



## Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss* – Walbaum 1792) Bazı Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması\*\*

### Determination of Some Antibiotic Residues in Rainbow Trouts (*Oncorhynchus Mykiss* – Walbaum 1792)

Evren ÖZDEMİR KOCABAŞ<sup>1\*</sup>  Tarık Haluk ÇELİK<sup>2</sup>   
<sup>1,2</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD, Ankara  
<sup>1</sup>ORCID: 0000-0003-4887-8886 <sup>2</sup>ORCID: 0000-0003-4856-334X

\*Sorumlu Yazar: ekocabas@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 11.01.2022 Kabul Tarihi: 21.03.2022

\*\*Bilgilendirme: Bu çalışma birinci yazarın Doktora tezinden özetlenmiştir.

#### ÖZET

Ankara bölgesinde üretim yapan üç ve İzmir bölgesinde üretim yapan üç farklı alabalık çiftliğinden 20'şer adet olmak üzere toplam 120 adet Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üç farklı dönemde alınarak, oksitetrasiklin kalıntıları Charm II Test ve enrofloksasin kalıntıları Ridascreen Elisa Test ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda oksitetrasiklin kalıntısına rastlanmamıştır.

Enrofloksasin kalıntı analizleri sonucunda; 120 numuneden, sadece aynı dönemde aynı çiftlikten alınan 2 numunede test sonucu pozitif bulunmuştur. Enrofloksasin kalıntısı tespit edilen bu 2 numune kalıntı varlığını doğrulamak ve miktar tayini için HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile tekrar analiz edilmiştir. HPLC sonucunda örneklerde saptanan enrofloksasin miktarının maksimum kalıntı limitlerini aştığı tespit edilmiştir. Bulunan sonuçların "Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği"nde bildirilen değerlere uygun olduğu görülmüştür. Ulusal kalıntı izleme programlarının daha da etkinleşmesi ve antimikrobiyellerin satış ve kullanımının uzmanlar tarafından denetiminin sürdürülebilirliğinin sağlanması sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Gökkuşığı Alabalığı, Oksitetrasiklin, Enrofloksasin, Charm II Test, Ridascreen Elisa Test, HPLC

#### ABSTRACT

In this study, a total of 120 pieces of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* – Walbaum 1792), that 20 samples apiece taken in three different periods from the 3 different trout farms, production in Ankara region and 3 different farms in İzmir region, were analyzed for oxytetracyclin residues by Charm II Test and enrofloxacin residues by Ridascreen ELISA Test as qualitative. As a result of analysis, oxytetracyclin residue was not determined.

In consequence of enrofloxacin residue analysis, the test result was positive only in 2 samples taken from the same farm in the same period out of 120 samples. Enrofloxacin remains of this 2 sample were analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) to verify the existence and amount for determination. HPLC detected in samples as a result the amount of enrofloxacin were exceeded the maximum residue limits. Which results is deemed to be suitable for reported values of "Maximum Residue Limits of Veterinary Drugs in Foods of Animal Origin Communique". It was concluded that, national residue monitoring programs further effect and the sales and use of antimicrobials were controlled sustainability by the experts.

**Keywords:** Rainbow Trout, Oxytetracyclin, Enrofloxacin, Charm II Test, Ridascreen ELISA Test, HPLC

## GİRİŞ

İnsan gıdası olarak değerli bir protein kaynağı olan balık eti ve diğer su ürünleri, tüm esansiyel amino asitleri içermesi ve yüksek biyolojik değere sahip olmalarından dolayı insan beslenmesinde son derece önemlidir (Huss, 1995). Dünya besin gereksiniminin önemli bir kısmını karşılayan ve temel bir endüstri niteliğine sahip olan su ürünleri yetiştiriciliği, 1970’li yıllardan itibaren tüm dünyada hızlı bir gelişim göstererek, Food and Agriculture Organization-Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlenmiştir (FAO, 2006).

