

Atf İçin: Sulukan, E. ve Köktürk, M., (2023). Karışım Herbisitlerin (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit) In Vivo Toksisitesi: Zebra Balığı Embriyo ve Larva Modeli. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 617-627.

To Cite: Sulukan, E., & Köktürk, M., (2023). In Vivo Toxicity of Mixture Herbicides (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet acid): Zebrafish Embryo and Larva Model. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(1), 617-627.

Karışım Herbisitlerin (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit) In Vivo Toksisitesi: Zebra Balığı Embriyo ve Larva Modeli

Ekrem SULUKAN^{1*}, Mine KÖKTÜRK²

Öne Çıkanlar:

- Kullanılan karışım herbisit, zebra balığı embriyo ve larvalarının gelişiminde hasara neden olur
- Karışım herbisitler zebra balığı embriyo ve larvalarında farklı morfolojik deformasyonları tetikledi.
- Kullanılan karışım herbisitinin 1 ppm konsantrasyonuna maruz kalan larvalarda hiperaktivite gözlemlendi

Anahtar Kelimeler:

- Zebra balığı
- Halauxifen methyl
- Pyroxsulam
- Davranış
- Toksikite

ÖZET:

Herbisitler suda yaşayan organizmalar ve insan sağlığı için ciddi tehlike oluşturabilir. Karışım formülasyonu olarak hazırlanan herbisitler ise çok daha fazla toksik etkilere sahip olabilir ancak literatürde bu herbisitlerin toksisitelerini gösteren az sayıda çalışma vardır. Çalışmamızda, piyasada son yıllarda yoğun kullanılan karışım herbisitlerin (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit) farklı konsantrasyonlarının (0.25, 0.5 ve 1 ppm) zebra balığı embriyo ve larvalarındaki toksik etkileri gelişimsel parametreler ve davranış testleri ile değerlendirilmiştir. Karışım herbisitlere 96 saat maruz kalan embriyo ve larvalarda özellikle en yüksek uygulama konsantrasyonunda (1 ppm) hayatta kalma oranı azalmış ve larvaların koryondan çıkışı gecikmiştir. Embriyo ve larvalarda karışım herbisitlerin etkisi ile çeşitli malformasyonlar gözlemlenmiştir. Ayrıca karışım herbisit 1 ppm konsantrasyonda zebra balığı larvalarında 96. saate kat ettikleri toplam mesafede artış olmuş ve hiperaktivite meydana geldiği belirlenmiştir. Çalışmamız karışım kimyasalların sucul organizmalardaki toksik etkilerinin anlaşılması açısından önemli veri sağlamaktadır. Sonuç olarak sucul ekosistemde karışım olarak bulunan kimyasalların (herbisit, insektisit, fungusit veya ağır metaller) sucul canlılar için bir tehdit olduğu düşünüldüğünden daha fazla ve detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

In Vivo Toxicity of Mixture Herbicides (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet acid): Zebrafish Embryo and Larva Model

Highlights:

- The mixture used in the herbicide causes damage to the development of zebrafish embryos and larvae
- Mixed herbicides triggered different morphological deformations in zebrafish embryos and larvae
- Hyperactivity was observed in larvae exposed to 1 ppm concentration of the herbicide used in the mixture

Keywords:

- Zebrafish
- Halauxifen methyl
- Pyroxsulam
- Behavior
- Toxicity

ABSTRACT:

Herbicides can pose a serious hazard to aquatic organisms and human health. Herbicides prepared as a mixture formulation may have much more toxic effects, but there are few studies in the literature showing the toxicities of these herbicides. In our study, the toxic effects of different concentrations (0.25, 0.5 and 1 ppm) of mixed herbicides (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet acid), which have been used extensively in the market in recent years, on zebrafish embryos and larvae were evaluated with developmental parameters and behavioral tests. Embryos and larvae exposed to the mixed herbicides for 96 hours had reduced survival and delayed exit from the chorion, especially at the highest application concentration (1 ppm). Various malformations were observed in embryos and larvae with the effect of mixed herbicides. In addition, it was determined that the total distance covered by zebrafish larvae at 96th hour increased and hyperactivity occurred at 1 ppm concentration of the mixed herbicide. Our study provides important data in terms of understanding the toxic effects of mixed chemicals on aquatic organisms. As a result, more and more detailed studies are required since chemicals (herbicides, insecticides, fungicides or heavy metals) found as a mixture in the aquatic ecosystem are considered to be a threat to aquatic organisms.

¹ Ekrem SULUKAN (Orcid ID: 0000-0002-4414-9873) Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum, Türkiye

² Mine KÖKTÜRK (Orcid ID: 0000-0003-4722-256X), İğdır Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, İğdır, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ekrem SULUKAN, e-mail: sulukanekrem@hotmail.com

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Çalışmamızda 120 saatten küçük zebra balığı larvaları kullanıldığı için bu çalışma herhangi bir etik izin gerektirmemektedir (Direktif 86/609/EEC ve AB Direktifi, 2010/63/EU).

