

Noktalı İnci Balığının (*Alburnoides bipunctatus*) Spermin Motilite Ve Yaşam Süresi**Üzerinde Kobaltın Etkileri**Filiz KUTLUYER¹, Mehmet KOCABAŞ², Ahmet ŞAHİN³, Rafet Çağrı ÖZTÜRK³¹Munzur Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 62000, Tunceli, Türkiye²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Yaban Hayatı Ekolojisi ve Yönetimi Bölümü, 61080, Trabzon, Türkiye.³Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü, Trabzon, Türkiye.***Corresponding Author**

E-mail:

Özet

Bu çalışmada, noktalı inci balığının (*Alburnoides bipunctatus*) spermi üzerinde Kobaltın etkilerinin belirlenmesi için deneyler kurulmuştur. Sperm, Kobaltın farklı konsantrasyonlarına (1 mg/L; 10 mg/L; 100 mg/L; 1000 mg/L) maruz bırakılmıştır. Sperm motilitesi ve yaşama süresi belirlenmiştir. Sonuçlar, 1000 mg/L konsantrasyonda sperm hücrelerinde hareketlilik göstermezken, 1 mg/L konsantrasyonda motilite yüzdesi (85,00±0,01) ve süresinde (48,33±2,21) artışın olduğunu göstermiştir (p<0.05). Sonuç olarak, Kobalt su ürünleri yetiştiriciliği uygulamalarında ve üreme yönetiminde sperm hareketliliğinin artırılmasında alternatif olarak kullanılabilir. Ayrıca, Kobaltın yüksek dozları sperm hücreleri için toksik olabilir.

Anahtar kelimeler: Kobalt, sperm motilitesi, noktalı inci balığı, *Alburnoides bipunctatus*.**THE EFFECTS OF COBALT ON MOTILITY AND LONGEVITY OF SPIRLIN (*Alburnoides bipunctatus*) SPERMATOZOA****Abstract**

In this study, experiments were designed to determine the effect of Cobalt addition on sperm motility of spirlin (*Alburnoides bipunctatus*). Spermatozoa were treated with different concentrations (1 mg/L; 10 mg/L; 100 mg/L; 1000 mg/L) of Cobalt. The motility and longevity of spermatozoa were determined. The results showed that the percentage (85.00±0.01) and duration (48.33±2.21) of motile sperm cells increased at concentration of 1 mg/L (p<0.05) while no motile spermatozoa were recorded at 1000 mg/L. In conclusion, Cobalt can be used as an alternative sperm motility-enhancement in aquaculture applications and reproduction management. It can be explained with a toxic effect due to high dose of Cobalt ions.

Keywords: Cobalt, sperm motility, spirlin, *Alburnoides bipunctatus*.**GİRİŞ**

Noktalı inci balığı (Teleostei: Cyprinidae) bentopelajik balık türüdür ve Türkiye’de (Doğu Anadolu, Karadeniz, Batı ve Kuzey-Batı Anadolu bölgeleri) dağılım göstermektedir [1]. Türün doğal populasyonları özellikle bırıklı balıkların olduğu bölgelerde bulunurlar. Bu türler, su yataklarına kimyasal madde girişlerinden etkilenirler. Noktalı inci balığı bentikten beslenen türlerden olduğu için indikatör türlerdendir. Özellikle, endüstriyel, zirai ve şehir atık sularına karşı düşük toleransa sahip olması, bu türü iyi bir indikatör tür olmasına neden olmaktadır.

Kobalt, birçok enzimin ayrılmaz bir bileşenidir ve bu nedenle, temel bir eser minerali olarak kabul edilir. Birçok enzim sistemi için aktifleştirici bir maddedir. Kobalt, her bir molekülde bir kobalt atomu bulunan B12 vitamini (siyanobalamin) bileşenidir [2, 3]. Bazı metabolik işlemler için düşük dozda kobalt gerekir. Bununla birlikte, yüksek dozların toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir [3].

