edilmiş olan spermatozoa örnekleri incelenmiştir. Bununla beraber, testis ve sperm kanalı dokularının oksidatif stres koşulları lipid peroksidasyon seviyeleri ve katalaz aktiviteleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Canlı Kaynaklar Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Yerel etik kurul tarafından çalışma protokolü onaylanmıştır (2019/04-05).

Deney Düzeni

Deneme 100 L kapasiteli 18 adet cam akvaryumlarda 3 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Ayrıca otomatik zamanlayıcılar yardımıyla 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Ticari glifosat Roundup® herbisitinin 96 saat LC50 değeri 44,439 mg/L olarak bulunmuştur (Acar ve ark., 2021). Bu tespit sonrasında deneyde kullanılacak glifosat herbisiti konsantrasyonları belirlenmiştir. Akvaryum sularına 0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L 40 mg/L olacak şekilde subletal konsantrasyonlardaki glifosat herbisiti eklenerek 14 gün boyunca balıklar subletal dozda glifosat herbisiti maruz bırakılmıştır (Acar ve ark., 2021). Roundup Star® (480 g/L glifosat potasyum tuzu, Monsanto, Belçika) marka herbisit stok solüsyon olarak denemede kullanılmıştır. Çalışmada, toplamda 180 adet balık (146,69 ± 18,10 g) kullanılmıştır. Balıklar deneme süresince günde iki kez ticari balık yemi (Agromey, Türkiye) ile beslenmişlerdir. Tank suları her 24 saatte bir yenilenmiştir ve sürekli olarak havalandırılmıştır. Deneme balıklarının bulunduğu sistemin su kalite değerleri deneme boyunca ölçülmüş ve 27±2°C, pH 7,8 ± 0,4, çözünmüş oksijen 7,6-8,1 mg/L seviyelerinde bulunmuştur. Deneme sonunda her tanktan 3 adet erkek balık olmak üzere toplamda 9 balık/grup olacak şekilde örneklemeler gerçekleştirilmiştir. Balıklar deneme tanklarından hızlıca yakalandıktan sonra, en kısa sürede doğal bir bayıltıcı olan ve yaygın olarak kullanılan karanfil yağı (20 mg/L) ile bayıltılmıştır (Iversen ve ark., 2003).

Lipid Peroksidasyon ve Katalaz Aktivitesi Analizleri

Bu çalışmada testis, sperm kanalı ve spermatozoa örneklerinde lipid peroksidasyonu ve katalaz aktivitesi ölçülmüştür. Doku örnekleri ve 4 °C'de 5.000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiş spermatozoa örnekleri, 0,5 mM EDTA içeren 50mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizatlar, 4 °C'de 12.000 g hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak ölçümlerde kullanılmıştır.

Lipid peroksidasyonu (LPO), tiyobarbütirik asit reaktif maddelerin (TBARS) 535 nanometrede spektrofotometrik olarak ölçülerek hesaplanması ile gösterilmiştir (Buege ve Aust, 1978; Lushchak ve ark., 2005; Li ve ark., 2010; Shaliutina-Kolešová ve ark., 2014). TBARS içeriği dokularda nmol/g doku, spermatozoa örneklerin nmol/108 spermatozoa olarak ifade edilmiştir. Katalaz aktivitesi, 0.5 mM EDTA içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda 240 nanometrede ölçülmüştür (Aebi, 1984). Katalaz aktivitesi, dokularda IU/ mg protein olarak, spermatozoa da IU/ mg protein x 108 spermatozoa olarak ifade edilmiştir. Protein konsantrasyonu, Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Spermatozoa Analizleri

Yukarıda belirtilen şekilde karanfil yağı ile bayıltılan balıkların, abdominal bölgenin posterior kısmından yavaşça bastırarak idrar keseleri boşaltılmıştır. Daha sonra, tüm abdomen bölgesi iyice kurularak balıklar sağılmıştır (Dzyuba ve ark., 2019). Testiküler spermatozoa örneklerinin eldesi için, balıklardan dikkatlice çıkartılan testislerin üzerleri kurularak, kan kalıntıları temizlenmiş ve tartılmışlardır. Daha sonra, cam tüplere alınan testisler küçük parçalara ayrılmışlardır. 10 dakika içinde, testislerden kendiliğinden çıkan spermatozoa 100 µl'lik otomatik pipet ile örneklenmiştir. Tüm işlemler sırasında, örnekler buz üzerinde bekletilmişlerdir. (Linhart ve ark., 1999).