Balık eti esansiyel yağ asitlerini yüksek oranda içerirken, yağda eriyen vitaminlerden A ve D vitaminlerini gerek etlerinde gerekse yağlarında yüksek miktarda bulundurur. Ayrıca balıklar B grubu vitaminlerinden, B<sub>1</sub> (Tiamin), B<sub>2</sub> (Riboflavin) ve B<sub>6</sub> vitamini (Piridoksin) içeriği yönünden zengin bir besin kaynağıdır. Balıklarda az miktarda da olsa E ve K vitaminine de rastlanır (Huss, 1988). Balık eti, yüksek miktarda kalsiyum, iyot ve fosfor gibi mineralleri de içermektedir. Ayrıca bağ doku miktarı az olduğundan (%2) sindirilme oranı yüksektir. Belirtilen bu yapı ve besin elementleri kompozisyonu nedeniyle balık eti beslenme fizyolojisinde büyük önem taşır (Huss, 1995; Belitz, Grosch ve Schieberle, 2009).

Veteriner ilaçlarının su ürünleri yetiştiriciliğinde profilaktik ve tedavi amaçlı yaygın kullanımı ve antibiyotik kalıntılarının su ürünleri tüketimi yoluyla insanlar tarafından alınması sağlık yönünden global endişelere yol açmaktadır (World Health Organization [WHO], 1999; Inglis, 2000).

Su ürünlerinin insan gıdası olarak tüketilen dokularında antimikrobiyal ilaç kalıntılarının bulunması ile ilgili potansiyel tehlikeler alerjik ve toksik etkiler ile insan bağırsak florasının kolonizasyonunda değişimler ve insan patojenlerinin bu etken maddelere sahip antibiyotiklere karşı direnç kazanmasıdır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde yoğun antibiyotik kullanımı sonucu çevresel

akvatik ortamda ilaç ve metabolitlerinin birikimi, akvatik sisteme dağılması ve ortamdaki canlı popülasyonu üzerindeki olumsuz etkileri olarak değerlendirilebilen çevresel sorunlar bulunmaktadır (WHO, 1999).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımına, alabalıklarda frunkulozis tedavisinde sülfonamidlerin kullanımı ve bazı Gram negatif patojenlere karşı tetrasiklinlerin kullanımından bu yana 50 yılı aşkın süredir başvurulmaktadır. Bununla birlikte, bu yaklaşım 1970’lerde trimetoprim ile etkinliği artırılan sülfonamidlerin kullanımına kadar sınırlı kalmıştır. Bu tarihten günümüze, su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalık problemlerindeki artışa paralel olarak antibakteriyel kullanımı da hızla artmıştır. Veteriner antibakteriyellerin tamamına yakını su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım potansiyeli bulmakta ve farklı coğrafya ve ülkelerde önemli farklılıklar göstermektedir (Inglis, 2000).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı başlıca 3 metotla uygulanmaktadır;

1. Ağız yoluyla uygulama (yemler ile)
2. İmmersiyon terapisi (banyo, daldırma)
3. Enjeksiyon

## KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER

**β-Laktamlar:** Su ürünleri yetiştiriciliğinde başlıca; benzil penisilin ve amoksisilin, İngiltere’de 1990’dan beri, Japonya’da uzun yıllardır kullanım alanı bulmuştur. Ancak β- laktamların bu alanda geniş kullanım alanı olmadığı bildirilmektedir (Food and Agriculture Organization [FAO], 1997).

**Nitrofuraneler:** Furazolidon ve nifurpirinolü içeren sentetik antibiyotiklerdir. Avrupa Birliği’nde hayvansal ürünlerde kullanımı yasaklanmıştır (Samuelsen vd., 1991).

**Makrolidler:** Balık yetiştiriciliğinde kullanılan tek makrolid eritromisindir (FAO, 1997).

**Fenikoller:** Kloramfenikol, tiamfenikol ve florfenikolü içeren geniş spektrumlu antibiyotik grubudur. Avrupa ve ABD’de bunlara ilişkin kalıntı bulunmamalıdır, bu

bölgelere ihraç edilecek ürünlerinde fenikol grubu antibiyotikler yönünden ari olması zorunludur (FAO, 1997).

