



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

SU ÜRÜNLERİ VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ZİRAİ MÜCADELEDE YAYGIN KULLANILAN
FUNGİSİTLERİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus
mykiss*) SPERM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sami GÜNDÜZ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Burak Evren İNANAN

AKSARAY-2024



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**

SU ÜRÜNLERİ VE HASTALIKLARI ANABİLİMDALI

**ZİRAİ MÜCADELEDE YAYGIN KULLANILAN
FUNGİSİTLERİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus
mykiss*) SPERM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sami GÜNDÜZ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Burak Evren İNANAN

AKSARAY-2024

ONAY SAYFASI

Aksaray Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Sami GÜNDÜZ tarafından savunulan zirai mücadelede yaygın kullanılan fungusitlerin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sperm hücreleri üzerine etkisi isimli çalışma, jürimiz tarafından Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mustafa Öz

.....

Aksaray Üniversitesi

Onaylıyorum

☐

Onaylamıyorum

☐

Danışman: Doç. Dr. Burak Evren İNANAN

.....

Aksaray Üniversitesi

Onaylıyorum

☐

Onaylamıyorum

☐

Üye: Doç. Dr. Mustafa DURMUŞ

.....

Çukurova Üniversitesi

Onaylıyorum

☐

Onaylamıyorum

☐

Bu tez, Aksaray Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Funda ÇETİNKAYA

Enstitü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Zirai mücadelede yaygın kullanılan fungusitlerin gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sperm hücreleri üzerine etkisi isimli yüksek lisans tezinin içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını bildiririm. Beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Sami GÜNDÜZ



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, çalışmalarına katkı sunan danışmanım Doç. Dr. Burak Evren İNANAN' a,

Tezin örnekleme aşamasındaki katkılarından dolayı Aksaray Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa ÖZ' e,

Çalışmada yer alan kimyasal analizlerde bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Doç. Dr. Tülden İNANAN' a

Her zaman yanımda bulunan eşime ve oğluma,

Teşekkürlerimi sunarım.

Sami GÜNDÜZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. CPL ve özellikleri.....	3
2.2. MCZ ve özellikleri	3
2.3. AZS ve özellikleri	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1. Anaç Balıklar ve Sperm Örneklemesi	5
3.2. Sperm Dilüsyonları ve Fungisit Maruziyetleri	5
3.3. Sperm Motilite Parametreleri	5
3.4. Sperm Hücrelerinde Oksidatif Stres Parametreleri	6
3.5. Sperm Hücrelerinde Yağ Asidi Analizleri	7
3.6. İstatistik Analiz.....	7
4. BULGULAR	8
4.1. Fungisitlerin Spermatozoa Motilite Parametreleri Üzerine Etkileri.....	8
4.2. Fungisitlerin Spermatozoa Yağ Asidi Profiline Etkileri	11
4.3. Fungisitlerin Spermatozoa Lipid Peroksidasyonuna Etkileri.....	12
4.4. Fungisitlerin Spermatozoa TAK Değerlerine Etkileri.....	14
4.5. Fungisitlerin Spermatozoa SOD Aktivitesine Etkileri	15
4.6. Fungisitlerin Spermatozoa DPPH inhibisyonuna Etkileri.....	17
5. TARTIŞMA.....	20
6. SONUÇ.....	26
KAYNAKÇA.....	27

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZİRAİ MÜCADELEDE YAYGIN KULLANILAN FUNGİSİTLERİN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) SPERM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sami GÜNDÜZ

Aksaray Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burak Evren İNANAN

ÖZET

Bu çalışmada, captan (CPL), mancozeb (MCZ) ve azoxystrobin (AZS) fungusitlerinin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sperm hücreleri üzerine in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı derişimlerdeki bu fungusitlere 2 saat boyunca maruz bırakılan spermatozoa örneklerinde motilite parametreleri, lipid peroksidasyon seviyeleri, toplam antioksidan kapasiteleri (TAK), süperoksit dismutaz enzimi (SOD) aktiviteleri, DPPH inhibisyonları ve motilitenin %50 civarına düştüğü örneklerde yağ asidi kompozisyonları tayin edilmiştir. Buna göre, CPL ≥ 2 $\mu\text{g/L}$ derişimlerde, MCZ ≥ 1 $\mu\text{g/L}$ derişimlerde ve AZS ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ derişimlerde spermatozoa motilite parametrelerini istatistiki olarak azalttığı saptanmıştır ($P<0,05$). Benzer derişimlerde, TAK değerleri, SOD aktiviteleri ve DPPH inhibisyon seviyelerinde azalmalar, lipid peroksidasyonunda ise artmalar belirlenmiştir. Değerlendirilen fungusitlerinin spermatozoa motilite değerlerini %50 seviyesine düşürdüğü derişimler CPL için 10 $\mu\text{g/L}$, MCZ için 5 $\mu\text{g/L}$ ve AZS için 200 $\mu\text{g/L}$ olarak tayin edilmiştir. Bu derişimlerin bulunduğu spermatozoa örneklerinin yağ asidi profilleri incelendiğinde fungusit gruplarının neredeyse tüm yağ asitlerinde değışimlere neden olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle çoklu-doymamış yağ asitlerinin miktarlarında önemli azalmalar belirlenmiştir. Sonuç olarak 3 farklı fungusitin, gökkuşağı alabalığı sperm hücreleri kullanılarak farklı toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Azoxystrobin, Captan, Mancozeb, Spermatozoa.

Şubat, 2024; 33 sayfa

M.Sc. THESIS

EFFECTS OF COMMONLY USED FUNGICIDES IN CROP PROTECTION RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) SPERMATOOA

Sami GÜNDÜZ

Aksaray University
Graduate School of Health Sciences
Department of Aquaculture and Diseases

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Burak Evren İNANAN

ABSTRACT

In this study, the effects of captan (CPL), mancozeb (MCZ) and azoxystrobin (AZS) fungicides on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa were investigated *in vitro*. With this aim, spermatozoa samples were incubated with different concentrations of these fungicides for 2 hours, and then motility parameters, lipid peroxidation levels, total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD) activities, DPPH inhibitions and fatty acids profiles of spermatozoa samples which are at 50% motility due to the fungicides were determined. Accordingly, ≥ 2 $\mu\text{g/L}$ of CPL, ≥ 1 $\mu\text{g/L}$ of MCZ and ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ of AZS caused significantly decreases of spermatozoa motility parameters ($P < 0,05$). At the similar concentrations, decreases in TAK levels, SOD activities and DPPH inhibitions, and increases in lipid peroxidation levels were recorded. CPL at concentration of 10 $\mu\text{g/L}$, MCZ at concentration of 5 $\mu\text{g/L}$ and AZS at concentration of 200 $\mu\text{g/L}$ reduced spermatozoa motility to around %50 in the relevant samples. When fatty acids profiles of the spermatozoa samples exposure to these concentrations of the fungicides were evaluated, almost all fatty acids profiles have shown differences. Significant reductions particularly in the amount of polyunsaturated fatty acids were observed. Consequently, the different toxic effects of these fungicides have been revealed using with rainbow trout spermatozoa.

Keywords: Azoxystrobin, Captan, Mancozeb, Spermatozoa.

February, 2024; 33 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. CPL (a), MCZ (b) ve AZS'nin (c) molekül şekilleri.....	4
Şekil 4.1. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri.	8
Şekil 4.2. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri...	9
Şekil 4.3. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri	9
Şekil 4.4. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri.	10
Şekil 4.5. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri.	10
Şekil 4.6. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri.	11
Şekil 4.7. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.	13
Şekil 4.8. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.	13
Şekil 4.9. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.	14
Şekil 4.10. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.....	14
Şekil 4.11. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.....	15
Şekil 4.12. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.....	15
Şekil 4.13. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.....	16
Şekil 4.14. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.....	16
Şekil 4.15. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.....	17
Şekil 4.16. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm DPPH inhibisyonuna etkileri.....	18
Şekil 4.17. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm DPPH inhibisyonuna etkileri.....	18

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Fungisitlerin 2 saatlik maruziyet sonrasında spermatozoa yağ asidi profillerine etkileri.....	12
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

AZS	Azoxystrobin fungisiti
BSA	Sığır serum albümini
CaCl₂	Kalsiyum klorür
CPL	Captan fungisiti
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
MCZ	Mancozeb fungisiti
MgCl₂	Magnezyum klorür
Mo	Molibden
mU	miliunit
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
SOD	Süperoksit dismutaz enzimi
spz	Spermatozoa
TAK	Toplam antioksidan kapasitesine
TBARS	Tiyobarbitürik ile reaksiyona giren maddeler
VCL	Kavisli hareket hızı

1. GİRİŞ

Bitkilerde ekonomik kayba neden olan zararlı organizmalar üzerine toksik etkiye sahip kimyasallar kullanılarak yapılan mücadeleye kimyasal mücadele denmektedir. Bu kimyasallar sentetik veya doğal yollarla üretilmiş olabilmektedir. Kimyasal mücadelede zararlı öldüren anlamı taşıyan pestisit adı verilen ürünler kullanılmaktadır. Pestisitler farklı şekillerde hedef organizmaya etki eder, o organizmaya zarar verir veya öldürürler. Pestisitlerin uygulanmaları sırasında hedef dışı olan diğer canlılara ve doğadaki besin zincirine veya su döngüsüne dâhil olabilmektedirler. Böylelikle, dâhil oldukları canlı ve cansız ekosisteme göre birikme ve parçalanma sürecine girerler (Birişik, 2018). Artan tarımsal ihtiyaca bağlı olarak pestisitlerin kullanım miktarları gerek ülkemizde gerekse dünyada her geçen yıl artmaktadır. Dünya çapında pestisit kullanımının 2 milyon ton civarında olduğu tahmin edilmekle beraber, yakın gelecekte bu miktarın 3,5 milyon tona kadar yükseleceği tahmin edilmektedir (Zhang, 2018). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Tarımsal İlaç İstatistiklerine göre ülkemizde 2011-2015 yıllarında 40.000 tonun altında olan kullanım, 2016 yılından sonra bu rakamın üstüne çıkmıştır.

Etki etikleri zararlı grubuna göre sınıflandırılabilen pestisitlerin, miktar açısından değerlendirildiğinde en yaygın olarak kullanılan sınıflarından biri fungusitlerdir. Mantarlar üzerine öldürücü etkiye sahip fungusitler 2020 yılında ülkemizde 20.600 ton kullanılmıştır. Bu kullanım değeri fungusitlerin, yaygın kullanılan diğer iki pestisit sınıfı olan insektisitlere (12.347 ton) ve herbisitlere (13.250 ton) kıyasla daha çok miktarda kullanıldığını göstermektedir. Diğer pestisit sınıflarındaki etken maddeler gibi fungusitlerde, hedef dışı bir ortam olarak sucul ekosisteme dâhil olarak sucul ortamda bulunan organizmalar üzerine etkilere sebep olabilmektedirler. Öyle ki, zirai mücadele uygulamalarında kullanılan bu kimyasalların kontaminasyonları ve küresel ekosisteme etkileri incelendiğinde, sucul ekosistemin önemli derecede etkilendiği ve bu kimyasalların çoğunluğunun sucul ekosistemde bulunduğu tespit edilmiştir (Carvalho vd., 2009). Bu durumun bir getiri olarak fungusitlerin sucul canlılara olumsuz etkileri, etki mekanizmalarının, etki etme miktarlarının değerlendirilmesi ile birlikte birbirleri ile karşılaştırılmaları son yıllarda daha da önem kazanmaktadır (Marçal vd., 2020).

Alabalıklarda olduğu gibi birçok balık türünde sperm hücreleri vücut içerisinde hareketsizdirler (Alavi ve Cosson, 2005). Bunlar dış ortama bırakılıp, ortam suyu ile karıştıklarında hareket etmeye başlarlar. Bu hareket (motilite) kazanımından önce sağım yolu ile alınan sperm hücreleri (spermatozoa) seminal plazma içeriğine benzer bir çözeltide (suni seminal plazma, sulandırıcı) hareket kazanmadan muhafaza edilebilmektedir. Bu durumda spermatozoa motilitesi, çeşitli uygun aktivasyon çözeltileri seyreltilerek sağlanabilmektedir. Spermatozoa hareket kazanmadan muhafaza edildiğinde ortamının özellikleri, sperm motilite kalitesini ve diğer biyokimyasal parametrelerini etkilemektedir (Morisawa ve Suzuki, 1980; Krasznai vd., 1995; Cosson, 2004). Bununla beraber, kaliteleri direk olarak üreme potansiyelini etkileyen balık sperm hücrelerinin motilitesi, sucul kirlilik etmenleri için hassas ve doğru bir biyoindikatör olarak kabul edilmektedir (Hulak vd., 2013). Sonuçta, sulandırıcı içerisine eklenen fungusitler gibi kirleticilerin sperm hücresine etkilerinin incelenmesi, sucul ortamın geneli için iyi bir model teşkil edebilmektedir (Hatef vd., 2010; Marçal vd., 2020).