GİRİŞ

Herbisitler, çeşitli yabancı ot zararlılarının dayattığı mahsul-ot rekabetini azaltarak tarımsal gıda üretiminin arttırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Singha ve ark., 2022). Tarımdaki gereklilikleri herbisitlerin hedef olmayan canlılar için oluşturabilecekleri toksik etkileri gözardı ettirmemelidir. Herbisit kalıntıları toprakta, su kütlelerinde, yeraltı sularında ve besin zincirinde biyolojik birikim nedeniyle ciddi çevresel ve sağlık sorunları oluşturmaktadır (Ali ve ark., 2021). Son yıllarda herbisit karışımları, geniş yabancı ot kontrolü yapabilirlikleri ve verimli uygulanabilirlikleri nedeniyle çok daha fazla kullanılmaktadır (Saha ve ark., 2018). Halauxifen-methyl, yeni bir herbisittir ve yeni yapısal sentetik oksin herbisit sınıfının ilk üyesidir (Zhao ve ark., 2015). Pyroxsulam, triazolopiridin sülfonamid ailesinin bir üyesi ve asetolaktat sentazı (ALS) inhibe eden bir herbisittir (Abdel-Wahab ve ark., 2021). Halauxifen-methyl ve pyroxsulam'a ait hazır karışım formülasyonlar, çeşitli mahsullerde çok çeşitli yabancı ot istilasını kontrol etmede başarılı olduğu için bir çok ülkede kullanılmaya başlanmıştır (Mithila ve ark., 2011; Obenland ve Riechers, 2020; Lan ve ark., 2022; Singha ve ark., 2022). Ancak halauxifen-methyl ve pyroxsulam'dan oluşan herbisit karışımının herhangi bir canlı üzerine toksik etkileri henüz araştırılmamıştır. Çevresel kirletici karışımların toksik etkilerine ilişkin bilgiler çok sınırlıdır, çünkü çoğu kirleticinin toksisite değerlendirmesi şu anda çoğunlukla canlıların bireysel kimyasallara maruz kalmasına odaklanmaktadır (Caioni ve ark., 2021). Bununla birlikte, karışım maddelerin bazı durumlarda sinerjistik etkiler nedeniyle bir karışımdaki en güçlü tek kimyasalın tetiklediği etkilerden daha büyük olabileceği belgelenmiştir (Pistollato ve ark., 2020).

Zebra balığı (*Danio rerio*), embriyo ve larvaları gelişim dönemindeki şeffaf görünümüleri ve kirletici maddelerin etkilerinin kısa sürede gözlemlenmesini sağlayan hızlı dış gelişim dönemleri gibi olumlu özelliklerinden dolayı toksisite testlerinde model organizma olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Santos ve ark., 2022). Bu canlıların kısa yaşam döngüsü, laboratuvar bakımının kolay olması ve çok sayıda yumurta üretmesi de toksisite testlerinde giderek daha fazla kullanılmasını sağlamaktadır (Lee ve ark., 2019).

Herbisitlerin zebra balıklarında bireysel ve birlikte toksisiteleri hakkında çalışmalar yapılmıştır, ancak piyasada karışım formülasyonu şeklinde bulunan ve yaygın kullanılan herbisitlerin neden olduğu akut toksisiteye ilişkin literatür de yeterli çalışma mevcut değildir (Shukla ve ark., 2017; Costa ve ark., 2022; Liu ve ark., 2022). Bu nedenle, çalışmamızda halauxifen-methyl ve pyroxsulam herbisitlerine akut maruz kalmanın birlikte etkilerinin zebra balığı embriyo ve larvalarında toksik etkileri gelişimsel süreçler ve hareket açısından değerlendirilmesine yönelik araştırma yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar

Tarzec 320 WG (ithal) herbisit (%6.95 Halauxifen-methyl+%25 Pyroxsulam+%35.4 Cloquintocetasit: herbisit koruyucu) ticari olarak satın alındı. Diğer kullanılan tüm kimyasallar Merck firmasından satın alındı.

Zebra Balığı Yaşam Koşulları ve Yumurta Alımı

Çalışmamız Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akuatik Biyoteknoloji Laboratuvarında yapıldı. Çalışmada kullanılan zebra balığı embriyolarının anaçları (AB genotipli, *Danio rerio*) Oregon Eyalet Üniversitesi'nden (ABD) temin edilmiştir. Zebra balığı anaçları Akuatik Biyoteknoloji Laboratuvarında kapalı devre sistemde kontrollü şartlarda (fotoperiyot: 10 saat karanlık-14 saat ışık, sıcaklık: 28 ±1 °C) yetiştirilmektedir. Balıklarda besleme günde iki kez (artemia ve pul yem) yapılmaktadır. Yumurta alımı için 1:2 oranında dişi ve erkek kullanıldı. Sabah saat 09.00'da yetiştirme

sistemi ışıkları açıldığında yumurtalatma tanklarındaki anaç balıklarda yumurtalama süreci başladı ve 1-2 saat içinde yumurtalar alındı. Toplanan yumurtalar embriyo-larva besin ortamına (E3 solüsyonu: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, %0.01 metilen mavisi) alındı (Westerfield, 2000).

Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarının Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit Karışımına Maruz Bırakılması

Çalışmamızda kullandığımız karışım formülasyonu herbisitlerin (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit) toksisitesi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için subletal konsantrasyonları belirlemek için deneme 0.25, 0.5, 1, 5, ve 10 ppm olmak üzere 5 uygulama grubu şeklinde hazırlandı. Denemenin 24. saatinde 10 ppm ve 48. saatte 5 ppm uygulama gruplarındaki tüm embriyoların öldüğü görüldü. Deneme ikinci kez subletal konsantrasyonlar (0.25, 0.5 ve 1 ppm) ile yeniden başlatıldı. Konsantrasyonlar 1000 ppm karışım herbisit (%6.95 Halauxifen-methyl+%25 Pyroxsulam+%35.4 Cloquintocet asit) stok solüsyonundan seyreltilerek hazırlandı. Stok solüsyonu ultra safsu kullanılarak hazırlanırken diğer deneme konsantrasyonları E3 solüsyonu ile hazırlandı. Kontrol grubu sadece E3 solüsyonu içerdi. Denememiz fertilizasyondan sonra 4. saatte başlatıldı ve 96 saat boyunca devam ettirildi. Deneme yarı statik (her gün uygulama solüsyonları yenilendi) olarak yapıldı. Denemede her grup için 35 embriyo kullanılarak deney 3 kez tekrarlandı. Deneme boyunca embriyo ve larvalar 28 °C tutuldu (Köktürk, 2022). Çalışmamızda 4-96 saatleri aralığındaki zebra balığı embriyo ve larvaları kullanıldı. Zebra balığı larvaları 120 saatten küçük olduğu için bu çalışma etik izin gerektirmemektedir (Direktif 86/609/EEC ve AB Direktifi, 2010/63/EU).

Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarında Akut Toksikite ve Teratojenite Ölçümü

Zebra balığı embriyo ve larvalarında Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışımının gelişimsel parametreler (hayatta kalma oranı, larva çıkış oranı ve morfolojik anormallikler) üzerine etkileri 24, 48, 72 ve 96. saatlerde stereomikroskop altında incelendi ve fotoğraflandı.

Zebra Balığı Larvalarında Fizyolojik Toksikite Ölçümü (Larva Davranış Testi)

Karışım herbisit maruziyetinden sonra 96. saatte zebra balığı larvalarında davranış testi için lokomotor aktivite bakıldı. Davranış testi için uygulama grupları ve kontrol grubundan rastgele seçilen 16 larva (deneme 2 kez tekrar edildi) kullanıldı. Rastgele seçilen larvalar 48 kuyulu plaklara her kuyucuğa 1 larva gelecek şekilde yerleştirildi ve plaka sıcaklığı 28.5 °C'ye ayarlanan DanioVision (Noldus) gözlem bölmesine yerleştirildi. Test periyodu 10 dakikalık aralıklarla karanlık ve aydınlık şeklinde 50 dakika larva hareketleri kaydedildi. Test sonunda her bir larvanın kat ettiği mesafe 50 dakikalık süre için EthoVision (Noldus) yazılımı kullanılarak analiz edildi (Sulukan ve ark., 2022).

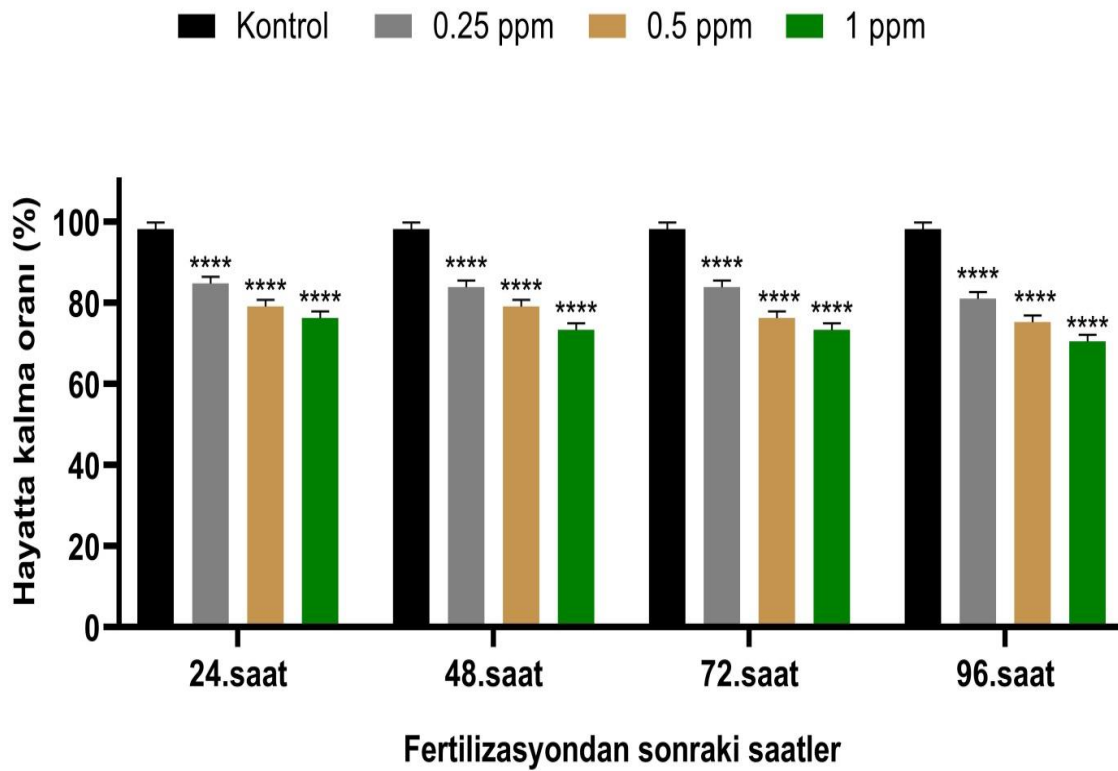
İstatistik Analizler

Hayatta kalma oranı, larva çıkış oranı, malformasyon oranı ve davranış testi için, sonuçlar ortalama ± standart hata (SH) olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak yapıldı. Uygulama ve kontrol grupları arasındaki istatistiksel farkı belirlemek için tek ve çift yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P değerleri 0.05'ten küçükse farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).