Çalışmada, spermatozoa sulandırıcısı olarak 110 mM NaCl, 40 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, ve 1.4 mM NaHCO₃ çözeltisi, aktivasyon solüsyonu olarak ise; 40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.2% BSA, pH 8.2 çözeltisi kullanılmıştır (Rana ve McAndrew, 1989; Dzyuba ve ark., 2019). Alınan semen örnekleri 1:400 - 1:1000 oranları arasında seyreltilerek, spermatozoa yoğunluğu hemositometrik yöntem ile belirlenmiştir. Spermatozoa yoğunluğunun belirlenmesinde gerçekleştirilen sayımlara ait örnek görüntü Şekil 1'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar x10⁹/ml olarak kaydedilmiştir. Spermatozoa örnekleri aktive edilmez, Leica MC190 HD model kameralı Leica DM750 faz kontrast mikroskop ile kayıtları alınmıştır. Spermatozoa motilite yüzdesi (%) ve motilite süresi, hücrelerin aktive edilmesi ile hücrelerin sirküler harekete başladığı an arasında geçen saniye (s) olarak üç tekerrürlü tayin edilmiştir (Billard ve Cosson, 1992; Horvath ve ark., 2003; İnanan ve Yılmaz, 2018a). Spermatozoa vitalite oranı, canlı ve ölü sperm hücrelerinin oranlarının belirlenmesi temelinde, eozin boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Eozin solüsyonu, 113 mg

eozinin 100 ml spermatozoa sulandırıcısı içinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Ölü spermatozoa kırmızı-pembe olarak ayrılmıştır (Bergeron ve ark., 2002). Spermatozoa sayımı hemositometrik yöntem ile 3 tekerrürlü olarak Thoma lamında sayılmıştır. Her bir preparatta, en az 100 spermatozoa sayılmıştır. Sonuçlar, (100 x canlı spermatozoa sayısı) / (canlı spermatozoa sayısı+ ölü spermatozoa sayısı) formülü ile hesaplanarak yüzde (%) vitalite olarak ifade edilmiştir.

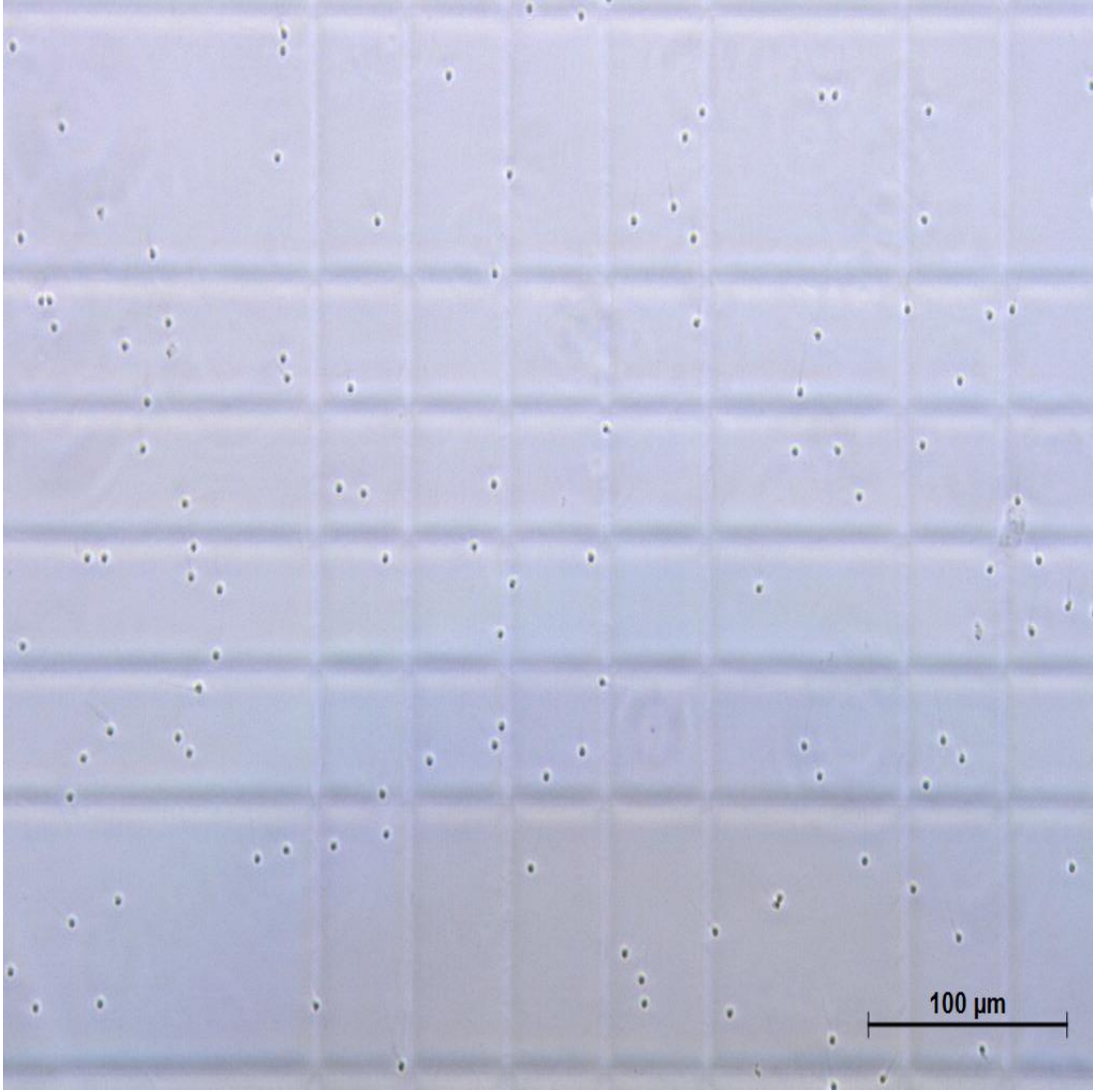
İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında deneme gruplarından elde edilen veriler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde non-parametrik Kruskal Wallis-H testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 19 (IBM SPSS Statistics 19) programı kullanılarak p<0,05 önemlilik seviyesinde değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Çalışmada, glifosat bazlı herbisitinin Nil Tilapyası bireylerinin sperm kalite parametrelerine etkilerini belirleyebilmek amacıyla hem sağım yolu ile hem de testislerden elde edilmiş olan sperm örnekleri incelenmiştir. Sperm hücrelerinin kalitesi buldukları oksidatif stres koşullarından önemli derecede etkilenmektedirler (Kanyılmaz ve İnanan, 2020). Bu sebeple spermatozoa ve ilgili dokulardaki lipid peroksidasyon seviyeleri ve katalaz aktiviteleri de çalışma kapsamında ölçülmüştür.