Bu çalışmada anaç gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) erkek bireylerinden elde edilen spermatozoa örneklerine, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan captan (CPL), mancozeb (MCZ) ve azoxystrobin (AZS) fungusitlerinin etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaç ile bu fungusitlerin farklı derişimlerine 2 saatlik maruz bırakılan spermatozoa örneklerinin motilite parametreleri, oksidatif stres koşulları ve yağ asidi kompozisyonları analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. CPL ve özellikleri

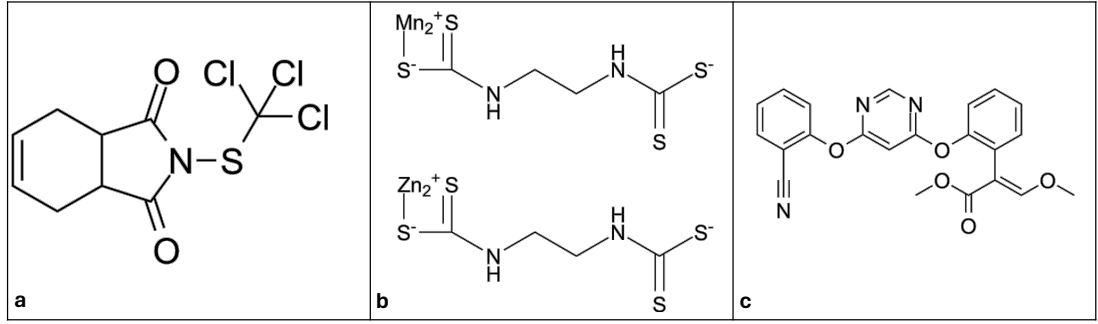
300,59 g/mol molekül ağırlığına sahip CPL'nin formülü $C_9H_8Cl_3NO_2S$ 'dir ve molekül şekli Şekil 2.1'de sunulmuştur. Carboximid grubunda olan bu fungusit, birçok meyve, sebze, tütün ve süs bitkileri hastalıkları için kullanılan geniş spektrumlu bir fungusit olup hücrede protein ve enzimlerin çalışmasını engeller, mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon aşamalarını etkileyerek solunumu engellenmektedir. Sonuç olarak sporların çimlenmesini ve büyümesini önlemektedir (Gopalakrishnan vd., 2012; Zhou vd., 2019). Ayrıca, CLP küf önleyici olarak boya, vernik ve duvar kâğıdı yapıştırıcısı gibi ürünlerde endüstriyel alanlarda da kullanılmaktadır (Boran vd., 2012).

2.2. MCZ ve özellikleri

Molekül ağırlığı 661,36 g/mol olan MCZ'nin molekül şekli Şekil 2.1'de verilmiş olup formülü $C_8H_{12}Mn_2N_4S_8Zn_2^{-2}$ 'dir. MCZ bir ethylenebisdithiocarbamate grubu fungusittir. Ascomycete, basidiomycete, oomycete şubeleri üzerine etkilidir. Kullanım alanı çok geniştir tarla, süs bitkileri ilaçlamalarında yaygınca kullanılmakta olup 70'ten fazla zirai üründe ve 400 civarında farklı hastalık için kullanılmaktadır (Saha vd., 2016; Wang vd., 2021). MCZ mangan, çinko ve bir organosülfür bileşiği olan etilen tiyoüre ($C_2H_6N_2S$) alt gruplarında oluşmuştur ve bu alt gruplar çoklu toksik etki yaratmaktadır. Enzim aktivitelerinin ve diğer hücresel fonksiyonların durdurarak fungusun gelişmesini engellemektedir (Geissen vd., 2010).

2.3. AZS ve özellikleri

$C_{22}H_{17}N_3O_5$ formülüne sahip olan AZS molekül şekli Şekil 2.1'de sunulmuştur. AZS'nin molekül ağırlığı 403,39 g/mol'dür. Geniş spektrumlu ve yüksek etkili bir fungusit olan AZS strobilirin grubundadır. Bu fungusit, soya fasulyesi, pirinç, tahıllar, sebzeler ve meyveler için ilaçlamada yaygın olarak kullanılır (Rodrigues vd., 2013). AZS elektron transfer sistemini bloke ederek mitokondriyal solunumu engeller (Jia vd., 2018). Böylece metabolizmada bozulmalar meydana gelir ve büyüme engellenir (Olsvik vd., 2010).



Şekil 2.1. CPL (a), MCZ (b) ve AZS' nin (c) molekül şekilleri.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Anaç Balıklar ve Sperm Örneklemesi

Tez çalışması, Aksaray Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi 2022/4-8 karar sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında ticari bir işletmede, üretimde kullanılan anaç gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) erkek bireylerinden elde edilen spermatozoa örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada, 2-3 yaşındaki 15 anaç bireyden (575 ± 20 gr., 29 ± 2 cm) alınan spermatozoa örnekleri kullanılmıştır. Örnekler erkek anaçlardan abdominal masaj (sağım) yöntemi ile alınmıştır. Sağım ile alınan örneklerde, su, kan, idrar veya feçes kaynaklı herhangi bir kontaminasyon olmamasına dikkat edilmiştir. Her bir örnekteki spermatozoa yoğunluğu, Thoma lamı kullanılarak hemositometrik yöntem ile belirlenmiştir.

3.2. Sperm Dilüsyonları ve Fungisit Maruziyetleri

Sperm hücrelerinin hareketsiz kılınması için sulandırıcı olarak 130 mM NaCl, 40 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 2 mM NaHCO₃, pH 8.0 kullanılmıştır (Kobayashi vd., 2004). CPL, MCZ ve AZS fungusitleri için dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülerek stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Sonrasında sulandırıcı yardımı ile hedeflenen derişimler hazırlanmıştır. Hedef derişimi içeren sulandırıcılar ile spermatozoa örnekleri 5×10^8 hücre/ml yoğunluğu olacak şekilde fungusit maruziyeti uygulanmıştır (Li vd., 2010). Nihai derişimlerdeki DMSO derişimi %0,5'den az miktarda bulunmuştur. Bu sebeple, çalışmada fungusit içermeyen sadece sulandırıcı ile muamele edilen ve kontrol olarak kabul edilen grup ile %0,5 DMSO içeren bir kontrol gurubu daha oluşturulmuştur. Fungisit maruziyeti, sulandırılan spermatozoa örneklerinin 2 saat 4°C'de saklanması ile gerçekleştirilmiştir (Hulak vd., 2010). Her sulandırma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. Sperm Motilite Parametreleri

Fungisit maruziyetleri sonrasında, sperm hücreleri %0,5 BSA, 60 mM NaHCO₃, 50 mM Tris, pH=9,0 (Lahnsteiner, 2000) içeriğine sahip bir aktivasyon solüsyonu ile hareketlendirilmiştir. Örnek ve aktivasyon solüsyonu oranı 1:400 olarak ayarlanmıştır (İnanan ve Yılmaz, 2018). Çalışmada sperm motilite parametreleri olarak motilite (%) ve VCL (kavisli hareket hızı, $\mu\text{m/s}$) belirlenmiştir. Bu parametreler, spermatozoa

aktivasyonunun 12. saniyesinde görüntüye göre tayin edilmiştir. VCL değeri 25 $\mu\text{m/s}$ 'den büyük değere sahip sperm hücreleri hareketli (motil) kabul edilmiştir. Motilite parametreleri tayinleri, Leica DM750 mikroskop ve Leica MC190 HD kamera (Wetzlar, Almanya) ile kaydedilen görüntülerin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Wilson-Leedy ve Ingermann, 2007; Boryshpolets vd., 2013; İnanan ve Kanyılmaz, 2020). Her bir örnek 3 tekrarlı olarak değerlendirilmiştir.

3.4. Sperm Hücrelerinde Oksidatif Stres Parametreleri

Fungisitler ile maruziyet sonrasında, kontrol örnekleri dahil tüm örnekler yıkama ve santrifüj işlemlerinden geçirilmiştir. Tüm örnekler, $1.000 \times g$ hızında 4°C 'de 10 dakika santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantlar atılarak, kalan pelletler yukarıda belirtilen sulandırıcı ile 5×10^8 hücre/ml yoğunluğu dikkate alınarak tekrar sulandırılmışlardır. Bu işlem tekrar edilmiştir. Daha sonrasında bu süspansiyonlar buz içerisinde ultrasonikasyon ile 10 s boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar tekrar $5.000 \times g$ hızında 4°C 'de 10 dakika santrifüj edilerek içlerinden hücre kalıntılarından kurtarılmıştır. Bu homojenatlara ait süpernatantlar alınarak oksidatif stres parametrelerinin ölçümünde kullanılmıştır.

Spermatozoa örneklerinin lipid peroksidasyonu seviyelerinin bir göstergesi olarak TBARS (Tiyobarbitürik ile reaksiyona giren maddeler) değerleri spektrofotometrik olarak 535 nm'de belirlenmiştir. Sulandırılan sperm örnekleri 4°C 'de 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernant atılarak oluşan pelet analiz edilmiştir (Asakawa ve Matsushita, 1980; Dzyuba vd., 2014). TBARS değerleri $\text{nmol}/10^8$ spermatozoa (spz) olarak hesaplanarak sunulmuştur. Toplam antioksidan kapasitesi (TAK) molibden (Mo) indirgenmesi ile ölçülmüştür. Mo(VI)'nın Mo(V)'e asidik ortamda indirgenerek yeşil renkli fosfat ve Mo(V) kompleksinin oluşumuna dayalı olarak ölçülmüştür. Mo kaynağı olarak amonyum molibdat kullanılarak elde edilen karışım 95°C 'de 90 dakika inkübe edildikten sonra 695 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak askorbik asit çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen TAK değerleri μg Askorbik asit (AA) olarak hesaplanmıştır (Prieto vd., 1999). Süperoksit dismutaz enzimi (SOD) aktivitesi pirogallolun otooksidasyonuna göre ölçülmüştür. Spermatozoa örnekleri SOD aktiviteleri 420 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. SOD aktivitesi $\text{mU}/10^8$ spz olarak ifade edilmiştir (Marklund ve Marklund, 1974; Shaliutina-Kolešová vd., 2014). Ayrıca, elde edilen spermatozoa örneklerinin DPPH serbest

radikalinin inhibisyonu kabiliyeti ölçümü de değerlendirilmiştir. Hazırlanan DPPH çözeltisi ile muamele edilen örneklerin absorbanı 517 nm'de ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır (Wang vd., 2014). DPPH inhibisyonu yüzde (%) olarak tayin edilmiştir.

3.5. Sperm Hücrelerinde Yağ Asidi Analizleri

Tez çalışma kapsamında, motilite değerlerinin %50 seviyesine indiği fungusitleri içeren sulandırma derişimlerinde yağ asitleri profilleri tayin edilmiştir. Bu yağ asitleri analizleri için spermatozoa örneklerinin öncelikle örneklerden yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Bligh ve Dyer, 1959). Yağ eldesinden sonra örnekler yağ asidi profili analizleri için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan örneklerin yağ asidi metil ester kantitatif analizi için 0,1 gram yağ numunesine 10 ml hekzan eklenerek iyice karıştırılmıştır. 0,5 ml 2N metanollü KOH çözeltisi eklenmiştir. 2 saat karanlık ortamda bekletilerek üst faz alınmıştır. Bu ön işlem sonrasında yağın içerik analizi GC/MS (Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA) ile yapılmıştır. Analizdeki sistem bilgileri şu şekildedir; kolon: RTX-2300 Kapiler kolon (60m ; 0.25 mm; 0.2 μ m), taşıyıcı gaz: helyum, kolon fırını sıcaklığı: 100°C, enjeksiyon sıcaklığı: 250°C, basınç: 90 kPa, enjeksiyon modu: split, split oranı: 50, enjeksiyon hacmi: 1 μ l, fırın sıcaklık programı: 100°C'de 5 dk, 100°C'den 240°C'ye 4°C/dk artışla, 240°C'de 15 dk., interface sıcaklığı: 250°C, iyon kaynağı sıcaklığı: 200°C, Standart referans madde olarak USP FAME mix kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar mg/g yağ olarak sunulmuştur.