Kobalt kaynakları doğal (kayaların ve toprağın ayrışması, volkanlar, deniz suyu spreyi, bitkilerden ekstraksiyon, orman yangınları, erozyon ve karasal ve deniz biyogenik emisyonları) ve antropojenik (atmosferik birikim, madencilik ve kobalt işleme, kobalt içeren atıkların bertaraf edilmesi, kobalt içeren çamur veya fosfatlı gübrelerin toprakta kullanılması) olabilir [4, 5]. Kirlenmemiş alanlarda, ortalama kobalt seviyeleri tipik olarak <1-2 ng/m³ tür [4, 6]. Yüzey suyu ve yeraltı suyu için sabit kobalt konsantrasyonları, bozulmamış bölgelerde 1 µg/l’den az,

nüfuslu alanlarda ise 1-10 µg/l’dir. Madencilik ve tarım alanlarında kobalt konsantrasyonları, yüzey sularında ve yeraltı sularında litre başına birkaç yüz miligram kadar olan değerlerle çok daha yüksek olabilir [7]. Kirlenmemiş tatlı su sedimenti genellikle <20 mg/kg içerir. Kirli göl ve nehir sedimentindeki kobalt konsantrasyonları 0,16 ile 133 mg/kg arasında değişmiştir [4].

Kobaltın çevresel konsantrasyonları çoğu zaman birçok tatlı su teleostu için ölümcül seviyenin altındadır. Salmonidlerde, toksik dozların chinook somonu (*Oncorhynchus tshawytscha*) için 0,02 mg/l ve gökkuşağı alabalığı için 0,2 mg/l (*Oncorhynchus mykiss*) olarak rapor edilmiştir [8]. 96 saatlik LC50 değeri, gökkuşağı alabalığı için genel olarak 0,4-1,4 mg/l aralığında olduğu bildirilmiştir [9]. Şimdiye kadar, sadece Çoruh alabalığının sperminde Kobaltın *in vivo* etkisi Kocabas ve Kutluyer [10] tarafından çalışılmıştır. Ancak, yazarların bilgisine göre, literatürde noktalı inci balığının (*Alburnoides bipunctatus*) sperminin kobalta *in vitro* maruz bırakılması ile ilgili herhangi bir bilgi mevcut değildir. Çoğu balık türünde, sperm hücreleri seminal sıvıda hareketsizdir. Spermin suya bırakılması, hareketliliğini ve metabolik aktivasyonunu tetikler [11]. Döllenmenin su ortamında olan türlerde, hareketli gametler, suyla bırakıldıklarında kirlenici maddelerle doğrudan temas edebilir [12] ve döllenme başarısı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilirler. Sperm motilitesi, balıklarda başarılı döllenme için temel fonksiyonel parametredir [12, 13, 14]. Bu nedenle, motilite ve sperm özelliklerinin belirlenmesi

önemlidir. Bu bağlamda, bu çalışma, noktalı inci balığının (*A. bipunctatus*) spermindeki motilite yüzdesi ve süresi üzerindeki sudaki kobalt iyonlarının etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

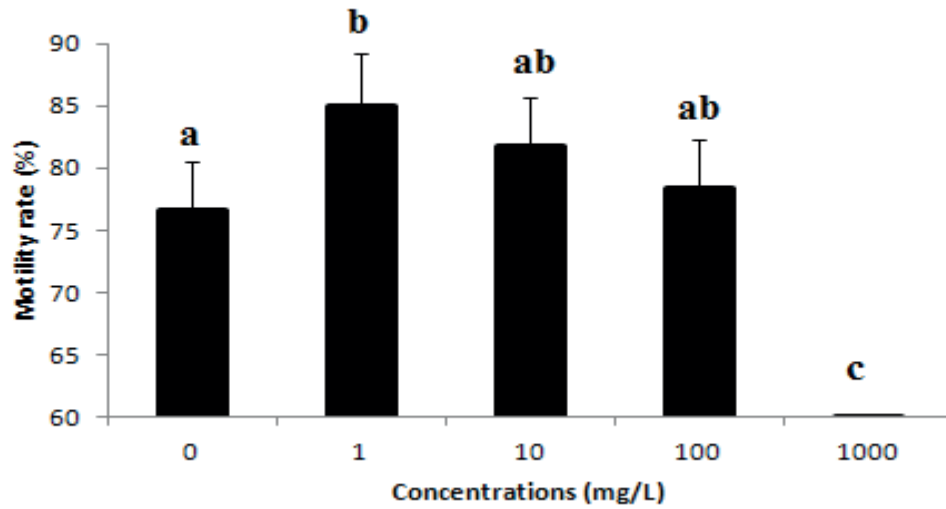
Çalışmada kullanılan olgun erkek noktalı inci balıkları Mart ile Mayıs ayları arasında elektroşoker (SAMUS-725G) ile Solaklı Çayı'ndan (Trabzon) yakalanmıştır. Balıklar anestezi (Benzoacaine, 50 mg/L) edildikten sonra sağım yapılmıştır. Sperm örnekleri 1,5 ml'lik tüplere sağılmıştır. Kontaminasyon ve sperm aktivasyonunu önlemek için sperm örneklerine üre, feses, kan, mucus ve su karışmamasına dikkat edilmiştir. Aktivasyon solusyonuna (NaCl, 52 mM), Cobalt chloride (CoCl_2) farklı konsantrasyonlarda [0 (control), 1, 10, 100 and 1,000 mg/L] ilave edilmiştir. Elde edilen taze ve Kobaltın farklı dozlarına *in vitro* maruz mirakılan sperm örneklerinin sperm motilite yüzdesi mikroskopla (100X, Nikon CI, Tokyo, Japan) Sperm Class Analyser (SCA) programı kullanılarak belirlenmiştir. Sperm motilite süresi ise kronometre ile belirlenmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (S.D.) olarak sunulmuştur. Verilerin istatistiki analizinde SPSS 14.0 for Windows (IBM