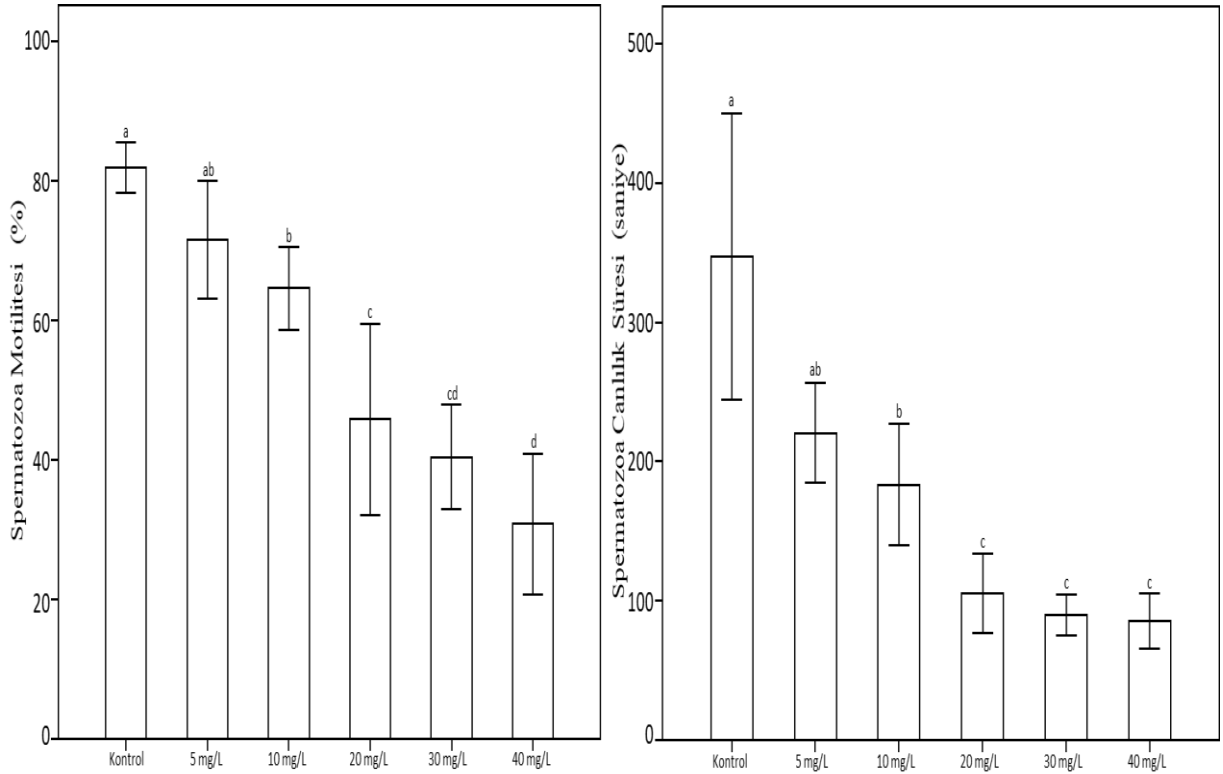
Deneme sonunda, sağım yoluyla alınmış spermatozoa hücrelerinin motilite ve canlılık sürelerinin, 5 mg/L'den fazla olan glifosat konsantrasyonu gruplarında, kontrol grubuna göre azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2). 14 gün sonunda, farklı konsantrasyonlardaki glifosatın, sağım yoluyla ve testislerden alınmış olan spermatozoa örneklerinin yoğunluk ve vitalite değerleri Şekil 3'de sunulmuştur. Buna göre, testiküler spermatozoa yoğunluğunda istatistiki açıdan önemli olmamakla beraber azalmaya sebebiyet vermiştir. Buna karşın sağım ile elde edilmiş ortalama spermatozoa yoğunluğu kontrol grubunda, 2,59±0,38 x10⁹/ml olarak bulunmuş iken bu değer 40 mg/L glifosat grubunda azalarak 1,71±0,41 x10⁹/ml olarak tespit edilmiştir (P<0,05). Spermatozoa vitalite değerleri hem sağım yolu ile hem de testislerden alınan örneklerde, glifosat konsantrasyonunun artışı ile azalma göstermiştir (P<0,05). 40 mg/L glifosat grubunda, sağım ile elde edilmiş örneklerde ortalama vitalite %47±8 olarak, testiküler örneklerde ise %24±7 olarak bulunmuştur.