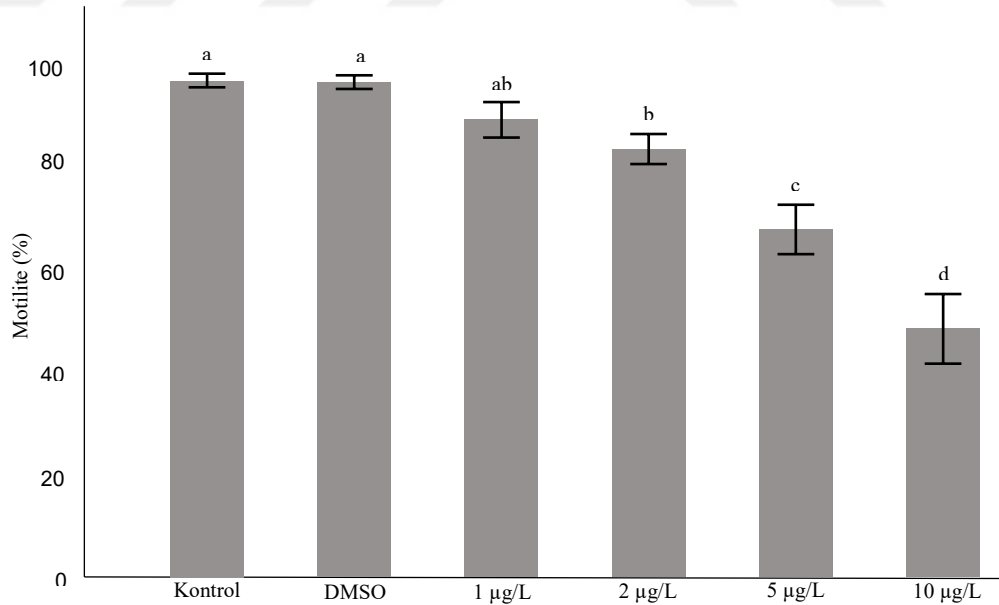
3.6. İstatistik Analiz

Her bir fungusitin farklı derişimlerdeki spermatozoa motilite parametreleri, Oksidatif Stres Parametreleri ve saptanan Yağ Asitlerinden edilen veriler üzerinde, tek yönlü varyans (ANOVA) ve ikili karşılaştırma için Tukey' s testi yapılmıştır. İstatistik analizlerde farklılıklar, önem derecesi 0,05 dikkate alınarak belirlenmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Grafiklerde ve çizelgede, istatistik farklılıklar farklı küçük harfler ile, istatistik olarak önemli farklar olmadığı durumlar ise aynı küçük harfler ile ifade edilmiştir.

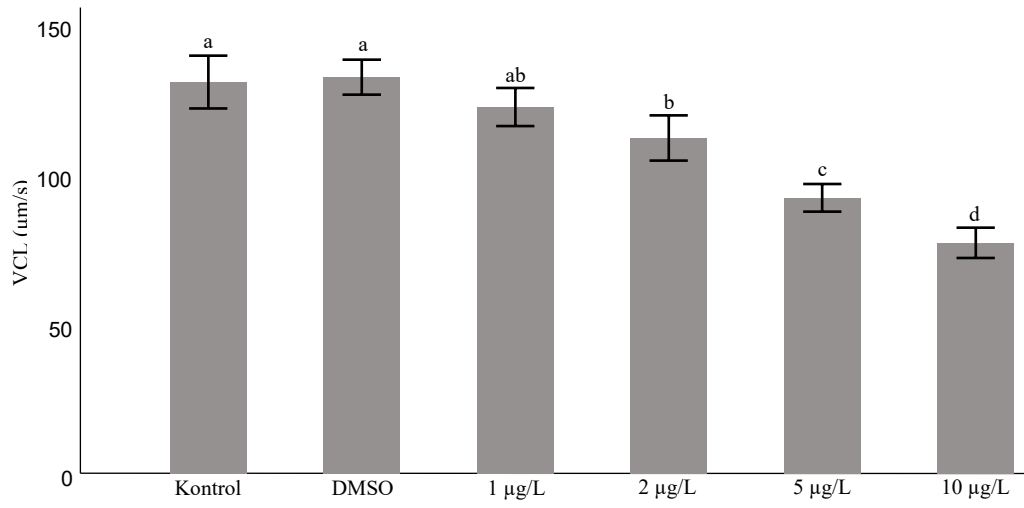
4. BULGULAR

4.1. Fungisitlerin Spermatozoa Motilite Parametreleri Üzerine Etkileri

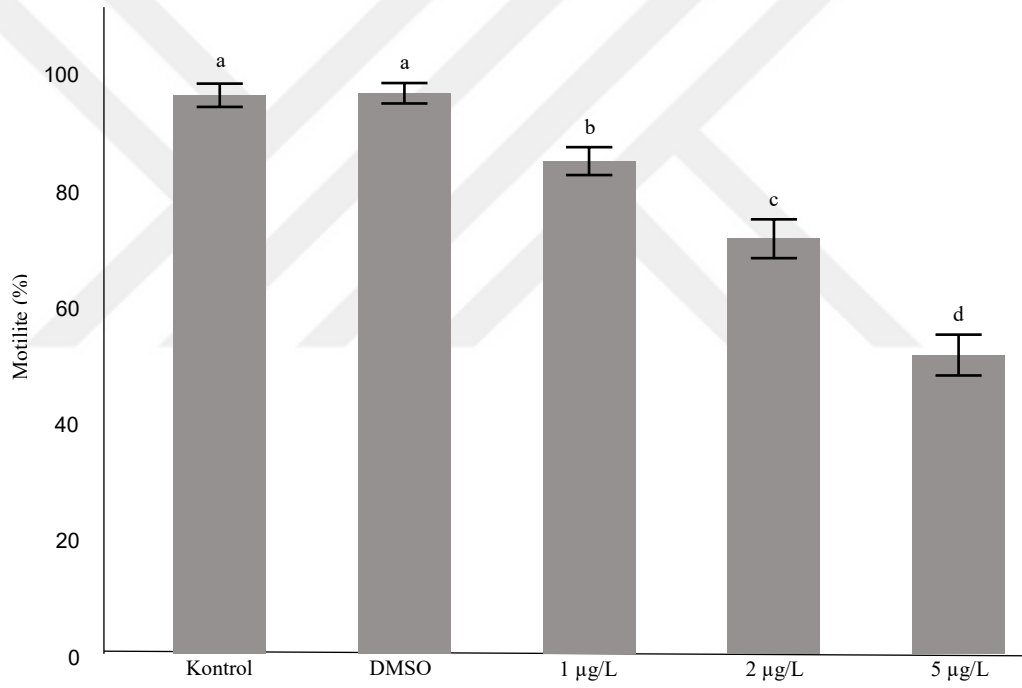
Çalışmada değerlendirilen fungusitlerin farklı derişimlerdeki spermatozoa motilite ve VCL değerleri üzerine etkileri incelenmiştir. CPL fungusitinin motilite ve VCL değerleri üzerine etkileri Şekil 4.1. ve 4.2’de sırasıyla verilmiştir. Buna göre 10 µg/L derişimindeki CPL inkübasyonu sonucunda sperm motilite değeri %48±6 olarak kaydedilmiş, aynı oranda VCL değeri 77±4 µm/s olarak hesaplanmıştır. ≥2 µg/L CPL, motilite ve VCL değerlerine istatistiksel olarak önemli derecede düşüşlere sebep olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Buna karşın 5 µg/L derişimindeki MCZ fungusiti motilite değerini %51±3 değerine düşürmektedir (Şekil 4.3). Aynı derişimdeki MCZ grubunda VCL değerini ise 73±4 µm/s olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). Ortamdaki en az MCZ derişimi motilite parametrelerini olumsuz yönde etkilemektedir ($P < 0,05$). Şekil 4.5. ve 4.6’da AZS fungusitinin spermatozoa motilite ve VCL değerlerine etkileri gösterilmiştir. 200 µg/L AZS, motilite değerini %52±5’e düşürmüştür. Aynı derişimde, VCL değeri 83±4 µm/s olarak saptanmıştır. ≥5 µg/L AZS, spermatozoa motilite parametreleri negatif yönde etkilemektedir ($P < 0,05$).



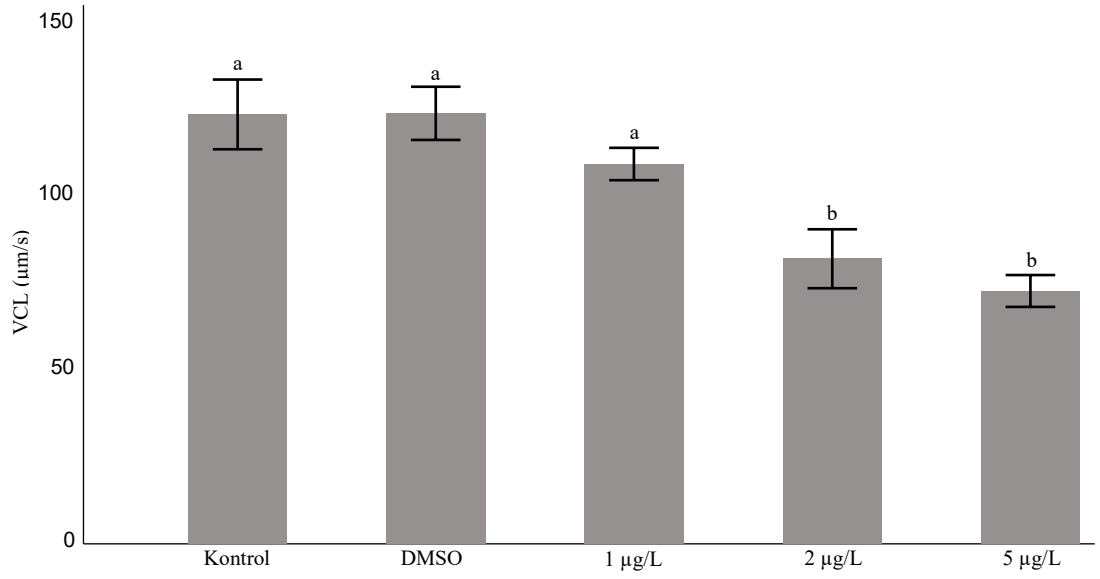
Şekil 4.1. CPL’nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri.



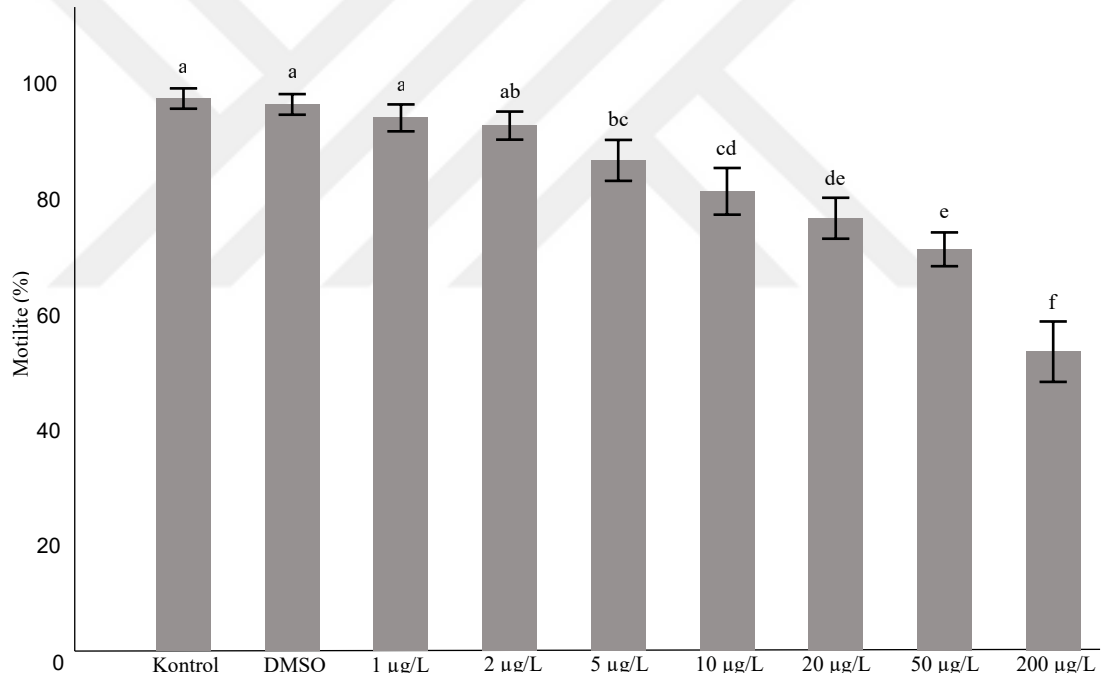
Şekil 4.2. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri.



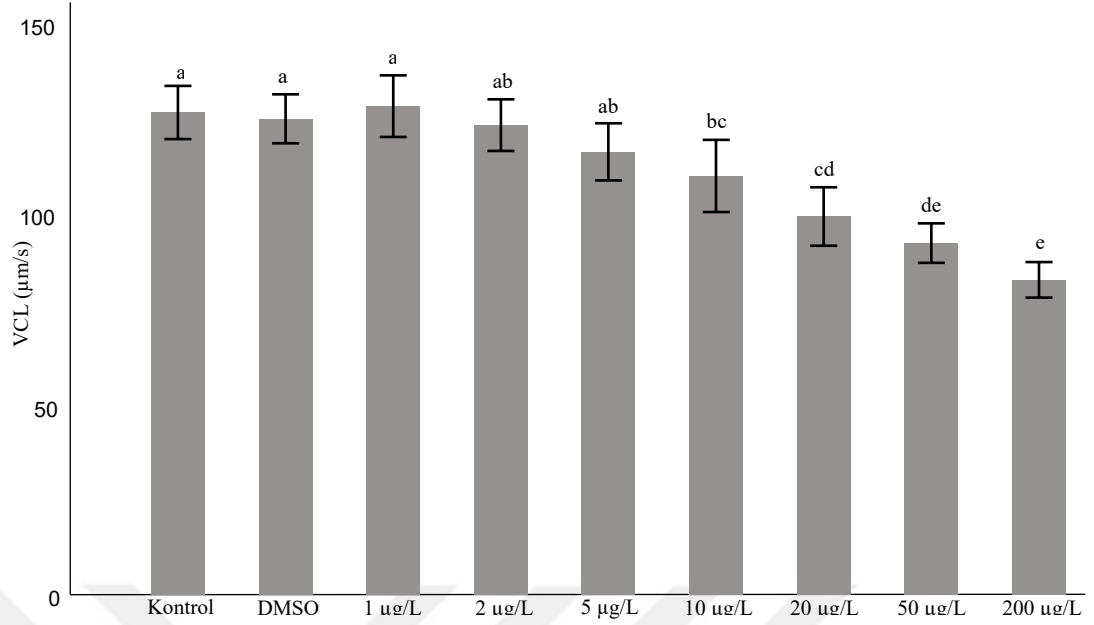
Şekil 4.3. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri



Şekil 4.4. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri.