SPSS, Armonk, NY, USA) kullanılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ile Duncan testi kullanılmıştır. Önemlilik derecesi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

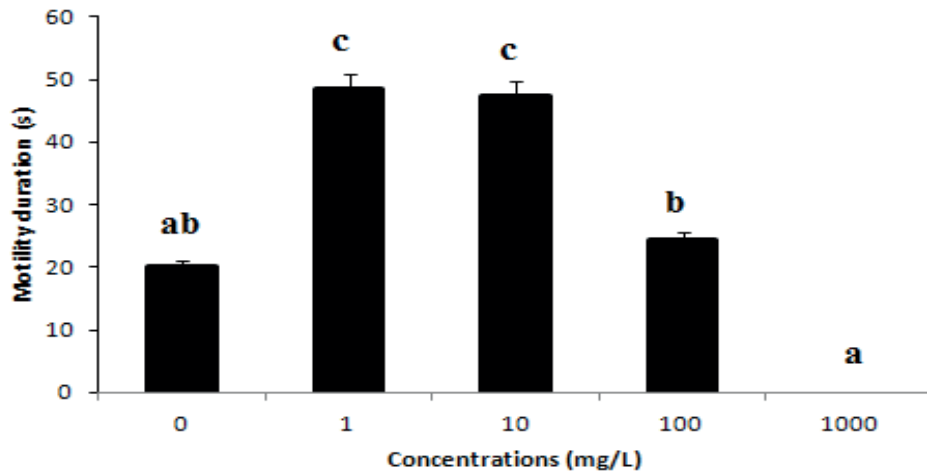
TARTIŞMA VE SONUÇ

Kobaltın 0, 1, 10, 100 and 1.000 mg/L konsantrasyonlarında sperm motilite yüzdeleri ve süreleri sırasıyla $76,67 \pm 5,77$ ve $20,00 \pm 2,00$ s; $85,00 \pm 0,01$ ve $48,33 \pm 2,21$ s; $81,67 \pm 2,89$ ve $47,33 \pm 1,82$ s; $78,33 \pm 2,98$ ve $24,33 \pm 0,58$ s; $0,00 \pm 0,00$ ve $0,00 \pm 0,00$ s, olarak belirlenmiştir (Şekil 1 ve 2). En iyi sonuçlar 1 mg/L konsantrasyondan elde edilmiştir. Kobaltın 1–100 mg/L konsantrasyonları kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında sperm motilite yüzdesi ve süresinde artış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). 1.000 mg/L konsantrasyonun ise negatif etkiye neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Kocabaş ve Kutluyar (2017) Çoruh alabalığı spermini Kobalta *in vitro* maruz bıraktıklarında en iyi sonuçları 100 mg/L konsantrasyondan elde etmişlerdir.

Bu farklılıkların sebebi tür farklılığı ile açıklanabilir.



Şekil 1. Kobalt ilavesinin noktalı inci balığı (*Alburnoides bipunctatus*) sperminin motilite yüzdesi üzerindeki etkisi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 2. Kobalt ilavesinin noktalı inci balığı (*Alburnoides bipunctatus*) sperminin motilite süresi üzerindeki etkisi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$).

Bu çalışma, noktalı inci balığı spermi üzerindeki *in vitro* etkileri ile ilgili ilk rapordur. Kobaltın düşük kobalt maruziyetlerinde artan sperm tepkilerine dayanarak potansiyel olarak faydalı kullanılabilir. Kobaltın düşük seviyelerde pozitif etkisi B12 vitamininin oksidatif stresi azaltması olabilir.