**Kinolonlar:** Sentetik antibakteriyellerdir. Birinci jenerasyon kinolonlar nalidiksik asit, oksolinik asit ve flumequin; ikinci jenerasyon kinolonlar ise florlu türevleri olan enrofloksasin ve sarafloksasini içermektedir. Bunlardan ilk jenerasyon Gram negatif bakterilere etkili iken florokinolonların daha geniş spektruma sahip olduğu bildirilmektedir. Kinolonlar mikrobiyel parçalanmaya dirençlidirler. Sedimentlerdeki kalıntılar haricinde, ışık etkisi ile parçalanma olabileceği belirtilmektedir (Björklund vd., 1991; Hansen vd., 1992; Samuelsen vd., 1992). Sülfonamid ve beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Bu sebeple su ürünleri yetiştiriciliğinde sıklıkla tercih edilen antibiyotik grubudur (Ramos vd., 2003).

**Rifamisin:** Bazı Güneydoğu / Asya ülkelerinde karides yetiştiriciliğinde Luminoz Vibriosis'in tedavisinde az da olsa kullanıldığı bildirilmektedir (Primavera, 1993).

**Sülfonamidler:** Tek başlarına kullanılabilmesinin yanında daha çok trimetoprim veya ormetoprim ile beraber kullanıldıkları bildirilmektedir. Frunkulozis, Enterik kızıl ağız hastalığı (Enteric red mouth disease) ve vibriosis gibi hastalıkların kontrolünde genellikle yemlere katılarak kullanılmaktadır (Samuelsen vd., 1994; Capone vd., 1996).

**Tetrasiklinler:** Bu grupta en çok kullanılan antibiyotiğin oksitetrasiklin olduğu, bazı bölgelerde klortetrasiklin ve doksisisiklin kullanıldığı belirtilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde en geniş kullanım alanı bulan antibiyotik oksitetrasiklidir (OTC). Ucuz olması bir avantajdır. Oral ya da banyo tarzında uygulanabilmektedir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin çoğuna, özellikle balıklarda ve kabuklularda görülen *Aeromonas* ve *Vibrio* gibi bakterilere etkilidir. Ancak son zamanlarda artan direnç gelişimi nedeniyle tedavi edici etkinin azaldığı belirtilmektedir (Capone vd., 1996; Smith, 1996).

Diğer antimikrobiyaller arasında oksitetrasiklin, düşük toksisitesi ve çok farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı olan geniş spektrumu sayesinde en çok tercih edilen ajandır. OTC'nin *Vibrio*'lara karşı profilaktik olarak başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Bermudez-Almada vd., 1999).

Tetrasiklinlerin yoğun kullanımı akvatik çevrede bu bileşiklerin kalıntılarına yol açmaktadır. Bu antibiyotiklerin balık çiftliklerinde kullanılması yüzey sularına karışmalarının değişik bir yoludur. Balık çiftliklerinde kullanılan yeme katılan tetrasiklinler yüzey sularında tetrasiklin kalıntılarının nedenlerinden biridir. Son yıllarda akvakültürlerde oksitetrasiklinler tercih edilen tetrasiklin grubu antibiyotiklerdir. Bu nedenle akvatik çevrede bu bileşiğin kalıntısının izlenmesinde güvenilir analitik metotlara gereksinim duyulmaktadır (Himmelsbach ve Buchberger, 2005).

Tetrasiklinlerin Asya ülkelerinin en çok su ürünleri üreten ülkelerinde kullanılan ilk 3 antibiyotik grubundan biri olduğu belirtilmektedir. Küresel ölçekte başlıca su ürünleri üreticisi ülkelerin yaklaşık %55'inin enrofloksasin uyguladığı bildirilmektedir (Lulijwa vd., 2020).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan başlıca antibiyotikler Tablo 1'de belirtilmiştir (Subasinghe vd., 2000).