Şekil 4.5. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm motilite oranlarına etkileri.



Şekil 4.6. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm VCL değerlerine etkileri.

4.2. Fungisitlerin Spermatozoa Yağ Asidi Profiline Etkileri

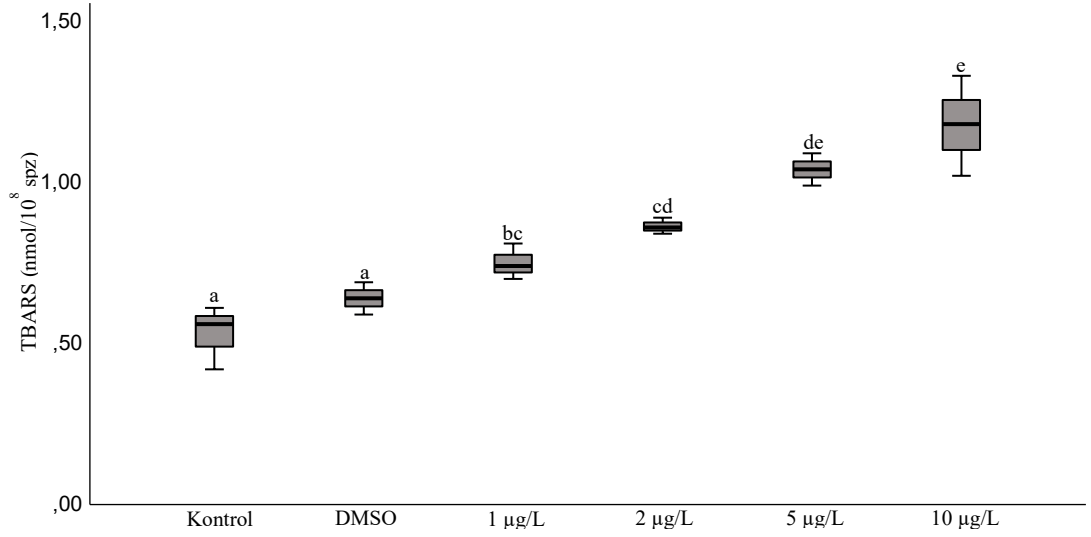
İncelenen fungusitlerin spermatozoa motilite değerlerini %50 seviyesine düşürdüğü derişimlerinde inkübe edilen spermatozoa örneklerinin yağ asidi profillerinin kontrol grupları ile karşılaştırılmaları Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Saptanan neredeyse tüm yağ asitlerinde kontrol grupları ile fungusit grupları arasında istatistiki farklar bulunmuştur ($P < 0,05$). Bu farklılıklar toplam SFA, MUFA ve PUFA değerlerine de yansımıştır. Fungisitlerin inkübasyonu sunucunda SFA, MUFA ve PUFA değerlerinde azalmalar saptanmıştır. Özellikle PUFA değerleri uygulanan her 3 fungusit içinde istatistiki farklar göstermiştir. Yağ asidi miktarları açısından bir sıralama yapıldığında kontrol > MCZ > CPL > AZS olduğu gözlemlenmektedir.

Çizelge 4.1. Fungisitlerin 2 saatlik maruziyet sonrasında spermatozoa yağ asidi profillerine etkileri.

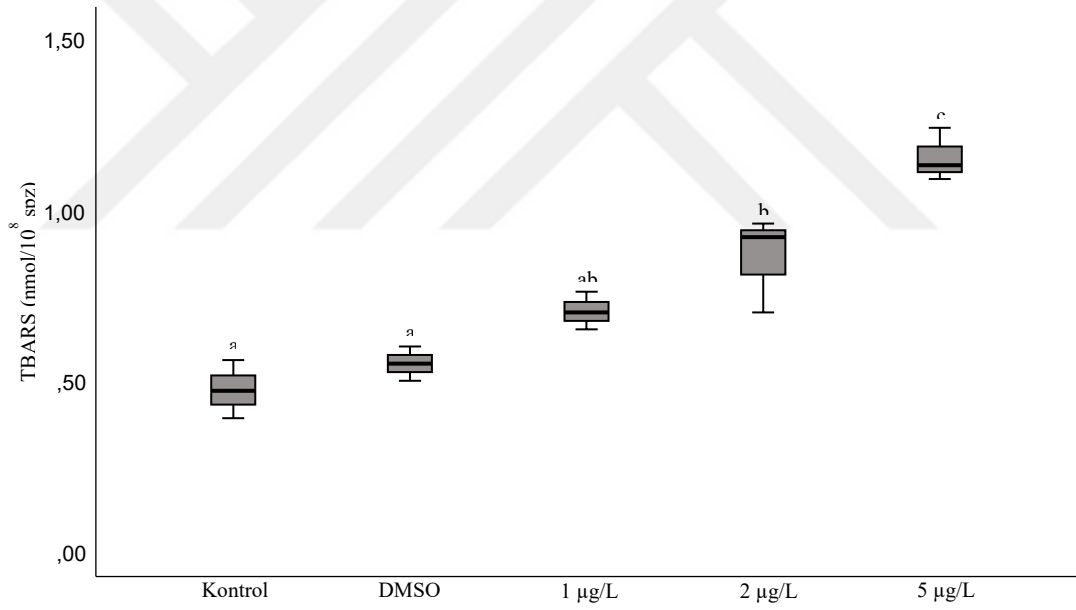
Yağ Asitleri (mg/g yağ)	Kontrol	Kontrol (DMSO)	CPL (10 µg/L)	MCZ (5 µg/L)	AZS (200 µg/L)
C8:0	0,16±0,01 ^c	0,17±0,01 ^c	0,41±0,01 ^a	0,21±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b
C10:0	0,21±0,01 ^a	0,21±0,01 ^a	0,23±0,01 ^b	0,24±0,01 ^b	0,22±0,01 ^a
C12:0	0,36±0,02 ^a	0,35±0,01 ^{ab}	0,36±0,01 ^{ab}	0,35±0,01 ^{ab}	0,34±0,01 ^b
C14:0	10,62±0,47 ^{ab}	10,90±0,10 ^a	10,53±0,09 ^{ab}	10,24±0,10 ^b	9,32±0,05 ^c
C16:0	297,27±0,79 ^a	297,57±1,00 ^a	293,08±0,62 ^b	291,36±0,44 ^b	262,85±0,65 ^c
C16:1	9,55±0,33 ^a	9,51±0,17 ^a	8,51±0,13 ^b	8,91±0,17 ^b	7,94±0,11 ^c
C17:0	2,45±0,10 ^{ab}	2,56±0,12 ^a	2,36±0,01 ^b	2,43±0,01 ^{ab}	2,12±0,02 ^c
C18:0	59,64±0,38 ^{ab}	60,08±0,77 ^a	58,09±0,09 ^c	59,04±0,10 ^b	50,95±0,21 ^d
C18:1	151,42±0,64 ^a	150,40±0,52 ^a	144,91±0,69 ^b	150,51±0,62 ^a	131,89±0,65 ^c
C18:2	107,54±1,08 ^a	106,52±0,62 ^a	102,01±0,73 ^b	102,13±0,47 ^b	92,21±0,37 ^c
C20:0	0,66±0,02 ^b	0,66±0,01 ^b	0,69±0,01 ^b	0,83±0,01 ^a	0,62±0,01 ^c
C18:3	5,69±0,28 ^a	5,55±0,47 ^a	5,07±0,07 ^{ab}	5,17±0,12 ^{ab}	4,69±0,14 ^b
C20:1	4,46±0,45 ^a	4,25±0,20 ^b	4,12±0,13 ^b	4,26±0,19 ^b	3,67±0,12 ^{ab}
C21:0	0,38±0,03	0,38±0,02	0,37±0,01	0,40±0,01	0,37±0,01
C20:3	96,53±0,66 ^a	96,43±0,63 ^a	86,55±0,40 ^c	88,46±0,62 ^b	82,23±0,57 ^d
C20:5	127,66±1,66 ^a	126,72±0,59 ^a	119,72±0,36 ^c	123,12±0,63 ^b	110,75±0,84 ^d
C24:1	1,43±0,19 ^a	1,42±0,13 ^a	1,11±0,09 ^b	1,33±0,05 ^{ab}	1,07±0,05 ^b
C21:1	8,37±0,51 ^a	8,17±0,16 ^a	7,45±0,09 ^{bc}	7,84±0,08 ^{ab}	7,08±0,12 ^c
C22:6	290,82±2,11 ^a	292,09±2,25 ^a	266,55±1,13 ^c	279,67±1,21 ^b	256,80±1,82 ^d
SFA	371,77±0,90 ^a	372,88±0,84 ^a	366,12±0,53 ^b	365,10±0,48 ^b	327,00±0,87 ^a
MUFA	166,86±0,74 ^a	165,58±0,43 ^{ab}	158,64±0,86 ^c	165,00±0,67 ^b	144,56±0,92 ^d
PUFA	636,61±3,13 ^a	635,49±3,05 ^a	587,35±2,54 ^c	606,39±2,90 ^b	553,76±2,94 ^d

4.3. Fungisitlerin Spermatozoa Lipid Peroksidasyonuna Etkileri

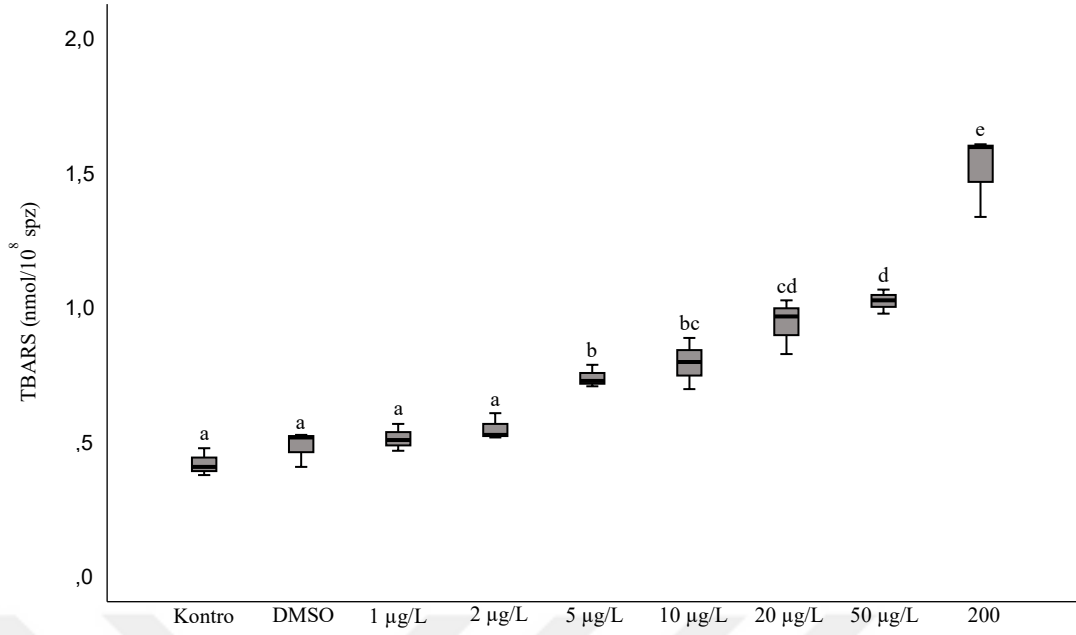
Farklı derişimlerdeki CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin spermatozoa Lipid Peroksidasyonu seviyelerinin değerlendirilmesi için ölçülen TBARS değerleri sırasıyla Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da verilmiştir. Motilite değerlerinin %50 seviyesine düştüğü derişimlerde CPL inkübasyonu sonucu TBARS 1,2±0,2 nmol/10⁸ spermatozoa olarak, MCZ inkübasyonunda 1,1±0,1 nmol/10⁸ spermatozoa ve AZS inkübasyonunda 1,5±0,2 nmol/10⁸ spermatozoa olarak ölçülmüştür. TBARS değerleri 2 µg/L CPL,, 1 µg/L MCZ ve 5 µg/L AZS derişimleri ve daha yüksek derişimlerde istatistiki açıdan anlamlı olarak artmıştır ($P < 0,05$).