Şekil 1. Nil Tilapyası (*O. niloticus*) spermatozoa yoğunluğunun belirlenmesi için gerçekleştirilen sayımlara ait örnek görüntü.

Sucul ortamda bulunan kirleticiler, balıklarda üreme sistemi sorunlarına yol açabilmekte, spermatozoa motilitesini ve vitalitesini olumsuz etkileyebilmektedir (İnanan ve Yılmaz, 2018b). Bu olumsuz etkiler, farklı pestisitlerin hem in vivo hem de in vitro olarak uygulamaların görülebilmektedir. Bu çalışmada, glifosat bazlı herbisite maruz kalan Nil Tilapyası bireylerinde hem sağım yoluyla alınmış hem de testiküler olan spermatozoa parametrelerinin negatif yönde etkilendiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, 10µg/L ve 1mg/L klofibril asite 21 gün maruz kalan, bir tatlı su balığı olan *Pimephales promelas* erkek bireylerinde, spermatozoa yoğunluğunda, vitalitede ve bazı motilite parametrelerinde, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli derecede azalmalar saptanmıştır (Runnalls ve ark. 2007). Bir herbisit

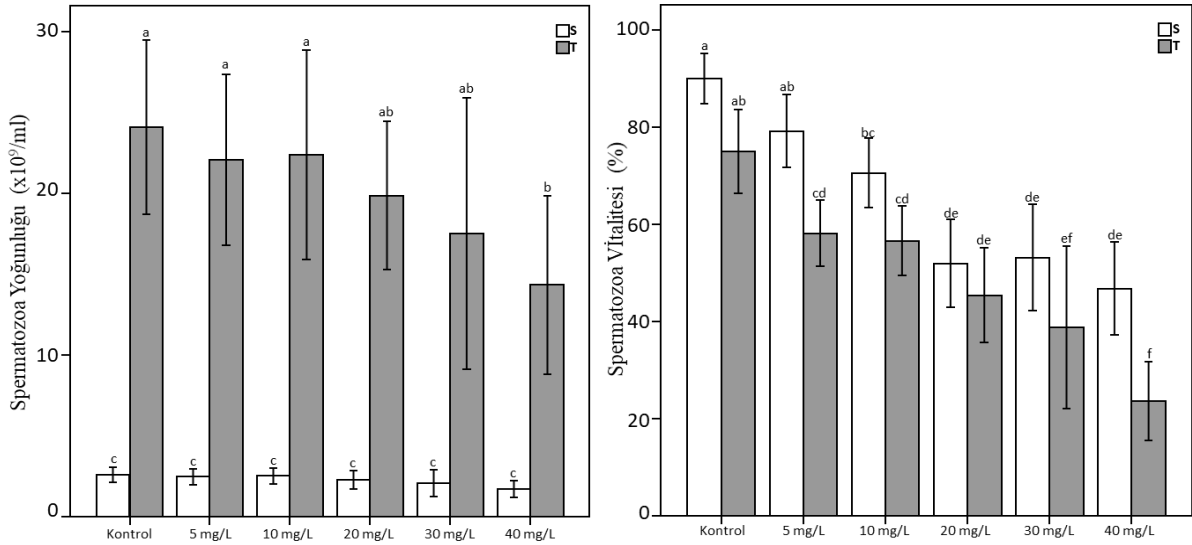
olan atrazinin de balıklarda sperm kalitesine etkisi zebra balığında (*Danio rerio*) gösterilmiştir. 11 günlük 2, 10 ve 100 µg/L atrazin maruziyeti sonrasında, bu balıklarda spermatozoa motilite yüzdesi ve süresinin azaldığı, spermatozoa membran bütünlüğü ve mitokondri fonksiyonu oranlarında bozulmaların arttığı bildirilmiştir (Bautista ve ark. 2018). Beken ve ark. (2022) in vivo ve in vitro olarak uygulanan spermetrinin, kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) sperm hücreleri motilite parametrelerini azaltıcı özelliğini göstermiştir. 2,5 mg/L ve daha fazla miktardaki glifosat herbisitinin in vitro olarak maruziyeti, gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa motilite parametrelerini olumsuz yönde etkilemek ve bu hücrelerde DNA hasarına yol açmaktadır (Akça ve ark., 2021).