Balık eti hem insan beslenmesinde hem de hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında çok büyük öneme sahiptir. Özellikle Türkiye'de son yıllarda büyük bir gelişme gösteren gerek deniz gerekse iç sulardaki su ürünleri üretim potansiyeli göz önüne alındığında, halk sağlığı açısından risk yaratabilecek kalıntı problemi ve özellikle antibiyotik kalıntıları ile ilgili olarak araştırmaların çoğaltılması ve risk değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda, çalışmada iki farklı ilde yetiştirilen 6 farklı alabalık çiftliğinden alınan gökkuşuğu alabalıklarında oksitetrasiklin ve enrofloksasin antibiyotik kalıntılarının araştırılması amaçlanmıştır.

Tablo 1. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan başlıca antibiyotikler

İlaç grubu	İlaç ismi	Uygulama yolu	Doz (kg CA)	Not
<b>Antibiyotikler</b>				
β-laktamlar	Ampisilin Amoksisilin	ağız yolu	50-80 mg/kg 10 gün	Somonlarda furunkulosis, tedavisinde
Aminoglikozidler	Neomisin Kanamisin	ağız yolu/banyo	50-80 mg/kg 10 gün 20 mg/l	
Tetrasiklinler	Tetrasiklin Oksitetrasiklin Doksisisiklin	ağız yolu/banyo	50-80 mg/kg 10 gün 20 mg/l	Somon ve alabalık yetiştiriciliğinde geniş spektrumlu
Makrolidler	Eritromisin	ağız yolu/banyo	50 mg/kg 10 gün 2 mg/l 1 saat	
Fenikoller	Kloramfenikol	ağız yolu/banyo	50-80 mg/kg 10 gün 20 mg/l 1 saat	Gıdalardaki kalıntıları insanlarda aplastik anemiye sebep olur.
<b>Sentetik Bakteriyel İlaçlar</b>				
Sülfonamidler	Sülfomerazine Sülfodimetoksin Trimethoprim+ Sülfodiazin	ağız yolu	200 mg/kg 10 gün 50 mg/kg 10 gün	Alabalık ve somonlarda furunkulosis'e karşı kullanılan geniş spektrumlu bakteriyostatik maddeler
Nitrofuranlar	Furazolidon Furaltadon Nifurpirinol	ağız yolu	50-80 mg/kg 10 gün 10-50 mg/kg 10 gün	Geniş spektrumlu antimikrobiyel madde. Kanserojen
Kinolonlar	Oksolinik asit Flumekuoin	ağız yolu	12 mg/kg 10 gün	Asyada karides çiftliklerinde

Çalışmada hazır test kitleri ile kalıntı varlığının hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesinden sonra HPLC yöntemi kullanılarak kalıntı miktarı saptanmıştır.

## MATERYAL VE METOTLAR

**MATERYAL**  
Bu çalışma, Ankara'da üretim yapan Çubuk ve Nallıhan bölgesinde ve İzmir'de üretim yapan Bergama, Kemalpaşa ve Tire bölgesindeki alabalık çiftliklerinden alınan örneklerle gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, örnekler Aralık 2007-Mart 2008, Nisan-Haziran 2008, Eylül-Aralık 2008 olmak üzere üç farklı dönemde alınarak, her çiftlikten 20'şer adet olacak şekilde toplam 120 örnek kullanıldı.

Örnekler soğuk muhafaza altında, oksitetrasiklin ve enrofloksasin analizleri için Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne götürülerek, Enstitü Toksikoloji Laboratuvarında gerekli analizler gerçekleştirildi.

## Laboratuvarda kullanılan araçlar, cihazlar

Oksitetrasiklin analizi için Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü toksikoloji laboratuvarında mevcut olan Charm II 7600 Analizer (Charm Sciences Inc., USA) cihazı, enrofloksasin analizi için Ridascreen Elisa test cihazı (ELISA EL<sub>x</sub> 808) ve HPLC cihazı (Schimadzu RF 10A<sub>XL</sub>, SCL 10<sub>VP</sub>, LC 10AT<sub>VP</sub>, CTO 10AS<sub>VP</sub>) kullanıldı.