Bu çalışmada, Kobaltın incelenen tür için yararlı ve toksik dozu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar noktalı inci balığı sperminde en yüksek sperm motilite yüzdesi ve süresinin sırasıyla 1 mg/L konsantrasyonda %85,00±0,01 ve 48,33±2,21 s olarak elde edildiğini göstermiştir. Bu, Kobaltın siyanokobalamin (vit B12) enziminin bir parçası olması ve bir dizi metabolik süreçte dahil olması ile piridoksin, polisakaritler, dehidroascorbik asit, riboflavin ve piridin nükleotitleri dahil olmak üzere kritik biyolojik maddelerle etkileşime girmesi nedeniyle olabilir [15, 16, 17].

Spermin yüksek Kobalt seviyesine (1.000 mg / L) maruz kalmasının ciddi olumsuz etkileri olabilir. Motilitede azalma Kobaltın toksik etkisine bağlı olabilir [3]. Yüksek doz Kobalt iyonları sperm kalitesi üzerinde toksik bir etkiye sahiptir ve sperm sayısı ile sperm üretiminde azalmaya, sperm hücrelerinde ciddi anormallikler ve dejenerasyona neden olabilir. Ayrıca, hücre yapısının bozulmasından bağımsız olarak motilitede azalma, Kobaltın sperm hareketliliği için gerekli olan mitokondriyal bozulmaya yol açabileceği gerçeğiyle açıklanabilir. Bunların dışında, aktivasyon çözümündeki bileşenler, Kobaltın biyoyararlanımını etkileyebilir.

Sonuç olarak, 1-100 mg/L kobalt maruziyetinin, noktalı inci balığının sperm motilite süresini artırdığı belirlenmiştir. 1.000 mg/L'lik yüksek konsantrasyon motilite yüzdesi ve süresi üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Kobaltın etkileri ve etki mekanizması bilgisi hem araştırma hem de ticari kullanım için faydalı olabilir. Kesin mekanizmaları anlamak için yeni çalışmalar gereklidir.

KAYNAKLAR

- [1] Geldiay, R. and Balık, S. 2007. Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları no: 46 Ders Kitabı Dizini no: 16 Bornova İzmir, 644 s
- [2] Lahaye, D., Demedts, M., Vanden Oever, R. and Roosels, D. 1984. Lung diseases among diamond polishers due to cobalt. *Lancet*, 1, 156-157.
- [3] Mohammed, S.A., Bakery, H.H., Abuo Salem, M.E., Nabila, A.M. and Elham, A.E. 2014. Toxicological effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives on fertility in male albino rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 27(1), 135-145.
- [4] Smith, I.C. and Carson, B.L. 1981. Trace metals in the environment. Ann Arbor, MI, Ann Arbor Science Publishers.
- [5] Barceloux, D.G. 1999. Cobalt. *Clinical Toxicology*, 37(2), 201-216.
- [6] Hamilton, EI. 1994. The geobiochemistry of cobalt. *Science of the total environment*, 150, 7-39.
- [7] World Health Organization (WHO) 2006. Cobalt and inorganic cobalt compounds. ISBN 92 4 153069 3, prepared by Kim JH, Gibb HJ, Howe PD.
- [8] Hansen, J.A., Marr, J.C.A., Lipton, J., Cacela, D. and Bergman, H.L. 1999. Differences in neurobehavioral responses of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper and cobalt: Behavioral avoidance. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(9), 1972-1978.
- [9] Marr, J.C.A., Hansen, J.A., Meyer, J.S., Cacela, D., Podrabsky, T., Lipton, J. and Bergman, H.L. 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicology*, 43(4), 225-238.
- [10] Kocabas, M. and Kutluyur, F. 2017. Effect of Cobalt

on sperm motility in an Endangered trout species, *Salmo coruhensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(6), 690-694.

[11] Öğretmen, F., Inanan, B.E. and Kutluyur, F. 2016. Combined effects of physicochemical variables (pH and salinity) on sperm motility: characterization of sperm motility in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49, 217-222.

[12] Kutluyur, F., Erisir, M., Benzer, F., Öğretmen, F. and Inanan, 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, 855-860.

[13] Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D. and Linhart, O. 2010. Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 720-725.

[14] Islam SM, Akhter T (2011) Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. *Adv Life Sci* 1:11-19. doi: 10.5923/j.als.20110101.03.

[15] Naghii, M.R. and Samman, S. 1993. The role of boron in nutrition and metabolism. *Progress in Food and Nutrition Science*, 17, 331-349

[16] Hunt, C.D. 1994. The biochemical effects of physiological amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environmental Health Perspectives*, 102, 35- 43.

[17] Devirian, T.A. and Volpe, S.L. 2003. The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219.