BULGULAR VE TARTIŞMA

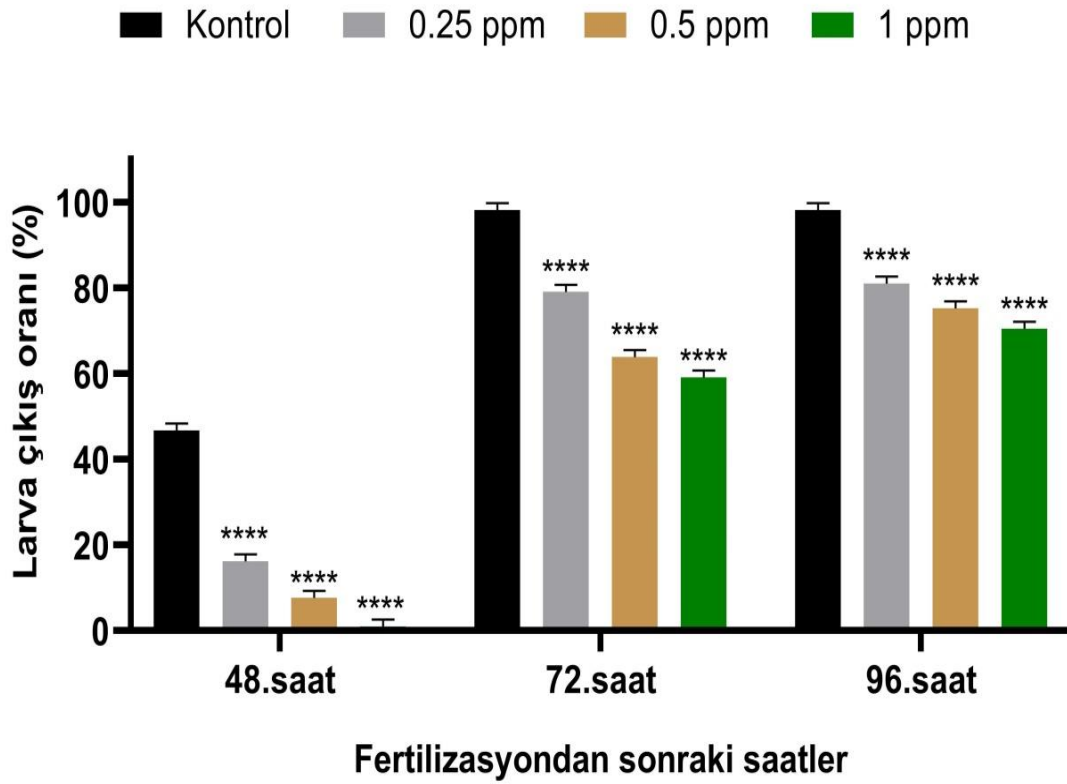
Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarında Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocetasit Karışımının Toksik ve Teratojenik Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda karışım formülasyonu herbisitlere maruz kalma sonucunda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde zebra balığı embriyo ve larvalarında belirlenen hayatta kalma oranı yüzdeleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Karışım herbisitler konsantrasyon artışına bağlı olarak embriyo ve larvalarda hayatta kalma oranını azalmasına neden olmuştur. Embriyo ve larvalardaki hayatta kalma oranları 0.25 (%81.0; $p < 0.0001$), 0.5 (%75.2; $p < 0.0001$) ve 1 (%70.5; $p < 0.0001$) ppm uygulama grupları 96. saatte kontrol (%98.1) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışım maruziyetinden sonra 24, 48, 72 ve 96. saatte zebra balığı embriyo ve larvalarda hayatta kalma oranı (n=35, deneme 3 kez tekrar edilmiştir).

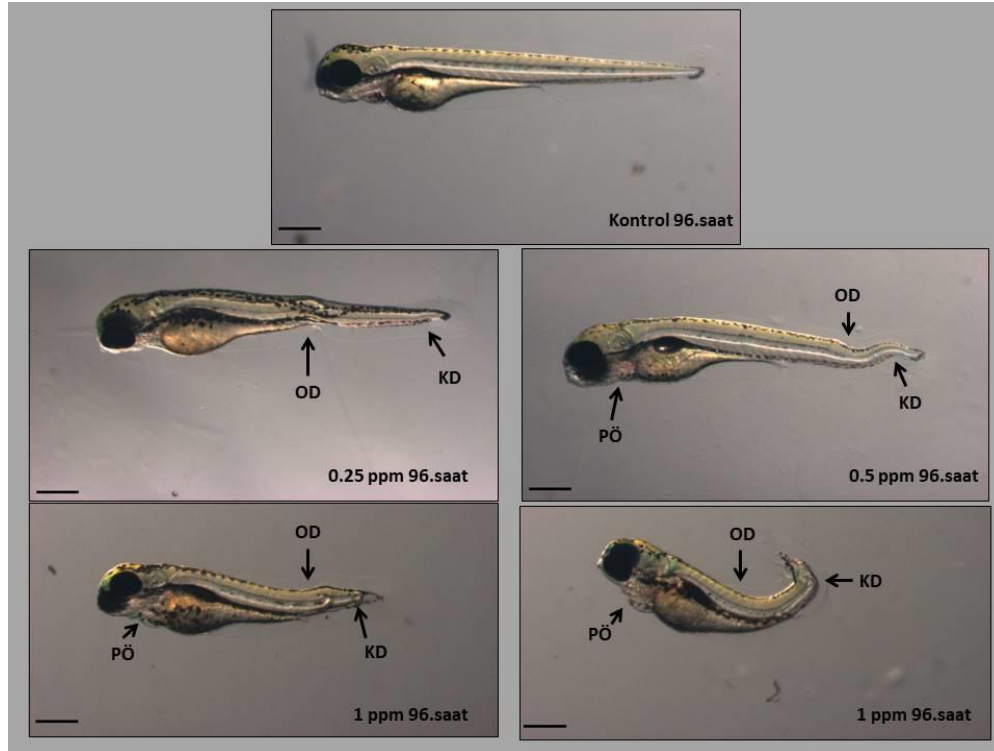
Zebra balığı embriyoları Halauxifen methyl+Pyroxsulam+ Cloquintocet asit karışımına maruz kaldığında, embriyolarının koryondan çıkışının geciktirdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Larva çıkış oranlarının 48, 72 ve 96. saatlerde 0.25, 0.5 ve 1 ppm uygulama gruplarında kontrol ile anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.0001$)(Şekil 2). Zebra balığı embriyolarında kuluçkadan çıkış başarısı hayatta kalmak için önemli bir adım olup gecikmeli kuluçkadan çıkma, canlıları avcılara karşı savunmasız hale getirebilir ve hatta yumurtadan çıkma tamamen engellenirse, koryon içinde embriyonun ölümüne yol açabilir (Ong ve ark., 2014). Çalışmamızda karışım herbisitlerin larva çıkışını geciktirmiştir ve bu gecikmenin embriyo ölümlerine neden olduğu söylenebilir. Ayrıca zebra balığı kuluçka sürecinin, koryonun iç vitellin zarfını parçalamak için kuluçka enziminin salınması ve ardından embriyonun hareketi ile zayıflamış koryonu kırması şeklinde gerçekleştiği bilinmektedir (Sano ve ark., 2008). Çalışmamızdaki kuluçka çıkışlarının gecikmesinin karışım herbisitler tarafından kuluçka enzim aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