## METOTLAR

### Balık örneklerinin nakli ve laboratuvarda muhafazası

Çiftliklerden alınan balık örnekleri torbalanıp etiketlenerek buzlu termos içerisinde yaklaşık 0-2 °C'de muhafazaya alındı. Ankara bölgesinden toplanan örnekler ertesi gün laboratuvara getirildi ve soğuk muhafaza altında analize kadar saklandı. İzmir bölgesinden toplanan örnekler ise aynı gün içerisinde soğuk muhafaza altında laboratuvara getirilip analize kadar saklandı.

### Charm II Testi

Tetrasiklin yarışmacı testi olarak tanımlanan bu test, reseptör olarak görevli mikrobiyal hücreye bağlı bir antijenden oluşmaktadır. Etiketlenmiş tetrasiklin ve örnekten alınan tetrasiklin bu reseptöre bağlanmak için yarışır. Tetrasiklinlerin tespit edilmesi için iki reajan kullanılmıştır: etiketli bir tetrasiklin [<sup>3</sup>H] ve bağlayıcı reajan (mikrobiyal hücreye bağlanan belirli bir antikor). Bağlayıcı reajan, tetrasiklinli örnekleme eklendiğinde, hücreye yapışık antikora bağlanır. Bu durum, [<sup>3</sup>H] tetrasiklinin bu alanlara bağlanmasını engeller. Rakam ne kadar küçük olursa (cpm) örnekleme kontaminasyon oranı da o kadar fazla olur. [<sup>3</sup>H] etiketli tetrasiklin ne kadar çok bağlanırsa, örnekleme tetrasiklin ilaç oranı o kadar az olur (Anonim, 2002b).

Testin uygulanmasında Kontrol Noktası olarak tanımlanan, negatif ve pozitif için tekrarlanan veriler arasındaki kesme değeri dikkate alınmaktadır. Kontrol noktasından büyük olan test sonuçları negatif örnekleme gösterirken, kontrol noktasından düşük ya da ona eşit çıkan sonuçlar örneklemin muhtemelen pozitif olduğunu ve yeniden test edilmesi gerektiğini göstermektedir (Anonim, 2002b).

### Charm II Testi için örneklerin hazırlanması ve analizi

Balık örneklerinde kaslar kılçıklardan ve deriden ayrıldıktan sonra Charm II Test yöntemine göre işleme alınarak önce supernatant elde edildi ve pH 7.5'e ayarlandı. Santrifüj ve inkubasyon işlemlerinden sonra makineye okutulup sonuçların pozitif veya negatif olduğunu belirlemek için kontrol noktası ile karşılaştırıldı (Anonim, 2002b).

### Ridascreen Elisa Test

Testin temel noktası antijen-antikor reaksiyonudur. Mikrotiter kuyucuklar, anti-siprofloksasin antikorlarına karşı yönlendirilen yakalama antikorları ile kaplıdır. Siprofloksasin standartları veya örneklem solüsyonu, siprofloksasin enzim konjugatı ve anti-siprofloksasin antikorları eklenir. Serbest

siprofloksasin ve siprofloksasin enzim konjugatı, siprofloksasin antikor bağlayan alanlar (kompetitif enzim immunoassay) için yarışır. Bağlanan enzim konjugatı, kromojeni maviye dönüştürür. Stop solüsyonunun eklenmesi, rengin maviden sarıya dönmesine yol açar. Ölçümler, fotometrik olarak 450 nm'de yapılır; absorpsiyon, örneklem içindeki siprofloksasin konsantrasyonu ile ters orantılıdır (Anonim, 2007).

### Elisa testi için örneklerin hazırlanması ve analizi

Numune homojenize edildi. 1g homojenize edilmiş numuneye 4 ml %70'lik metanol ilave edilip 10 dakika vorteks veya shaker ile karıştırıp, santrifüj edildi (10 dakika, 3000 g, 20-25 °C). Santrifüj sonunda üst fazı distile su ile 1:2 (1+1) oranında seyreltilip, 50µl'yi ELISA analizinde kullanıldı (Anonim, 2007).