Şekil 4.7. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.



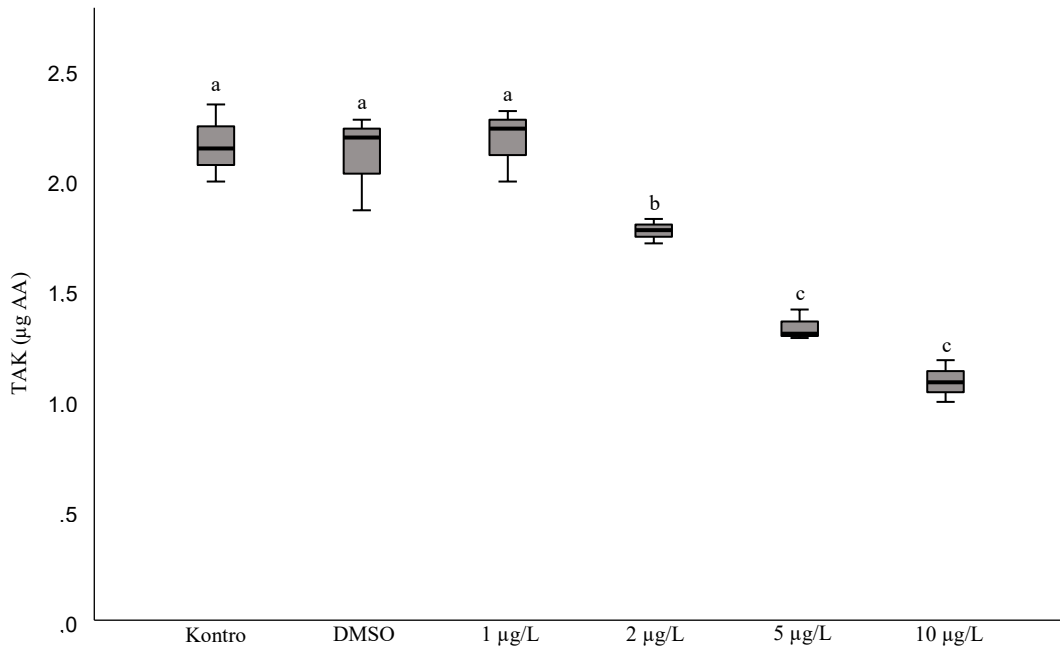
Şekil 4.8. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.



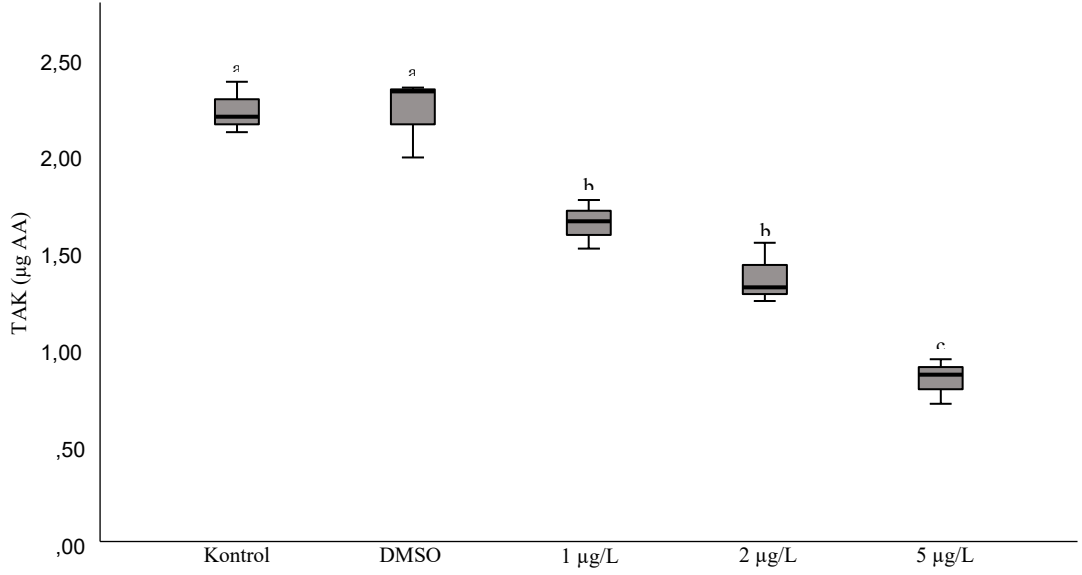
Şekil 4.9. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TBARS değerlerine etkileri.

4.4. Fungisitlerin Spermatozoa TAK Değerlerine Etkileri

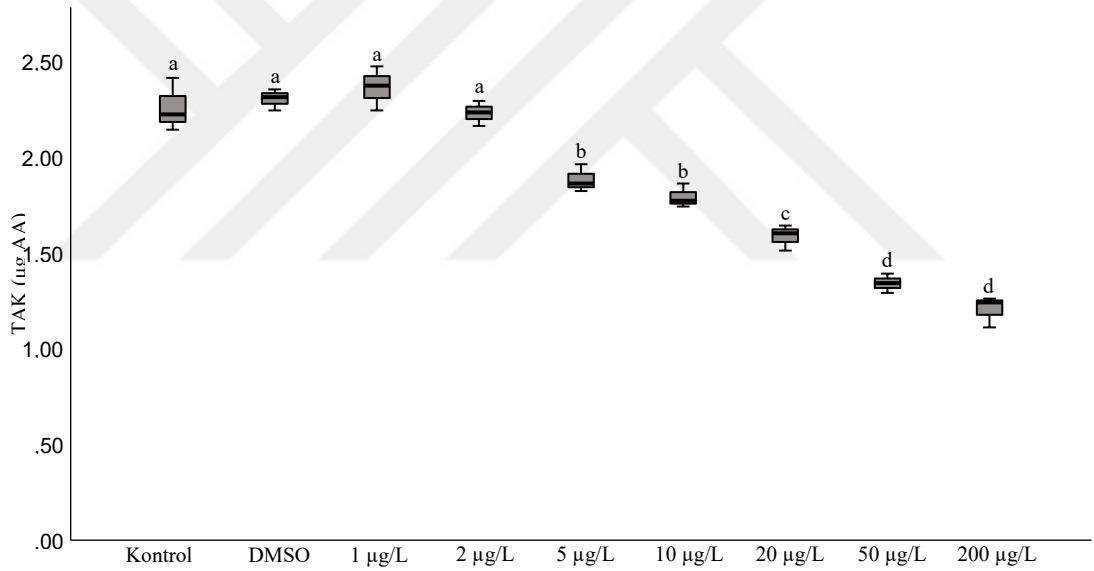
Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12'de sunulan, CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin spermatozoa TAK değerlerine etkileri incelendiğinde, derişime bağılı olarak bu değerlerde azalmalar gözlemlenmektedir. 10 µg/L CPL inkübasyonu sonucunda TAK değeri $1,08 \pm 0,10$ µg AA olarak, 5 µg/L MCZ'de $0,84 \pm 0,12$ olarak 200 µg/L AZS'de $1,20 \pm 0,08$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.10. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.



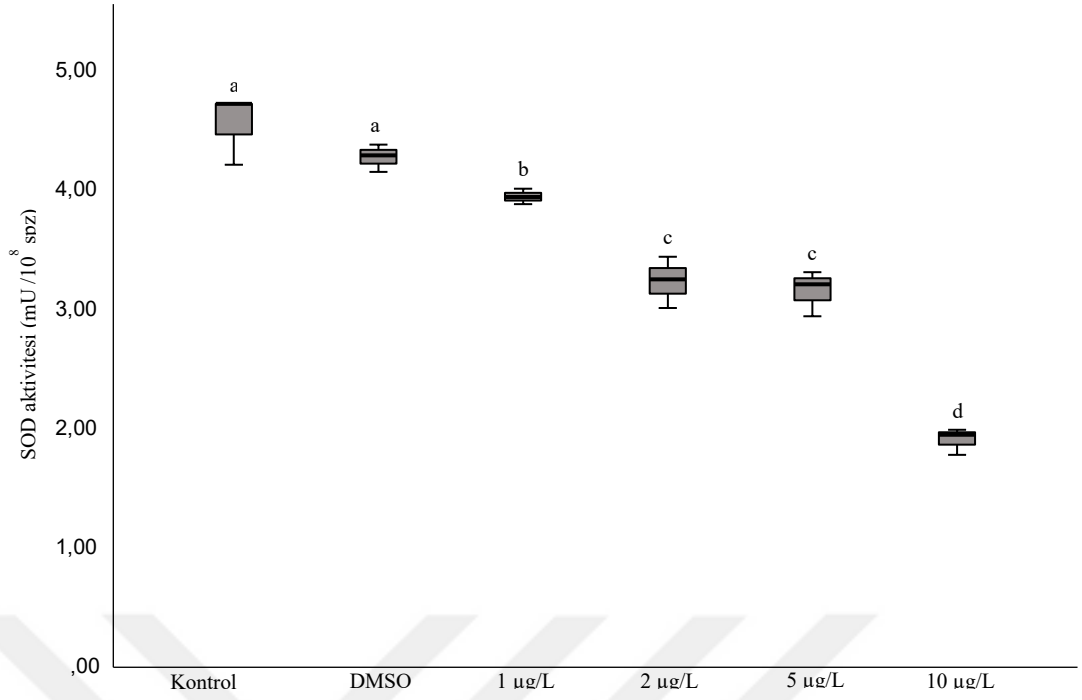
Şekil 4.11. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.



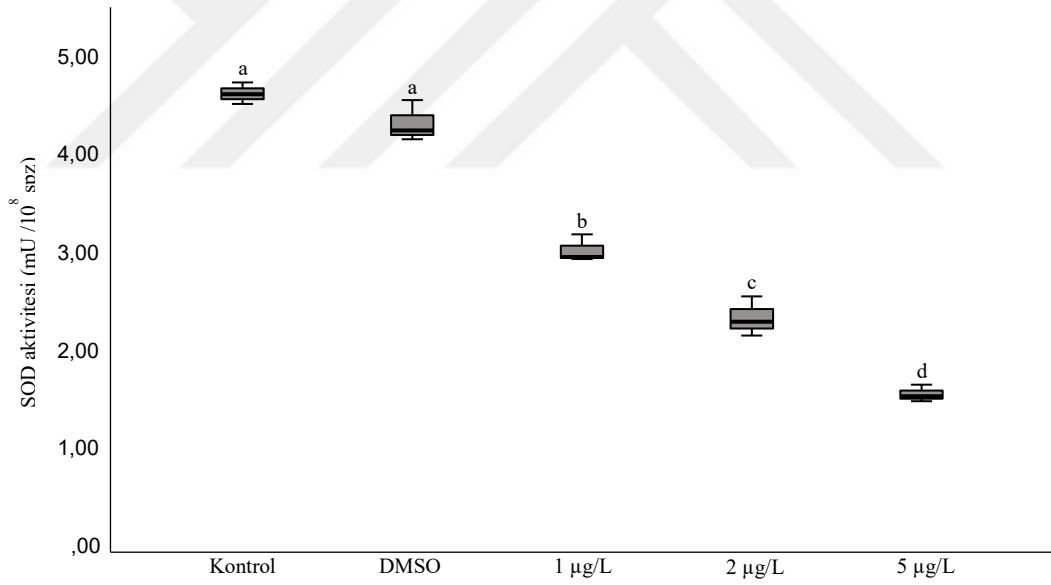
Şekil 4.12. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm TAK değerlerine etkileri.

4.5. Fungisitlerin Spermatozoa SOD Aktivitesine Etkileri

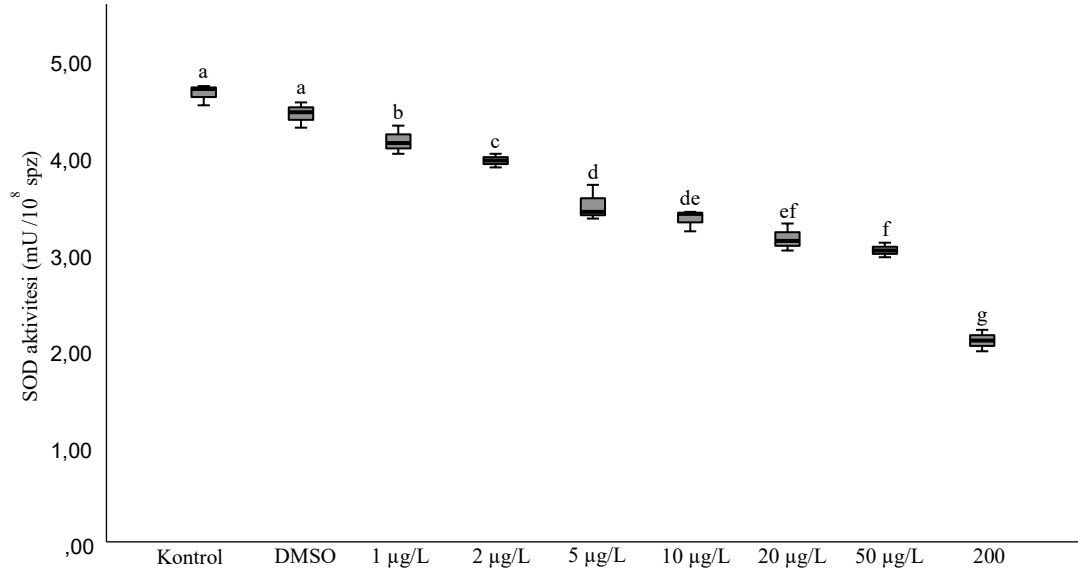
Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15'de sunulan farklı derişimlerdeki CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin, spermatozoa SOD aktivitesine olumsuz etkileri görülmektedir. İstatistiki açıdan anlamlı bir şekilde kontrol gruplarında farklı olan 10 µg/L CPL, 5 µg/L MCZ ve 200 µg/L AZS inkübasyon gruplarında SOD aktivitesi $1,91 \pm 0,11$, $1,61 \pm 0,09$ ve $2,08 \pm 0,11$ mU/ 10^8 spz olarak sırasıyla ölçülmüştür.