Şekil 2. Farklı konsantrasyonlardaki glifosat bazlı herbisit maruziyetinin Nil Tilapyası'nda (*O. niloticus*) sağım yoluyla alınmış olan spermatozoa motilite ve canlılık süresine etkileri. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark vardır ($P < 0,05$)

Şekil 4 ve 5'te testis, sperm kanalı, sağım yoluyla ve testislerden alınmış olan spermatozoa örneklerinde lipid peroksidasyon seviyeleri ve katalaz aktiviteleri gösterilmiştir. Bu çalışmada, 10 mg /L'den fazla dozlarda glifosat bazlı herbisite maruz kalan Nil Tilapyası bireylerinde özellikle testiküler spermatozoa örneklerinde lipid peroksidasyonunda artış, katalaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir ($P < 0,05$). Benzer durum sağım yolu ile elde edilmiş örnekler de gözlemlenmekle beraber, buradaki lipid peroksidasyonundaki artışın sadece 40 mg/L dozunda istatistiki açıdan anlamlı olduğu ve katalitik aktivitedeki azalma meylinde ise istatistiki fark olmadığı saptanmıştır. (Şekil 4). Testiküler ve sağım yolu ile elde edilmiş spermatozoa örneklerinde saptanan lipid peroksidasyondaki ve katalitik aktivitedeki miktar farklılıkları, bu hücre gruplarının normal olarak oksidatif durumlarının ve toplam antioksidan miktarlarının farklı oluşundan ileri gelmektedir (İnanan ve ark., 2016). Bununla beraber, testislerden elde edilen sperm hücreleri farklı olgunluk seviyelerinde olabilmektedirler (İnanan ve Yılmaz, 2018a). Sperm hücrelerinin maruz kaldığı

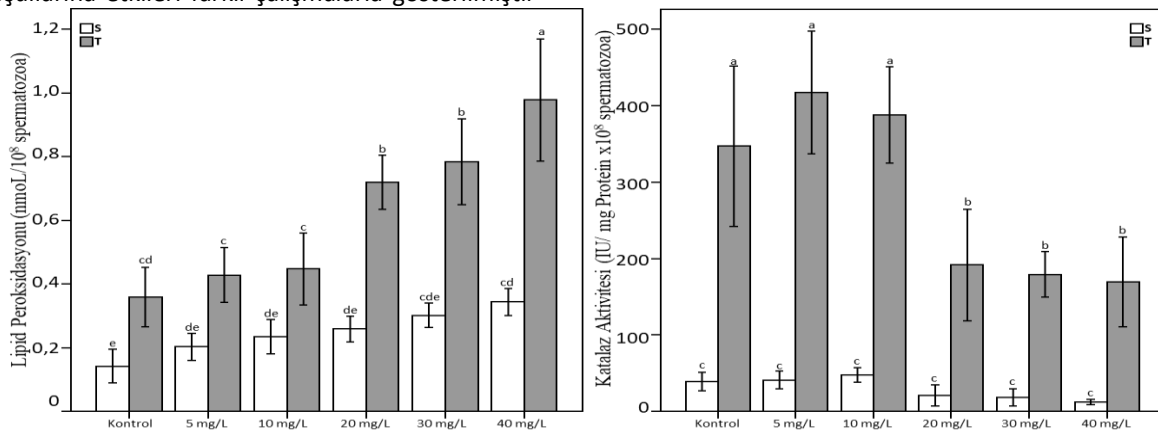
oksidatif stresin tayini, özellikle balıklar gibi çevresel koşullardan direkt etkilenen canlılarda, üreme potansiyelinin belirlenmesinde son derece önemlidir (De Lamirande ve ark., 1997; Aitken ve Baker, 2004). Oksidatif stres, sperm kalitesi üzerine önemli etkilere sahiptir (Sikka, 2001). Olumsuz çevresel faktörlerin etkisiyle, artan reaktif oksijen türleri oksidatif stres oluşturabilmektedir. Oksidatif stres spermatozoa lipid peroksidasyonunu teşvik eder, enzimatik aktiviteleri değiştirir. Bunun sonucunda, sperm hücre zar bütünlüğünde bozulmalar ve DNA fragmentasyonu gibi sperm motilitesini azaltıcı ve en nihayetinde fertilizasyon başarısını düşürücü durumlar ortaya çıkmaktadır (Labbe ve Maisse 1996; Pustowka ve ark., 2000; Lahnsteiner ve ark., 2010). Vinklozinin, diuron, tebutiron, atrazine ve glifosat gibi tarımsal amaçlı kullanılan farklı toksik bileşiklerin sucul canlılardaki spermatozoa oksidatif koşullarına ve üreme sistemine etkileri hem in vitro hem de in vivo çalışmalar ile raporlanmıştır (Akcha ve ark., 2012; Gazo ve ark., 2013; Le Mer ve ark., 2013; de Almeida ve ark., 2018).