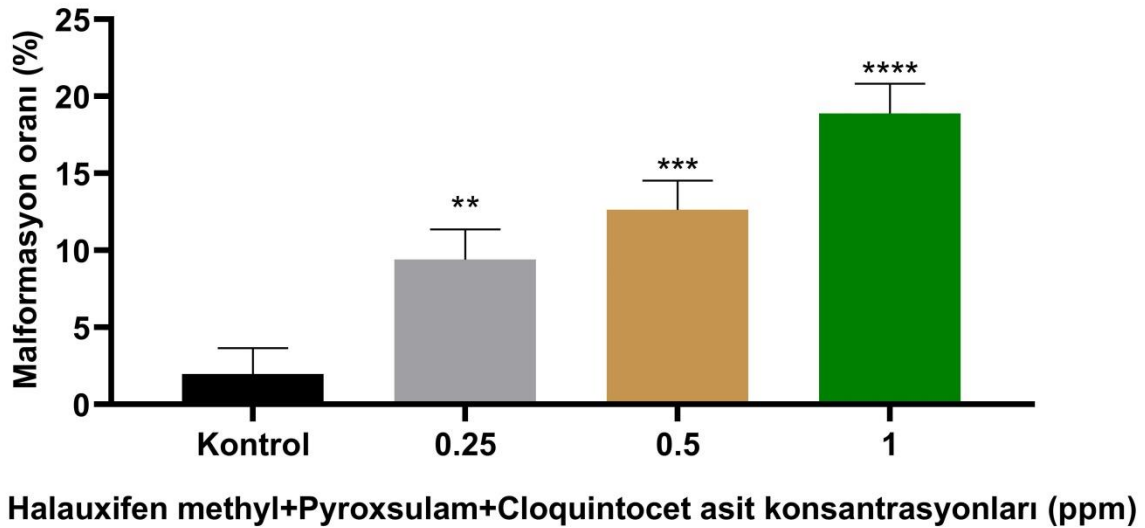
Şekil 2. Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışım maruziyetinden sonra 48, 72 ve 96. saatlerde zebra balıklarında larva çıkış oranı (n=35, deneme 3 kez tekrar edilmiştir).

Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışımına maruz kalma, zebra balığı embriyo ve larvalarında perikardial ödem, omurga ve kuyruk deformasyonları gibi malformasyonlara neden oldu (Şekil 3). Malformasyon oranları konsantrasyon artışına bağlı olarak artarken kontrol grubu ile farklılık göstermiştir ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$) (Şekil 4). Malformasyon oranları 0.25, 0.5 ve 1 ppm de sırasıyla %9.4, %12.6 ve %18.9 olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Kontrol ile farklılık olmasına rağmen %10'un altında bir morfolojik bozukluk belirlendiği için 0.25 ppm uygulama grubundaki malformasyonlar önemli kabul edilmemektedir.

Karışım halindeki herbisit veya insektisitlerin sucul canlılardaki toksik etkilerinin belirlendiği çalışmalar daha gerçekçi sonuçlar ortaya koymaktadır. Çünkü suda yaşayan organizmalar doğada kirleticilere tek olarak değil karışım halinde maruz kalmaktadırlar (Mit ve ark., 2021). Bazı çalışmalar karışım kirleticilerin, zebra balığı embriyo ve larvalarında öngörülemeyen toksik etkiler oluşturabileceğini göstermiştir (Caioni ve ark., 2021). Çalışmamızda kullandığımız karışım formülasyonu herbisitlerin zebra balığı embriyo ve larvalarda konsantrasyon (0.25, 0.5 ve 1 ppm) ve zamana bağlı olarak hayatta kalma oranı ve larva çıkış oranının azalttığı ve malformasyon oranlarını arttırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Sun ve ark., (2021) farklı karışım herbisitlere (2-metil-4-klorofenoksi asetik asit+Cyhalofop-butyl) maruz kaldıktan sonra *Cyprinus carpio* embriyolarında hayatta kalma oranı ve kuluçka oranının daha düşük, malformasyon oranının ise daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca tekli maruz kalma grubu ile karşılaştırıldığında, birleşik maruz kalma grubunda daha belirgin teratojenik etkilerin olduğu ve kombine maruz kalma grubunda embriyoların daha fazla toksik stimülasyon aldığını göstermişlerdir. İlginç bir şekilde, bazı karışım herbisitlerde (S-metolachlor+benoxacor) ise zebra balığı embriyo gelişiminde antagonistik etkilere neden olmuş ve S-metolachlor seviyeleri arttıkça kombine toksisite azaldığı görülmüştür (Liu ve ark., 2022).