Şekil 4.13. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.



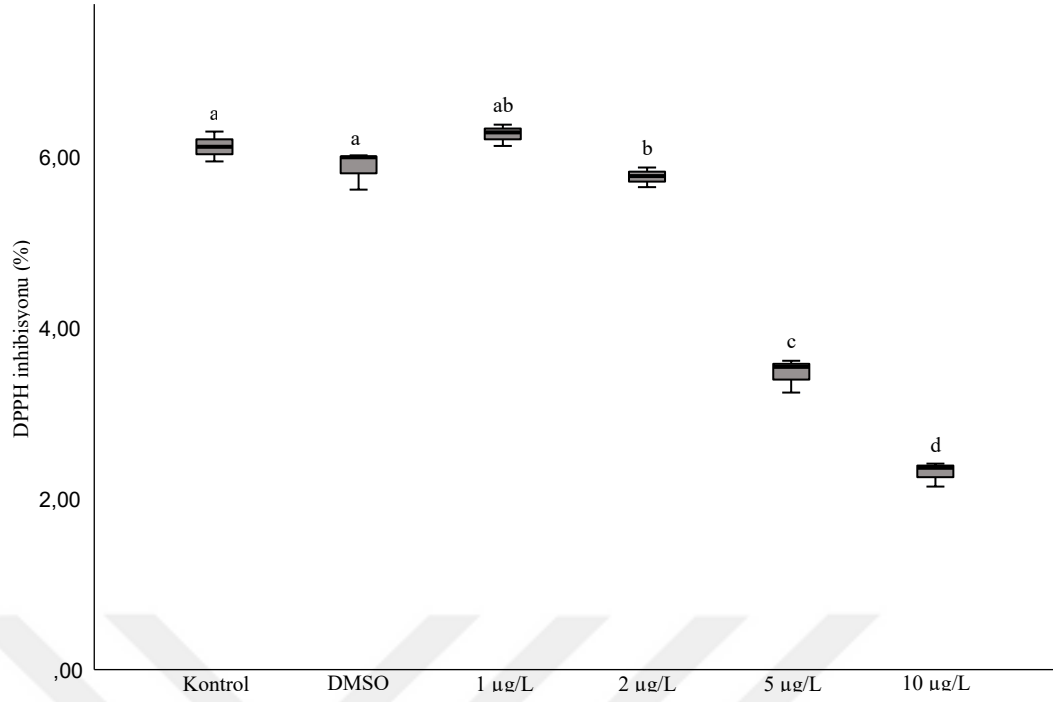
Şekil 4.14. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.



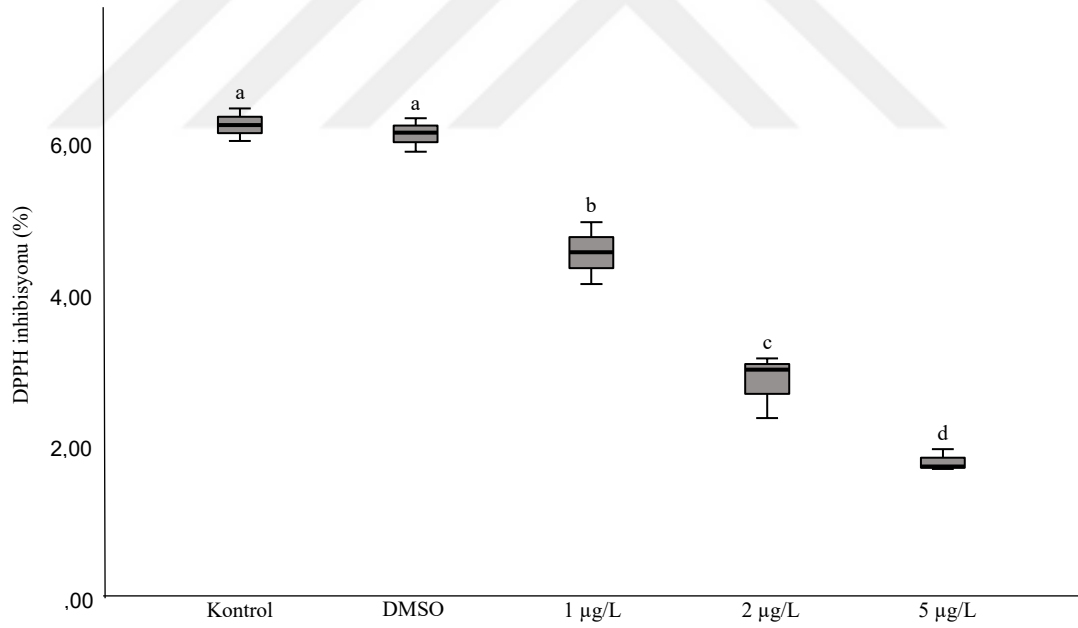
Şekil 4.15. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm SOD aktivitesine etkileri.

4.6. Fungisitlerin Spermatozoa DPPH inhibisyonuna Etkileri

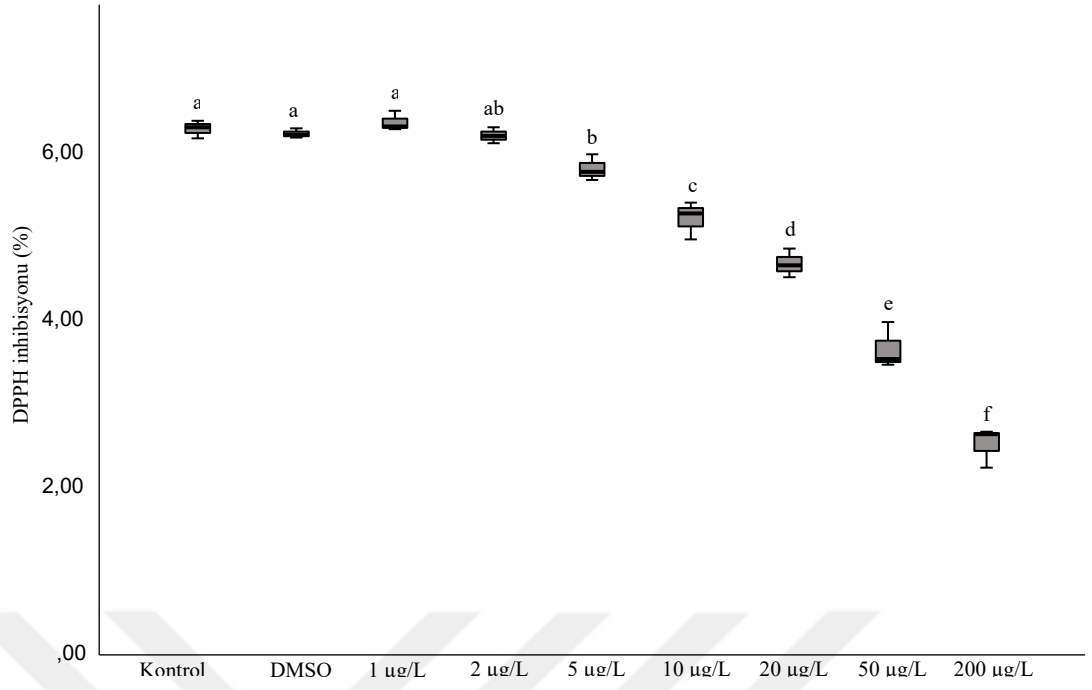
Farklı derişimlerde 2 saatlik CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin maruziyetleri sonucunda, spermatozoa DPPH inhibisyon seviyelerindeki değişimler Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de sunulmuştur. 10 µg/L CPL, 5 µg/L MCZ ve 200 µg/L AZS inkübasyon gruplarında DPPH inhibisyonları $2,30 \pm 0,14$, $1,78 \pm 0,14$ ve $2,52 \pm 0,24$ olarak sırasıyla ölçülmüştür. ≥ 5 µg/L CPL, DPPH inhibisyon yüzdelerinde istatistiksel olarak önemli derecede düşüöşlere sebep olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Değerlendirilen tüm derişimlerde MCZ fungusiti DPPH inhibisyonunu olumsuz yönde etkilemektedir ($P < 0,05$). ≥ 10 µg/L AZS, spermatozoa DPPH inhibisyon seviyesinin negatif yönde etkilemektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.16. CPL'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm DPPH inhibisyonuna etkileri.



Şekil 4.17. MCZ'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm DPPH inhibisyonuna etkileri.



Şekil 4.18. AZS'nin 2 saatlik maruziyet sonrasında sperm DPPH inhibisyonuna etkileri.

5. TARTIŞMA

Fungisitler de diğer pestisitler gibi özellikle tarım alanlarında uygun miktarın üzerinde kullanıldığında farklı şekilde sucul ekosisteme geçebilmekte ve bu ekosistemde bulunan mavi yeşil alg, alg, eklem bacaklı ve balık türleri gibi birçok hedef dışı organizmaya etki edebilmektedir. Sucul canlılar üzerindeki bu etkilerin değerlendirilme için gerek *in vivo* gerek ise *in vitro* deneyler içeren birçok araştırma yapılmaktadır (Vlaardingen ve Vonk, 2008). Bu çalışmaların kapsamı da LC₅₀ (%50 öldürücü konsantrasyon) değerleri saptanmasından hedef dışı sucul organizmadaki fizyolojik, histolojik, patolojik, biyokimyasal vb. birçok farklı parametrenin değerlendirilmesi gibi geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Dahası, bu etkiler sadece farklı türlerde gözlemlenmekle kalmamıştır, özellikle balıklarda embriyo, larva ve yetişkinlik gibi farklı büyüme evrelerindeki etkiler de ortaya konmuştur.

CPL kalıntıları, dünyanın farklı bölgelerindeki sucul ekosistemler farklı kısımlarında belirlenmiştir. Brezilya'da tarımsal sulama alanı yüzey suyunda CPL miktarı 0,78 µg/L olarak tespit edilirken, Yunanistan'da 5 farklı nehirde yapılan incelemelerde maksimum CPL seviyelerinin 24 ve 260 ng/L arasında değiştiği bulunmuştur (Konstantinou vd., 2006; Zhou vd., 2019). 96 saatlik LC₅₀ değerleri Zebra balığı (*Danio rerio*) yetişkinlerinde 0,65 mg/L embriyolarında ise 0,81mg/L olarak bulunmuştur. Ayrıca embriyolardaki 48 ve 72 saatlik 0,76 mg/L CPL maruziyetinin bu balığın larvalarında büyümeyi engellediği ve birçok deformasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2019). Yürüyen kedi balığında (*Clarias batrachus*) CPL'nin akut etkisi incelendiğinde LC₅₀ değerlerin 9 mg/L civarında olduğu, 0,53 ve 1,06 mg/L seviyesinde 45 günlük olumsuz kronik etkilerinin hemogloblin ve hematokrit gibi kan parametrelerinde, büyüme ve tiroid hormonları gibi endokrin parametrelerinde, kondisyon faktörü ve hepatosomatik indeks gibi büyüme parametrelerinde gözlenmiştir (Saha vd., 2022). Gökkuşuğu alabalığında, CPL için 96 saatlik LC₅₀ değeri 0,38±0,13 mg/L olarak bulunmuştur. Özellikle 4 gün sonunda 0,65 mg/L derişimindeki CPL'nin solungaç, karaciğeri böbrek ve dalak dokularında enflamasyon ve nekroza sebep olduğu saptanmıştır (Boran vd., 2012). Bununla beraber CPL için 96 saatlik LC₅₀ değerleri kurbağa ve semender gibi amfibi türleri için 0,25–2 mg/L olarak bulunmuştur. CPL'nin balık sperm hücreleri üzerine etkilerini değerlendirilen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

MCZ ve MCZ'nin yıkım ürünü olan etilen tiyoürenin varlığı farklı sucul ekosistemlerin saptanmıştır. MCZ, Venezüella'da tarımsal aktivitenin yoğun olduğu bir alanda içme suyunda 0,46 ila 1,28 µg/L aralığında saptanmıştır (Flores-García vd., 2011). Başka bir çalışmada, Meksika'da muz üretiminin yapıldığı bir tarımsal alan civarındaki sucul ortamların yüzey sularında 22,5 µg/L, yüzey altı sularında ise 4,3 µg/L seviyelerinde etilen tiyoüre saptanmıştır (Geissen vd., 2010). MCZ için LC₅₀ değerleri gökkuşağı alabalığında 1,9 ve 2,2 mg/L arasında, Mozambik tilapyasında (*Oreochromis mossambicus*) 11,68 mg/L, zebra balığı embriyolarında 2,17 mg/L olarak tayin edilmiştir (Bisson ve Hontela, 2002; Atamanalp ve Yanik, 2003; Saha vd., 2016; Vieira et al., 2020). 1,1 mg/L derişimindeki MCZ gökkuşağı alabalığı eritrositlerinde hafifi artış, hemaoglobin ve lökosit sayısında ise azalmaya sebep olmuştur (Atamanalp ve Yanik, 2003). 21 günlük maruziyet sonrasında 5,5 µg/L MCZ bir başka fungusit olan metalaksil ile zebra balığı hepatosit hücrelerinde lipid peroksidasyonu ve enzimatik aktivitelerinde değişimlere neden olmuştur (Banaee vd., 2023). Ayrıca, ortamda bulunan ≥0,5 µg/L MCZ zebra balığı embriyolarının gelişimini etkileyerek larva çıkış oranlarını önemli derecede azaltmaktadır (Vieira vd., 2020). 3 gün boyunca 0 MCZ maruziyeti sonucunda Yılan balığı (*Anguilla anguilla*) kan örneklerinde 0,29 µg/L derişimde eritrosit çekirdeklerinde anormallikler, 2,9 µg/L'de eritrosit çekirdeklerinde anormallik ve buna ilaveten DNA hasarında istatistiki açıdan önemli derece artışlar gözlemlenmiştir ($P > 0,05$) (Marques vd., 2016).