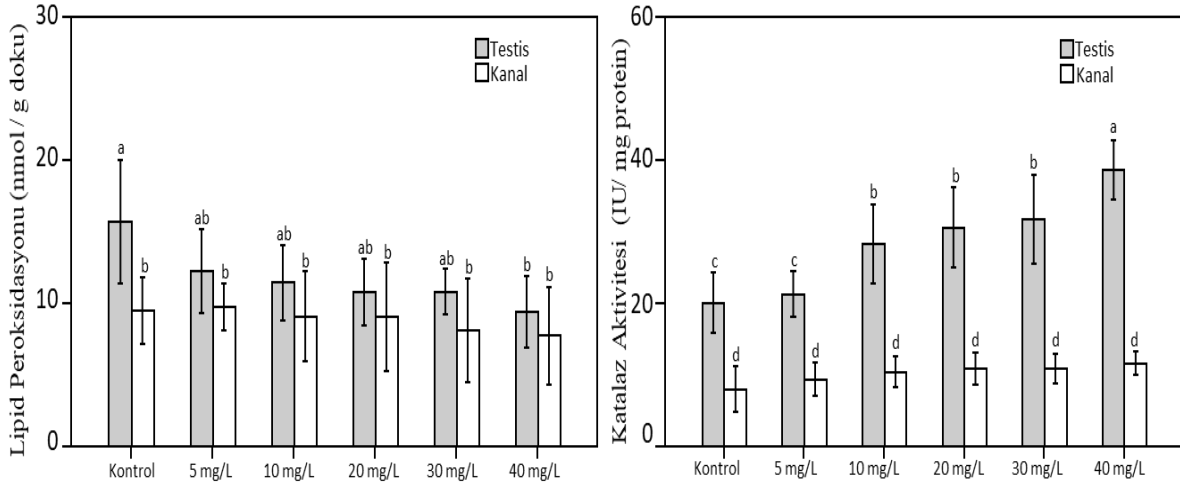
Şekil 3. Farklı konsantrasyonlardaki glifosat bazlı herbisit maruziyetinin Nil Tilapyası'nda (*O. niloticus*) sağım yoluyla (S) ve testislerden (T) alınmış olan spermatozoa örneklerinin yoğunluğuna ($\times 10^9/\text{ml}$) ve vitalitesine (%) etkileri. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark vardır ($P < 0,05$)

Testis ve sperm kanalı dokularında glifosat etkisi ile oluşan lipid peroksidasyon seviyelerindeki azalmaların, testisten alınan kontrol grubuna ait örnek haricinde istatistik açıdan önemli farklar göstermediği saptanmıştır (Şekil 5). Katalaz aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla $>5\text{mg/L}$ glifosat gruplarının özellikle testis dokularında artış göstermektedir ($P < 0,05$). Bu artış, sperm kanalı dokusunda istatistik açıdan önemli olarak gözlenmemiştir. Yüksek dozlardaki herbisit maruziyeti, hücresel yapılara zarar verici nitelikte olabilen reaktif oksijen türlerin oluşumunu artırarak dokudaki oksidatif stres oluşumuna sebebiyet verebilmektedir (Lushchak ve ark., 2005). Lipid peroksidasyon ve katalitik aktivite seviyeleri oksidatif denge için iyi birer göstergelerdir (Samanta ve ark., 2014). Glifosat maruziyetinin dokulardaki oksidatif stres koşullarına etkileri farklı çalışmalarla gösterilmiştir

(de Moura ve ark., 2017; Li ve ark., 2019). Önceki çalışmamızda (Acar ve ark., 2021) raporlanan glifosatın karaciğer dokusu lipid peroksidasyonu ve katalaz aktivitesine etkilerinin, bu çalışmada tespit edilen bu değerlerin testislerde belirlenen şekline benzerdir. Buna karşın sperm kanalı dokusundaki oksidatif cevabın, testis dokusundan farklı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, 2 temel sebepten dolayı olabilir. Öncelikle, üreme sistemindeki bu iki yapı arasındaki histolojik farklılıklardan kaynaklanabilir (Lahnsteiner ve ark., 1993;1994). İkinci olarak, glifosatın testislere difüze olma durumu veya testis-kan bariyerindeki işlevleri engelleyebilmesi olabilir. Etkin maddeler, testislerdeki oksidatif koşulların dengesini değiştirerek ve spermatozoa kalitesini etkileyerek üremede negatif etkilere sebep olabilmektedir (Dabrowski ve ark., 2000; Rinchar ve ark., 2000; Rinchar ve ark., 2003).