Şekil 3. Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocetasit karışımına maruz bırakıldıktan sonra 96.saatteki morfolojik değişimlerin mikroskop görüntüleri. OD: omurga deformasyonu, KD: kuyruk deformasyonu, PÖ: perikardiyal ödem. Skala:0.5 mm.

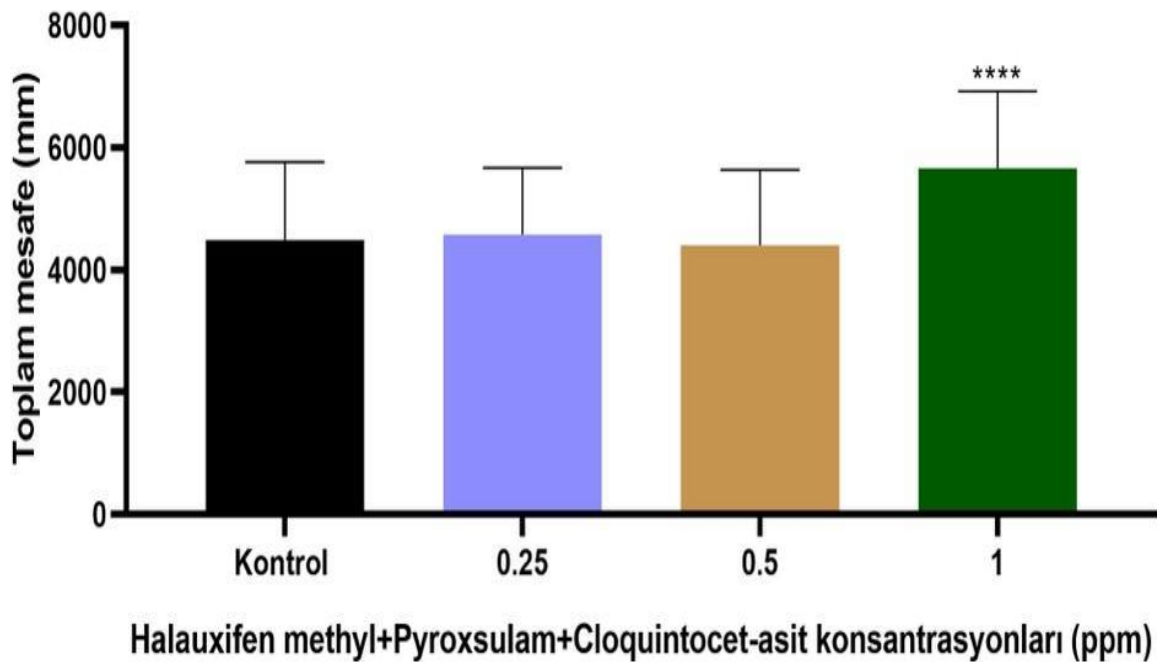


Şekil 4. Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışımına maruz bırakılan zebra balığı embriyo ve larvalardaki malformasyon oranları (n=35, deneme 3 kez tekrar edilmiştir).

Zebra balığı larvalarında Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit karışımının davranış üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlarda 96 saat karışım herbisitlere maruz bırakılan zebra balığı larvalarının lokomotor aktivitelerindeki değişimi değerlendirmek amacıyla davranış analizleri yapılmıştır. Sonuçlar analiz edildiğinde, 0.25 ve 0.5 ppm uygulama gruplarında kontrole göre kat edilen toplam mesafede herhangi bir değişim gözlenmezken özellikle 1 ppm grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$) (Şekil 5). Bu sonuçlar, karışım herbisit maruziyetinin

1 ppm konsantrasyonu kullanıldığında zebra balığı larvalarında hiperaktivite meydana getirdiğini göstermektedir. Larvalarda yüzme parametreleri, toksisite değerlendirmesi için hassas bir yaklaşım olarak kabul edilebilir (Oliveira ve ark., 2020). Zebra balığı larvalarında herbisitlerin artan lokomotor aktiviteye neden olduğu ve bununla birlikte artan stres/anksiyete meydana geldiği bildirilmiştir (Sulukan ve ark., 2023). Mevcut çalışmada da herbisit karışımının özellikle 1 ppm konsantrasyonu kullanıldığında zebra balığı larvalarında hareket aktivitesini önemli oranda artırarak hiperaktif davranışlara sebep olduğu tespit edilmiştir. Herbisitlerin tek başlarına zebra balık larvalarında yüksek konsantrasyonlarda (10-100 μ M) toplam mesafe, hız, kümülatif hareket süresi ve genel aktivitede bir artış (hiperaktivite) gösterdiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018). Farklı olarak glifosat bazlı herbisit ve fipronil bazlı insektisit karışımlarının yetişkin zebra balıklarında canlıların belli bir zamanda aldıkları toplam mesafe miktarının etkilenmediği görülmüştür (da Costa Chaulet ve ark., 2019).