Dünyanın farklı ülkelerde ve farklı sucul ekosistemlerde çok çeşitli AZS miktarları tayin edilmiştir. Özellikle tarımsal alanlardaki akarsu sistemlerinde yapılan çalışmalara AZS' nin ölçülmesinde dünyanın farklı ülkelerinden bazı örnekler şu şekilde özetlenebilmektedir; İsveç'te 0,3 ile 1 µg/L, Danimarka'da 0,15 µg/L Almanya'da 29,7 µg/L, Arjantin'de 0,01 to 0,06 µg/L, ABD'de 0,16 ile 4,55 µg/L, Çin'de 34 µg/L (Han vd., 2016; Berenzen vd., 2005; Wang vd., 2009; Cao vd., 2019; Battaglin vd., 2011; Jørgensen vd., 2013 Corcoran vd., 2020).

Zebra balığı embriyosunda, larvasın ve yetişkininde AZS için LC₅₀ değerleri sırasıyla 0,61, 0,39 and 1,37 mg/L olarak belirlenmiştir (Mu vd., 2017). Zebra balığı döllenmiş yumurtalarının 96 saatlik ≥ 25 µg/L AZS maruziyeti enzim aktivitelerinde ve lipid peroksidasyon seviyelerinde artışa sebep olmuştur (Jia vd., 2018). 4 günlük 352 µg/L derişimindeki AZS maruziyeti Atlantik somonunda (*Salmo salar*) mitokondriyal

solunumu engelleyerek hücre büyüme mekanizmasını bozduğu ve oksidatif strese ve apoptoziye neden olduğu gen ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesiyle ortaya konmuştur (Olsvik vd., 2010). 48 saatlik 50 µg/L AZS maruziyeti bir çiklit türü olan *Australoheros facetus*'un yavru ve yetişkin bireylerinde kan parametrelerini negatif yönlü etkilediği, hücrelerde oksidatif strese ve DNA hasarına neden olduğu rapor edilmiştir (Crupkin vd., 2021). Bunların yanı sıra, AZS'nin bazı kronik etkileri de saptanmıştır. 28 günlük 10 µg/L AZS maruziyeti zebra balığı karaciğerinde genotoksisiteye ve oksidatif stres koşullarına yol açmıştır (Han vd., 2016).

Tez çalışmasında incelenen 3 fungusit için de balık sperm hücreleri etkileri üzerine gerçekleştirilmiş bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer hayvan türleri için bu incelendiğinde, MCZ'nin *in vitro* koşullarda boğa spermatozoa örneklerine etkileri gösterilmiştir. ≥ 1000 µg/L MCZ derişiminin 2 saatlik maruziyet sonrasında, ≥ 100 µg/L MCZ derişiminin 4 saatlik maruziyet sonrasında spermatozoa motilite parametrelerin de önemli derece azalmaya sebebiyet verdiği belirlenmiştir (Kodithuwakku vd., 2021).

Toksik olabileceği düşünülen veya toksik olduğu bilinen birçok maddenin, sucul ekosisteme ve bunun önemli parçası olan sucul canlılara olumsuz etkilerinin gösterilmesinde balık sperm hücrelerinin kullanılması etkin bir yöntemdir. Bunun için, farklı derişimlerdeki kirletici spermatozoa sulandırıcısının içine eklenerek belirli bir süre, genellikle 2 saat, inkübe edilerek sonrasında bu hücrelerdeki başta motilite parametreleri olmak üzere derişimlerin gözlenmektedir. Pamuk bitkisine özgün bir pigment madde olan ve aynı zamanda toksik etkisi olan gossipol ~ 5 mg/L derişiminde, 2 saat sonunda +4 °C'de sarı tatlı su levreği (*Perca flavescens*) spermatozoa motilite parametrelerini azaltmış, ~5 mg/L derişiminde istatistiki olarak anlamlı derecede azaltmış, ~104 mg/L derişiminde ise motiliteyi durdurmuştur. Ayrıca bu örneklerde, LDH (Laktat dehidrogenaz), aktivitesinde azalma, bu örnekler ile yapılan dölleme çalışmalarında dölleme oranında azalma, anormal embriyo sayısında artış gözlenmiştir ($P < 0,05$) (Ciereszko ve Dabrowski, 2000). Epoksik reçinesi ve polikarbonat plastiklerin sertleştirilmesinde kullanılan bisfenol A bileşiğinin bir mersin balığı türü olan çuka balığı (*Acipenser ruthenus*) sperm hücrelerine etkileri incelenmiştir. 2 saatlik maruziyet sonrası, $\geq 1,75$ µg/L bisfenol A motilite parametrelerini özellikle VCL değerleri azaltmakta ve hücrelerde DNA hasarına neden

olmaktadır (Hulak vd., 2013). Aynı balığın sperm hücreleri kullanılarak sularda doğal olarak kirletici olarak da bulanabilen ve bir ksenobiyotik madde olan durokinonun toksisitesi gösterilmiştir. ~ 4 ila ~ 25 mg/L aralığındaki durokinon derişimlerinin tümünde spermatozoa motilite parametrelerinde ve ATP içeriklerinde azalma olduğu bulunmuştur (Linhartova vd., 2013). Bir diğer çalışmada, antiepileptik bir ilaç olan ve sucul ekosistemde bir kirlilik özelliği oluşturabilen karbamazepin 0,2, 2 ve 20 mg/L derişimlerinde sazan balığı (*Cyprinus carpio*) sperm hücreleri ile 2 saatlik maruz bırakılmıştır. Ortamdaki karbamazepin varlığı her derişimde lipid peroksidasyonunu arttırmış, 2 ve 20 mg/L karbamazepin spermatozoa motilitesini ve SOD aktivitesini istatistiki açıdan önemli derece düşürmüştür (Li vd., 2010). Bunlarla birlikte, bazı elementlerinde *in vitro* koşullardaki spermatozoa üzerine etkileri incelenmiştir. Örneğin, ortamdaki 10 mg/L derişiminde çinkonun varlığı, 2 saat sonunda +4 °C’de motilite parametrelerine olumsuz etkilemiştir. 100 mg/L’de ise motilite parametrelerinde tamamıyla bir azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Chyb vd., 2000).

Farklı pestisitlerin *in vitro* maruziyetleri balık sperm hücrelerine olumsuz göstermektedirler. Bir fungusit olarak yaygınca kullanılan vinklozolinin çuka balığı spermatozoa örneklerine 2 saatlik maruziyeti sonucaunda 2 ila 50 µg/L derişiminde spermatozoa motilitesi ve VCL değerini azalttığı ≥ 10 µg/L derişiminde DNA hasarına neden olduğu, enzimatik aktiviteler ve lipid peroksidasyonunda değişikliklere neden olduğu raporlanmıştır (Gazo vd., 2013). İnsektisit grubunda yer alan sipermetrin ≥ 1.025 µg/L derişiminde ve lambda-sihalotrin ≥ 0.6 µg/L derişiminde gökkuşağı alabalığı sperm hücrelerinde motilite kaybına, lipid peroksidasyonuna ve enzimatik aktivitelerde değişime neden olmuştur (Kutluyer vd., 2015; 2016).

Tez çalışmasında, CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin gökkuşağı alabalığı sperm hücreleri üzerine toksik etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre, CPL ≥ 2 µg/L derişimlerde, MCZ ≥ 1 µg/L derişimlerde ve AZS ≥ 5 µg/L derişimlerde spermatozoa motilite parametrelerini istatistiki olarak azalttığı saptanmıştır. Benzer derişimlerde, TAK değerleri, SOD aktiviteleri ve DPPH inhibisyon seviyelerinde azalmalar, lipid peroksidasyonunda ise artmalar belirlenmiştir. Bu değerler göz önüne alındığında, fungusit miktarları açısından bir sıralama yapıldığında AZS > CPL > MCZ olduğu gözlemlenmektedir.

Değerlendirilen fungusitlerinin spermatozoa motilite değerlerini %50 seviyesine düşürdüğü değerler CPL için 10 µg/L, MCZ için 5 µg/L ve AZS için 200 µg/L olarak tayin edilmiştir. Bu derişimlerin bulunduğu spermatozoa örneklerinin yağ asidi profilleri incelendiğinde fungusit gruplarının heneikosanoik asit (C21:0) haricinde diğer yağ asitlerinde değişimler olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle toplam PUFA'yı oluşturan linoleik asit, linolenik asit, eikosatrienoik asit, eikosapentaenoik asit (EPA), heneikosapentaenoik asit, dokosahegzaenoik asit (DHA) miktarlarında önemli azalmalar belirlenmiştir. Yağ asidi miktarları açısından bir sıralama yapıldığında kontrol > MCZ > CPL > AZS olduğu gözlemlenmektedir. Motilitenin %50 seviyesinde olduğu bu derişimlerde, AZS uygulamasında saptanan lipid peroksidasyon değerleri MCZ ve CPL'deki değerlere göre daha yüksektir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, toksik maddeler olarak nitelendirilen fungusitler çeşitli yollarla sperm hücreleri üzerine olumsuz etkiler gösterebilmektedirler. Sperm membran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde bozulmalara sebep olabilirler, özellikle hücrede bulunan ve serbest radikallere karşı hassas olan PUFA'lara zarar vererek oksidatif stres koşulları oluşabilir ve bazı enzimlerin çalışmasına engel olarak mitokondriyal solunumu engelleyebilirler (Rao ve Gangadharan, 2008; Zhou vd., 2006; Liv vd., 2010; Hulak vd., 2013). Birbiri ile bağlantılı olan bu temel etkiye yollarının biri veya birkaçı hatta hepsi birlikte hücreye zarar verebilmektedir. Sperm membran bütünlüğü, sperm hücresinin motilite kazanımında son derece önemlidir (Morisawa, 1985). Hareketsiz olarak sucul orama bırakılan spermatozoa, seçici geçirgen zar kabiliyeti ile dış ortam ile Ca^{2+} , Na^{+} ve K^{+} iyonların alışverişinde bulunarak zar polarizasyonunu değiştirmektedir (Krasznai vd., 2003). Böylelikle hücre içerisinde motilitenin başlaması için sinyal molekülü olan cAMP (siklik adenosin monofosfat) sentezi (yani miktarı) hücre içinde artar (Cosson vd., 1993). cAMP, spermatozoa içindeki mitokondrilerde oluşan ATP'den (adenosin trifosfat) sentezlenir ve kamçı hareketi için gerekli enerji bu mekanizmadan sağlanır (Dzyuba vd., 2017). Fungisitlerin önemli etkilerinden biri mitokondriyal solunumu durdurmasıdır (Rodrigues vd., 2013). Tez çalışmada, fungusitlerin lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif dengeyi bozduğu gösterilmiştir. Buna karşın, değerlendirilen diğer iki fungusit olan CPL ve MCZ'ye kıyasla en çok lipid peroksidasyonunun olduğu ve en düşük PUFA değerlerinin ölçüldüğü AZS daha yüksek miktarlarda (200 µg/L) motiliteyi %50 seviyesine indirmiştir. Bu durum, bu fungusitlerin toksik etkilerinin,

lipid peroksidasyon seviyesi ve yağ asitlerinin olumsuz etkilenmelerinden ziyade, bunların mitokondriyal solunum ve ilgili enzimleri daha öncelikli olarak etkilediğini düşündürmektedir.