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlardaki glifosat bazlı herbisit maruziyetinin Nil Tilapyası'nda (*O. niloticus*) sağım yoluyla (S) ve testislerden (T) alınmış olan spermatozoa örneklerinde lipid peroksidasyon seviyesine ve katalaz aktivitesine etkileri. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark vardır ($P < 0,05$).



Şekil 5. Farklı konsantrasyonlardaki glifosat bazlı herbisit maruziyetinin Nil Tilapyası'nda (*O. niloticus*) testis ve sperm kanalı dokularındaki lipid peroksidasyon seviyesine ve katalaz aktivitesine etkileri. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik fark vardır ($P < 0,05$).

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, bu çalışma ile glifosat bazlı yaygın olarak kullanılan ticari bir herbisit, erkek Nil Tilapyası balığı üreme sistemi üzerine etkileri gösterilmiştir. Ortamda bulunan özellikle 5 mg/L'den fazla olan glifosat konsantrasyonunun spermatozoa parametrelerine olumsuz yansıdığı saptanmıştır. Bununla birlikte daha yüksek konsantrasyonların bu herbisit üreme sistemi dokularındaki oksidatif stres koşullarını etkileyebildiği gösterilmiştir. Tatlı su balıkları için iyi bir model balık olan Nil Tilapyası için bulunan sonuçlar, sucul ortamda yaşayan balıkların üreme sistemlerini önemli derecede etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle glifosat gibi tarım ilaçlarının balıklar üzerinde yaptığı fizyolojik değişiklikleri incelemenin sadece ekosistemin geleceği açısından değil, balık popülasyonlarının durumu açısından da önemli olduğu görülmektedir..

Teşekkür: Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: FBA-2019-2867

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Ümit Acar: Analizi planlamış ve makaleyi yazmıştır. Burak Evren İnanan: Veri toplamış, analizini yapmıştır ve makaleyi yazmıştır. Fahriye Zemheri Navruz: Çalışmanın istatistiksel analizlerini yapmıştır.

Sevdan Yılmaz: Örnek almıştır.

Kaynaklar

- Acar, Ü., İnanan, B.E., Navruz, F.Z. ve Yılmaz, S. (2021). Alterations in blood parameters, DNA damage, oxidative stress and antioxidant enzymes and immune-related genes expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to glyphosate-based herbicide, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 249, 109147.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F. ve Hinton, D.E. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish, *Marine Environmental Research*, 28(1–4), 459–464.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aitken, R.J. ve Baker, M.A. (2004). Oxygene stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 581–588.
- Akcha, F., Spagnol, C. ve Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106–107, 104–113.
- Akça, A., Kocabaş, M. ve Kutluyur, F. (2021). Glyphosate disrupts sperm quality and induced DNA damage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 39(4), 413–422.