Şekil 5. Zebra balığı larvalarının lokomotor aktivite analizlerinden toplam mesafenin gruplar arasındaki karşılaştırması. (n = 16, deneme 2 kez tekrarlanmıştır)

Nörodejeneratif hastalıklar için, etiyolojilerini bazı herbisitlere uzun süreli veya düşük konsantrasyonlarda maruz kalma ile ilişkilendiren kanıtlar vardır (Baltazar ve ark., 2014; Chinta ve ark., 2018; Rueda-Ruzafa ve ark., 2019; Weed, 2021). Bununla birlikte, nörodejeneratif hastalıkların altında yatan mekanizmalar karmaşık ve tam olarak anlaşılabilir değildir, bunun içinde daha ileri mekanik araştırmalar ve hayvan modellerin kullanılması gerekmektedir (McGonigle, 2014). Zebra balığı modelleri ise kolayca izlenilebilir davranış kalıpları ile merkezi sinir sistemindeki değişimlerin belirlenmesine olanak sağlar ve nörodejeneratif bozukluklar hakkında önemli veri sağlar (Bashirzade ve ark., 2022). Çalışmamızda karışım herbisitlerin yüksek konsantrasyonlarda lokomotor aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Locomotor aktivitedeki bu değişiklikler, ATP üretiminden ve/veya serbest radikallerin aşırı üretiminden sorumlu olan mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu olabilir (Wang ve ark., 2017; Wang ve ark., 2018; Ilie ve ark., 2021). Mitokondriyal fonksiyon bozulmalarının ise nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2021; Palmer ve ark., 2021). Bu durum çalışmamızdaki karışım herbisitlerin nörotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Karışım kirleticilerin toksik etkilerinin çok farklı olması bu kirleticilerin birlikte sucül ekosistemde nasıl bir toksik etki oluşturacağı hakkında tahmin edilemez yaklaşımlarla karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır. Karışım kirleticiler bazı çalışmalarda bireysel maruziyetlerinden çok daha fazla toksik (sinerjik etki) olabildiği gibi bazende daha az toksik (antagonistik) etkiye sahip olabildikleri görülmüştür. Son yıllarda karışım maddelerin toksik etkileri çalışılmaya başlanmış olsa da henüz bu karışımların toksistelerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda karışım formülasyon herbisiti (Halauxifen methyl+Pyroxsulam+Cloquintocet asit) zebra balığı embriyo ve larvalarında azalan hayatta kalma, geciken larva çıkışı ve farklı malformasyonlar ile gelişimsel toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca larvalarda yapılan davranış testleride bu karışım herbisitinin nörolojik etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamız karışım kimyasalların sucül organizmalardaki toksik etkilerinin anlaşılması açısından önemli veri sağlamaktadır. Mevcut sonuçlarımız bu karışım herbisitlerin çok daha farklı analizler ile embriyo ve larvalardaki toksisite mekanizmasının detaylı araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamızda zebra balığı embriyo ve larvaları ile deney yapma imkanı sağlayan Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sucül Biyoteknoloji Laboratuvarı'na teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler

Yazar Katkıları

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab, S. I., Aioub, A. A., Salem, R. E. ve El-Sobki, A. E. (2021). Do the herbicides pinoxaden, tribenuron-methyl, and pyroxsulam influence wheat (*Triticum aestivum* L.) physiological parameters?. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(37), 51961-51970.
- Ali, S., Ullah, M. I., Sajjad, A., Shakeel, Q. ve Hussain, A. (2021). Environmental and health effects of pesticide residues. *Sustainable Agriculture Reviews 48: Pesticide Occurrence, Analysis and Remediation Vol. 2 Analysis*, 311-336.
- Baltazar, M. T., Dinis-Oliveira, R. J., de Lourdes Bastos, M., Tsatsakis, A. M., Duarte, J. A. ve Carvalho, F. (2014). Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicology letters*, 230(2), 85-103.
- Bashirzade, A. A., Zabegalov, K. N., Volgin, A. D., Belova, A. S., Demin, K. A., de Abreu, M. S., Babchenko, V. Y., Bashirzade, K. A., Yenkovyan, K. B., Tikhonova, M. A., Amstislavskaya, T. G., ve Kalueff, A. V. (2022). Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 104679.
- Caioni, G., Merola, C., Perugini, M., d'Angelo, M., Cimini, A. M., Amorena, M. ve Benedetti, E. (2021). An Experimental Approach to Study the Effects of Realistic Environmental Mixture of Linuron and Propamocarb on Zebrafish Synaptogenesis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4664.

- Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D. T., Campisi, J. ve Andersen, J. K. (2018). Cellular senescence is induced by the environmental neurotoxin paraquat and contributes to neuropathology linked to Parkinson's disease. *Cell reports*, 22(4), 930-940.
- Costa, G., Fernandes, A., Santos, T., Brito, L., Rodrigues, L., Valadares, M., Felzenszwalb, I., Ferraz, E., Leme, D. M. ve Oliveira, G. (2022). In vitro and in vivo cytotoxicity assessment of glyphosate and imazethapyr-based herbicides and their association. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85(12), 481-493.
- da Costa Chautet, F., de Alcantara Barcellos, H. H., Fior, D., Pompermaier, A., Koakoski, G., da Rosa, J. G. S., Fagundes, M. ve Barcellos, L. J. G. (2019). Glyphosate-and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change zebrafish behavior. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77, 443-451.
- Ilie, O. D., Paduraru, E., Robea, M. A., Balmus, I. M., Jijie, R., Nicoara, M., Ciobica, A., Nita, I. B., Dobrin, R. ve Doroftei, B. (2021). The Possible Role of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on Locomotor Activity and Oxidative Stress in a Rotenone-Induced Zebrafish Model of Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- Johnson, J., Mercado-Ayon, E., Mercado-Ayon, Y., Dong, Y. N., Halawani, S., Ngaba, L., & Lynch, D. R. (2021). Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 702, 108698.
- Köktürk, M. (2022). In vivo toxicity assessment of Remazol Gelb-GR (RG-GR) textile dye in zebrafish embryos/larvae (*Danio rerio*): Teratogenic effects, biochemical changes, immunohistochemical changes. *Science of The Total Environment*, 852, 158473.
- Lan, Y., Sun, Y., Liu, Z., Wei, S., Huang, H., Cao, Y., Li, W. ve Huang, Z. (2022). Mechanism of resistance to pyroxsulam in multiple-resistant *Alopecurus myosuroides* from China. *Plants*, 11(13), 1645.
- Lee, W. S., Cho, H. J., Kim, E., Huh, Y. H., Kim, H. J., Kim, B., Kang, T., Lee, J. S. ve Jeong, J. (2019). Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale*, 11(7), 3173-3185.
- Liu, S., Wang, L., Chen, K., Yang, H., Ling, M., Wu, L., Zhou, X., Ma, G. ve Bai, L. (2022). Combined effects of S-metolachlor and benoxacor on embryo development in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113565.
- McGonigle, P. (2014). Animal models of CNS disorders. *Biochemical pharmacology*, 87(1), 140-149.
- Mit, C., Tebby, C., Gueanno, T., Bado-Nilles, A., & Beaudouin, R. (2021). Modeling acetylcholine esterase inhibition resulting from exposure to a mixture of atrazine and chlorpyrifos using a physiologically-based kinetic model in fish. *Science of the Total Environment*, 773, 144734.
- Mithila, J., Hall, J. C., Johnson, W. G., Kelley, K. B., & Riechers, D. E. (2011). Evolution of resistance to auxinic herbicides: historical perspectives, mechanisms of resistance, and implications for broadleaf weed management in agronomic crops. *Weed science*, 59(4), 445-457.
- Obenland, O. A., & Riechers, D. E. (2020). Identification of chromosomes in *Triticum aestivum* possessing genes that confer tolerance to the synthetic auxin herbicide halauxifen-methyl. *Scientific reports*, 10(1), 1-7.