6. SONUÇ

Birçok kirletici gibi pestisitler de sucul ekosistemler gibi kullanım alanları dışına ulaşarak, buradaki hedef dışı organizmalara olumsuz etkiler oluşturmaktadırlar. Son yıllarda artan tarımsal üretim ve gereğinden fazla kullanım gibi sebepler ile özellikle fungusitlerin yıllara göre miktar olarak kullanımı yükselmiştir. Doğal olarak bunların sucul ekosisteme karışma oranının da artışı beklenmektedir. Özellikle ülkemizde, fungusitlerin farklı sucul ekosistemler ve sucul canlılarda tayin edilmesi üzerine çalışmalara ihtiyaç vardır. Fungusitlerin ve yıkım ürünlerinin, sucul ekosistemde bulunmalarına bağlı olarak, bunların canlılar üzerine etkilerini değerlendirmek önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında 3 farklı fungusitin, balık sperm hücreleri kullanılarak farklı toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Her ne kadar sucul toksisite gösteriminde balıklar ve doku kültürlerinin kullanımları yaygın olmasına karşın, sperm hücrelerinin geçerli bir alternatif olduğu görülmektedir. Ayrıca bu tez çalışmasında fungusitler arasında toksik etki farklılıklarını göstermesinde de balık sperm hücrelerinin kullanılabilirliği belirlenmiştir. Dahası sperm hücrelerinin kullanılmasında bazı avantajlarda beraberinde gelmektedir. Örneğin balıkların toksisite deneylerinde kullanılmasında daha uzun süreli deney süresi gereklidir (3 ila 21 gün gibi), daha maliyetlidir, daha çok iş gücü gerektirir ve deney sonucunda balıkların ölümleri ile sonuçlanmaktadır. Doku kültürü çalışmalarında da daha fazla maliyet ve iş gücünün yanında, laboratuvarında steril koşulların oluşturulması gibi zorluklar bulunmaktadır.

Sonuç olarak alabalığı sperm hücreleri kullanılarak CPL, MCZ ve AZS fungusitlerinin etkileri gözlemlenmiştir. Bu fungusitlerin, derişimlerine bağlı olarak spermatozoa örneklerinin motilite parametrelerine, oksidatif stres koşullarına ve yağ asidi kompozisyonlara etki ettikleri gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

- Alavi, S.M.H., & Cosson, J. (2005). Sperm Motility in Fishes. I. Effects of Temperature and pH: a Review. *Cell Biology International*, 29, 101-110.
- Asakawa, T., & Matsushita, S. (1980). Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides, *Lipids*, 15, 137-140,
- Atamanalp, M., & Yanik, T. (2003). Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27, 1213-1217.
- Banaee, M., Sagvand, S., Sureda, A., Amini, M., Haghi, B.N., Sopjani, M., & Faggio, C. (2023). Evaluation of single and combined effects of mancozeb and metalaxyl on the transcriptional and biochemical response of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 268, 109597.
- Battaglin, W.A., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., Kolpin, D.W., & Meyer, M.T. (2011). Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005-2006. *Water, Air, & Soil Pollut.*, 218, 307-322.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, & R., Liess, M. (2005). A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in juvenile lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*, 58, 683-691.
- Birişik N. (2018). *Teoriden Pratiğe Kimyasal Mücadele ve Gelecek Stratejisi*, Birişik N, editör. Teoriden Pratiğe Kimyasal Mücadele, Matsa Basımevi, Ankara.
- Bisson, M., & Hontela, A. (2002). Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 180, 110-177.
- Bligh, E. G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Boran, H., Capkin, E., Altinok, I., & Terzi, E. (2012). Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. *Exp Toxicol Pathol.*, 64(3), 175-179.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R.K., Dietrich, G.J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80, 758-765.
- Cao, F., Li, H., Zhao, F., Wu, P., Qian, L., Huang, L., Pang, S., Martyniuk, C.J., & Qiu, L. (2019). Parental exposure to azoxystrobin causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.*, 646, 595-605.

- Carvalho, F.P., Villeneuve, J.P., Cattini, C., Rendon, J. & Mota de Oliveira, J. (2009). Pesticide and PCB residues in the aquatic ecosystems of Laguna de Terminos, a protected area of the coast of Campeche, Mexico. *Chemosphere* 74(7), 988–995.
- Chyb J., Kime D. E., Mikołajczyk T., Szczerbik P., & Epler P. (2000). The influence of zinc on sperm motility of common carp-a computer assisted studies, *Archives of Polish Fisheries*, 8, 5-14.
- Ciereszko, A., & Dabrowski, K. (2000). In vitro effect of gossypol acetate on yellow perch (*Perca flavescens*) spermatozoa. *Aquat. Toxicol.*, 49(3), 181-187.
- Corcoran, S., Metcalfe, C.D., Sultana, T., Ame, M.V., & Menone, M.L. (2020). Pesticides in surface waters in Argentina monitored using polar organic chemical integrative samplers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 104, 21–26.
- Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa, *Aquacult. Int.*, 12, 69-85.
- Cosson, M.P., Cosson, J., André, F., & Billard R. (1995). cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility: their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa. *Cell Motil. Cytoskeleton.*, 31(2),159-176.
- Crupkin, A.C., Fulvi, A.B., Iturburu, F.G., Medici, S., Mendieta, J., Panzeri, A.M., & Menone, M.L. (2021). Evaluation of hematological parameters, oxidative stress and DNA damage in the cichlid *Australoheros facetus* exposed to the fungicide azoxystrobin. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 207, 111286.
- Dzyuba, B., Bondarenko, O., Fedorov, P., Gazo, I., Prokopchuk, G., & Cosson J. (2017). Energetics of fish spermatozoa: The proven and the possible. *Aquaculture*, 472, 60–72.
- Flores-García, M.E., Molina-Morales, Y., Balza-Quintero, A., Benítez-Díaz, P.R., & Miranda-Contreras, L. (2011). Pesticide residues in drinking water of an agricultural community in the state of Mérida, Venezuela, *Investig. Clin.*, 52, 295–311.
- Gazo, I., Linhartova, P., Shaliutina, A., & Hulak, M. (2013). Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chem Biol Interact.*, 203(2), 377-385.
- Geissen, V., Ramos, F.Q., Bastidas-Bastidas de, J., Díaz-González, G., Bello-Mendoza, R., Huerta-Lwanga, E., & Ruiz-Suárez, L.E. (2010). Soil and water pollution in a banana production region in tropical Mexico, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 85, 407–413.
- Gopalakrishnan, S., Upadhyaya, H.D., Vadlamudi, S., Humayun, P., Vidya, M.S., Alekhya, G., Singh, A., Vijayabharathi, R., Bhimineni, R.K., & Seema, M. (2012). Plant growthpromoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. *Springerplus*, 1(1), 71.

- Han, Y., Liu, T., Wang, Jinhua, Wang, Jun, Zhang, C., & Zhu, L. (2016). Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 133, 13–19.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Linhartova, Z., Rodina, M., Policar, T., & Linhart, O. (2010). In vitro effects of bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis* L. (Percidae; Teleostei). *J. Appl. Ichthyol.*, 26, 696–701.
- Hulak, M., Gazo, I., Shaliutina, A. & Linhartova, P. (2013). In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 158, 64–71.
- İnanan, B.E., & Kanyılmaz, M. (2020). Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress, viability and motility in the common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after short-term storage and cryopreservation. *Cryobiology*, 94, 73–79.
- İnanan, B.E., & Yılmaz, F. (2018). 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. *Animal Reproduction Science*, 196, 160–167
- Jia, W., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., & Jiang, H. (2018). Effects of two strobilurins (azoxystrobin and picoxystrobin) on embryonic development and enzyme activities in juveniles and adult fish livers of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 207, 573–580.
- Jørgensen, L.F., Kjær, J., Olsen, P. & Rosenbom, A.E., (2013). Leaching of azoxystrobin and its degradation product R234686 from Danish agricultural field sites. *Chemosphere*, 90, 885.
- Kobayashia, T., Fushiki, S., & Ueno, K. (2004). Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. *Environ. Biol. Fish*, 69, 419–425.
- Kodithuwakku, C., Prasadani, Y.G.M., Wijayagunawardhane, M.P.B., Rathnayake, C., Lee, K.F., & Kodithuwakku S.P. (2021). Functional impairment of bovine spermatozoa by fungicide Mancozeb: An in vitro exposure study. *Tropical Agricultural Research*, 32(3), 368–379.
- Konstantinou, I.K., Hela, D.G., & Albanis, T.A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ. Pollut.*, 141(3), 555.
- Krasznai, Z., Marian, T., Balkay, L., Gasper, R.J., & Tron, L. (1995). Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, sperm. *Aquaculture*, 129, 123–128.
- Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., Krasznai, Z.T., Tron, L. & Marian, T. (2003). Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquat. Living. Resour.*, 16, 445–449.

- Kutluyer, F., Erişir, M., Benzer, F., Öğretmen, F., & İnanan, B.E. (2016). The in vitro effect of Cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 128, 63–67.
- Kutluyer, F., Erişir, M., Benzer, F., Öğretmen, F., İnanan, B.E. (2015). The in vitro effect of Lambda-cyhalothrin on quality and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40 (3), 855–860.
- Lahnsteiner, F. (2000). Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aqua. Res.*, 31, 245-258.
- Li, Z.H., Li, P., Rodina, M., & Randak, T. (2010). Effect of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Chemosphere*, 80, 530-534.
- Linhartova, P., Gazo, I., Shaliutina, A., & Hulak, M. (2013). The in vitro effect of duroquinone on functional competence, genomic integrity, and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Toxicol. In Vitro.*, 27(6), 1612-1619.
- Marçal, R., Pacheco, M., Guilherme, S. (2020). DNA of crayfish spermatozoa as a target of waterborne pesticides – An ex vivo approach as a tool to short-term spermotoxicity screening. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123300.
- Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47, 469-474.
- Marques. A., Rego, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., & Pacheco, M. (2016). Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 133, 52-58.
- Morisawa, M. (1985). Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts, *Zool. Sci.*, 2, 605-615.
- Morisawa, M., & Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts, *Science*, 210, 1145-1147.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Ferrier, V., & Devaux, A. (2006). Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environ. Toxicol. Int. J.*, 21(3), 264–277.
- Mu, X., Huang, Y., Luo, J., Shen, G., Li, X., Lei, Y., Li, Y., Li, X., & Wang, C. (2017). Evaluation of acute and developmental toxicity of azoxystrobin on zebrafish via multiple life stage assays. *Acta Sci. Circumst.*, 37, 1122–1132.

- Olsvik, P.A., Kroglund, F., Finstad, B., & Kristensen, T. (2010). Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73(8), 1852-1861.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar., M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Rao, M.V., & Gangadharan, B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 22, 935–942.
- Rodrigues, E.T., Lopes, I., & Pardal, M.A. (2013). Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. *Environ. Int.*, 53, 18–28.
- Saha, N.C., Giri, S.K., Chatterjee, N., Biswas, S.J., & Bej, S. (2016). Acute toxic effects of Mancozeb to fish *Oreochromis mossambicus* (W. K. H. Peters, 1852) and their behaviour. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 3(6), 40-44.
- Saha, S., Chukwuka, A.V., Mukherjee, D., Dhara, K., Pal, P., & Saha, N.C. (2022). Physiological (haematological, growth and endocrine) and biochemical biomarker responses in air-breathing catfish, *Clarias batrachus* under long-term Captan® pesticide exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 90, 103815.
- Shaliutina-Kolešová, A., Gazo, I., Cosson, J., & Linhart, O. (2014). Protection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma. *Fish. Physiol. Biochem.*, 40, 1771-1781.
- Vieira, R., Venancio, C.A., & Felix, L.M. (2020). Toxic effects of a mancozeb-containing commercial formulation at environmental relevant concentrations on zebrafish embryonic development. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(17), 21174–21187.
- Vlaardingen, P.L.A., & Vonk, J.W. (2008). Environmental risk limits for captan. *RIVM Letter report*, 601716004
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 71–78.
- Wang, Q., Zhong, W., & Huang, S., (2009). Determination of azoxystrobin residues in surface water by HPLC with solid-phase extraction. *Anhui Med. Pharm.*, 13, 611–612.
- Wang, Z., Kottawatta, K.S., Kodithuwakku, S.P., Fernando, T.S., Lee, Y.L., Ng, E.H., & Lee, K.F. (2021). The fungicide mancozeb reduces spheroid attachment onto endometrial epithelial cells through downregulation of estrogen receptor β and integrin $\beta 3$ in Ishikawa cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 208, 111606.

- Wilson-Leedy, J.G., & Ingermann, R.L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67, 661-672.
- Zhang, W. (2018). Global pesticide use: profile, trend, cost/benefit and more. *Proc. Int. Acad Ecol. Environ. Sci.*, 8(1), 1–27.
- Zhou, B.S., Liu, W.H., Siu, W.H.L., O'Toole, D., Lam, P.K.S., & Wu, R.S.S. (2006). Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, 77, 136–142.
- Zhou, Y., Chen, X., Teng, M., Zhang, J., & Wang, C. (2019). Toxicity effects of captan on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 69, 80-85.