- Bautista, F.E.A., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Acosta, I.B., Caldas, S.S., Primel, E.G. ve Zanette J. (2018). The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 206–207, 17–22.
- Beken, A.T., Saka, Ş., Aydın, İ., Firat, K., Suzer, C., Benzer, F., Erişir, M., Özden, O., Hekimoğlu, M.A., Engin, S., Antepli, O. (2022). In vivo and in vitro evolution of the effects of cypermethrin on turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109298.
- Bergeron, A., Vandenberg, G., Proulx, D. ve Bailey, J.L. (2002). Comparison of extenders, dilution ratios and theophylline addition on the function of cryopreserved walleye semen. *Theriogenology*, 57(3), 1061–1071.
- Billard, R. ve Cosson, M.P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm in freshwater fish. *J Exp Zool*, 261, 122–131.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- Buege, J.A. ve Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol*, 52, 302–310.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R. ve Sofia, S.H. (2008). Genotoxic effects of Roundup (R) on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res-Genet Toxicol Environ*, 655, 41–46.
- Dabrowski, K., Rinchar, J., Lee, K.J., Blom, J.H., Ciereszko, A. ve Ottobre, J., 2000. Effects of diets containing gossypol on reproductive capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod*, 62, 227–234.
- de Almeida, M.D., Pereira T.S.B., Batlouni, S.R., Boscolo, C.N.P. ve de Almeida, E.A. (2018). Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat Toxicol*, 194, 86-93.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. ve Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*, 2, 45–54.
- de Moura, F.R., da Silva Lima, R.R., da Cunha, A.P.S., da Costa Marisco, P., Aguiar, D.H., Sugui, M.M., Sinhörin, A.P., ve Sinhörin, V.D.G., (2017). Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazonia: hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ Toxicol Pharmacol*, 56, 241–248.
- Dzyuba, B., Legendre, M., Baroiller, J.F. ve Cosson, J. (2019). Sperm motility of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of temperature on the swimming characteristics. *Anim Reprod Sci*, 202, 65–72.
- Gazo, I., Linhartova, P., Shaliutina, A. ve Hulak, M. (2013). Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chemico-Biological Interactions*, 203, 377–385.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A. ve Pacheco, M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide, *Mutagenesis*, 25(5), 523–530.
- Horvath, A., Miskolczi, E. ve Urbanyi, B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat Living Resour*, 16, 457–460.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S. ve Eliassen, R.A. (2003). The efficiency of metomidate clove oil Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts and their potential stressreducing capacity. *Aquaculture*, 221(1-4), 549–566.
- İnanan, B.E. ve Yılmaz, F. (2018a). Seasonal and age-related changes in semen characteristics and composition of seminal plasma in sex-reverse female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in comparison with normal males. *Anim Reprod Sci*, 196, 160–167.
- İnanan, B.E. ve Yılmaz, F. (2018b). Motility evaluation and cryopreservation of fish sperm exposed by water-borne and food-borne boron. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 4(1), 12-19
- İnanan, B.E., Öğretmen, F., İnanan, T. ve Yılmaz, F. (2016). Total antioxidant capacity, catalase activity, and lipid peroxidation changes in seminal plasma of sex-reversed female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during spawning season. *Theriogenology*, 86(8), 1975-1982.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. ve Pokethitiyook, P. (2003). Biochemical and

- histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ Toxicol*, 18(4), 260–267.
- Kanyılmaz, M. ve İnanan, B.E. (2020). DNA damage, oxidative stress, decreased viability and motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa induced by tryptophan, phenylalanine and cysteine amino acids during short-term storage. *Turkish Journal of Zoology*, 44 (3), 281-290.
- Köck, G., Triendl, M. ve Hofer, R. (1996). Seasonal patterns of metal accumulation in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from an oligotrophic alpine lake related to temperature. *Can J Fish Aquat Sci*, 53(4), 780–786.
- Labbe, C. ve Maisse, G. (1996). Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*, 145, 281–294.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. ve Weismann, T. (1994). The testicular mainducts and spermatid ducts in cyprinid fishes. I. Morphology, fine structure and histochemistry. *J Fish Biol*, 44, 937–951.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. ve Plaetzer, K. (2010). Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*, 119, 314–321.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. ve Weismann, T. (1993). The spermatid ducts of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion. *J Fish Biol*, 42, 79–93.
- Le Mer, C., Roy, R.L., Pellerin, J., Couillard, C.M. ve Maltais, D. (2013). Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the three spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 174–181
- Li, Y., Ding, W. ve Li, X. (2019). Acute exposure of glyphosate-based herbicide induced damages on common carp organs via heat shock proteins-related immune response and oxidative stress. *Toxin Rev.*, 1–13.
- Li, Z.H., Li, P., Rodina, M. ve Randak, T. (2010). Effect of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Chemosphere*, 80(5), 530–534.
- Linhart, O., Walford, J., Sivaloganathan, B., ve Lam, T.J. (1999). Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 55, 1344–1358.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M. ve Storey, K.B. (2005) Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1319–1330.
- Pustowka, C., McNiven, M.A., Richardson, G.F. ve Lall, S.P. (2000). Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquacult Res*, 31, 297–305.
- Rana, K.J. ve McAndrew, B.J. (1989). The Viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture*, 76, 335–345.
- Rinchart, J., Ciereszko, A., Dabrowski, K. ve Ottobre, J., (2000). Effects of gossypol on sperm viability and plasma sex steroid hormones in male sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Toxicol Lett*, 111, 189–198.
- Rinchart, J., Lee, K.J., Dabrowski, K., Ciereszko, A., Blom, J.H. ve Ottobre, J.S., (2003). Influence of gossypol from dietary cottonseed meal on haematology, reproductive steroids and tissue gossypol enantiomer concentrations in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr*, 9, 275–282.
- Runnalls, T.J., Hala, D.N. ve Sumpter, J.P. (2007). Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical clofibrate on sperm parameters in adult Fathead minnow. *Aquat Toxicol*, 84, 111–118.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K. ve Ghosh, A.R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, excel mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicol Environ Saf*, 107, 120–125.
- Shaliutina-Kolešová, A., Gazo, I., Cosson, J. ve Linhart, O. (2014). Protection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma. *Fish Physiol Biochem*, 40(6), 1771–1781.
- Sikka, S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 851–862.