- Oliveira, E. M. N., Selli, G. I., von Schmude, A., Miguel, C. A. M. I. L. A., Laurent, S., Vianna, M. R. M., & Papaléo, R. M. (2020). Developmental toxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings in zebrafish larvae. *Journal of Nanoparticle Research*, 22, 1-16.
- Ong, K. J., Zhao, X., Thistle, M. E., MacCormack, T. J., Clark, R. J., Ma, G., Martinez-Rubi, Y., Simard, B., Loo, J. S. C., Veinot, J. G. C. ve Goss, G. G. (2014). Mechanistic insights into the effect of nanoparticles on zebrafish hatch. *Nanotoxicology*, 8(3), 295-304.
- Palmer, C. S., Anderson, A. J., & Stojanovski, D. (2021). Mitochondrial protein import dysfunction: Mitochondrial disease, neurodegenerative disease and cancer. *FEBS letters*, 595(8), 1107-1131.
- Pistollato, F., de Gyves, E. M., Carpi, D., Bopp, S. K., Nunes, C., Worth, A., & Bal-Price, A. (2020). Assessment of developmental neurotoxicity induced by chemical mixtures using an adverse outcome pathway concept. *Environmental Health*, 19(1), 1-26.
- Rueda-Ruzafa, L., Cruz, F., Roman, P., & Cardona, D. (2019). Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *Neurotoxicology*, 75, 1-8.
- Saha, S., Majumder, S., Das, S., Das, T. K., Bhattacharyya, A., & Roy, S. (2018). Effect of ph on the transformation of a new readymix formulation of the herbicides bispyribac sodium and metamifop in water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100, 548-552.
- Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., & Yasumasu, S. (2008). Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme—an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *The FEBS Journal*, 275(23), 5934-5946.
- Santos, J., Barreto, A., Sousa, É. M., Calisto, V., Amorim, M. J., & Maria, V. L. (2022). The role of nanoplastics on the toxicity of the herbicide phenmedipham, using *Danio rerio* embryos as model organisms. *Environmental Pollution*, 303, 119166.
- Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M. S., & Agarwal, R. (2017). Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology Reports*, 4, 240-244.
- Singha, D., Das, S., Bhowmick, N., Kundu, A., Bhattacharyya, A., Kumar, M., Jana, M. ve Roy, S. (2022). Impact of soil type and temperature on dissipation dynamics of a new readymix formulation of halauxifen-methyl+ pyroxsulam. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 109(2), 373-378.
- Sulukan, E., Baran, A., Kankaynar, M., Kızıltan, T., Bolat, İ., Yıldırım, S., Akgül Ceyhun, H. ve Ceyhun, S. B. (2023). Global warming and glyphosate toxicity (II): Offspring zebrafish modelling with behavioral, morphological and immunohistochemical approaches. *Science of The Total Environment*, 856, 158903.
- Sulukan, E., Şenol, O., Baran, A., Kankaynar, M., Yıldırım, S., Kızıltan, T., Bolat, İ. ve Ceyhun, S. B. (2022). Nano-sized polystyrene plastic particles affect many cancer-related biological processes even in the next generations; zebrafish modeling. *Science of The Total Environment*, 838, 156391.
- Sun, Q., Guo, W., Wang, P., Chang, Z., Xia, X., & Du, Q. (2021). Toxicity of 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid alone and in combination with cyhalofop-butyl to *Cyprinus carpio* embryos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 87, 103697.
- Wang, X. H., Souders II, C. L., Zhao, Y. H., & Martyniuk, C. J. (2018). Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. *Toxicology letters*, 283, 13-20.

- Wang, Y., Liu, W., Yang, J., Wang, F., Sima, Y., Zhong, Z. M., Wang, H., Hu, L. F. ve Liu, C. F. (2017). Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology*, 58, 103-109.
- Weed, D. L. (2021). Does paraquat cause Parkinson's disease? A review of reviews. *Neurotoxicology*, 86, 180-184.
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish*. http://zfinfo.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
- Zhao, H., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Wu, Y., Wu, X., & Zheng, Y. (2015). Simultaneous determination of three herbicides in wheat, wheat straw, and soil using a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 38(7), 1164-1171.