### HPLC

ELISA ile pozitif bulunan numune HPLC ile doğrulandı. Metot, floresanla çalışan HPLC'de tespit edilen kinolon için bir ekstraksiyon ve temizleme aşamasını içermektedir. Önerilen analitik metot, doku örnekleminin pH 7.4 olan 0.05 M fosfat tamponu ile homojenize edilmesini ve Discovery DS-18 kartuşlar ile temizlenmesini içerir. Kromatografik separasyon için Symmetry C<sub>18</sub> kolonu kullanıldı: mobil faz olarak asetonitril-0.02 M fosfat tamponu pH 3.0 (18:82) ile siprofloksasin, enrofloksasin ve sarafloksasin, ve eksitasyon dalga boyu: 280 nm ve emisyon dalga boyu 450 nm olan dedektör kullanılarak yapıldı (Ramos vd., 2003).

Siprofloksasin, Enrofloksasin ve Sarafloksasin ile ilgili HPLC tipik kromatogramları Şekil 1'de; enrofloksasin ve siprofloksasin pik oluşturma zamanı üzerine asetonitrilin etkisi Şekil 2'de verilmiştir.

### HPLC için örneklerin hazırlanması ve analizi

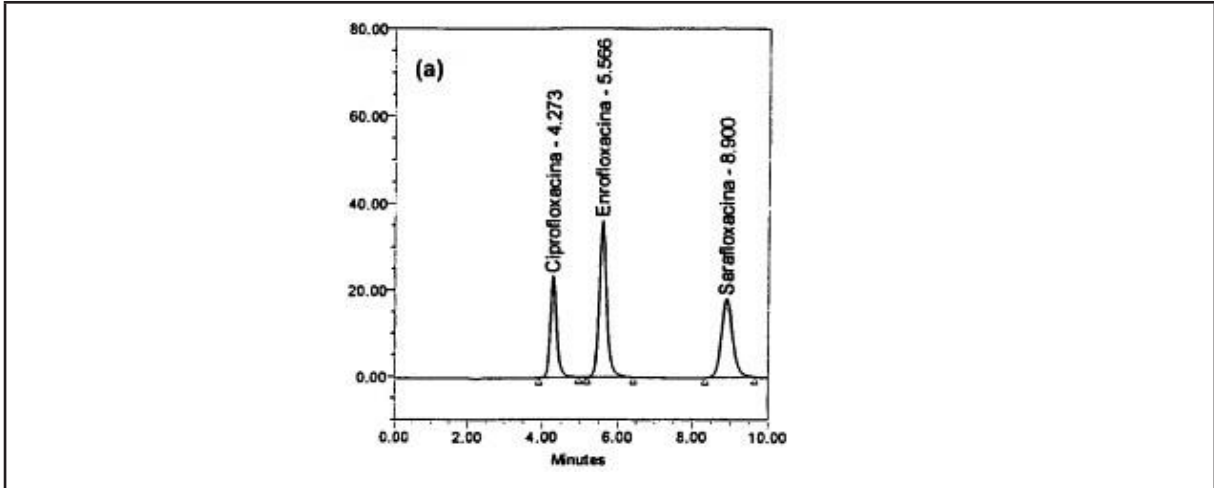
2 g numune tartılıp 10 ml 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile 10 dk vorteksde

karıştırıldıktan sonra 15 dk 4000 rpm'de 20 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan kısım (süpernatant) alınarak işlem tekrarlandı. Süpernatantlar birleştirildi ve kaba partiküllerden arındırmak amacı ile filtreden geçirildi. 15 ml önceden aktive edilen 3 ml etanol, 3 ml distile su ve numunenin tamamı karıştırılıp, kuruma önlenerek 3 ml hekzan (yağlar için) eklendi. Tüpler kartuştan geçirilerek, 3 ml %1 Trifluoroasetik asit (1 ml) / Acetonitril (99 ml) ile elüe edildi. 40-45 °C'de nitrojen buharı altında buharlaştırıldı. Dipte kalan tortu üzerine 2 ml fosfat tampon ile çözülüp, 0.45 µl'lik filtreden geçirildi. 100 µl enjektör ile cihaza yüklendi.

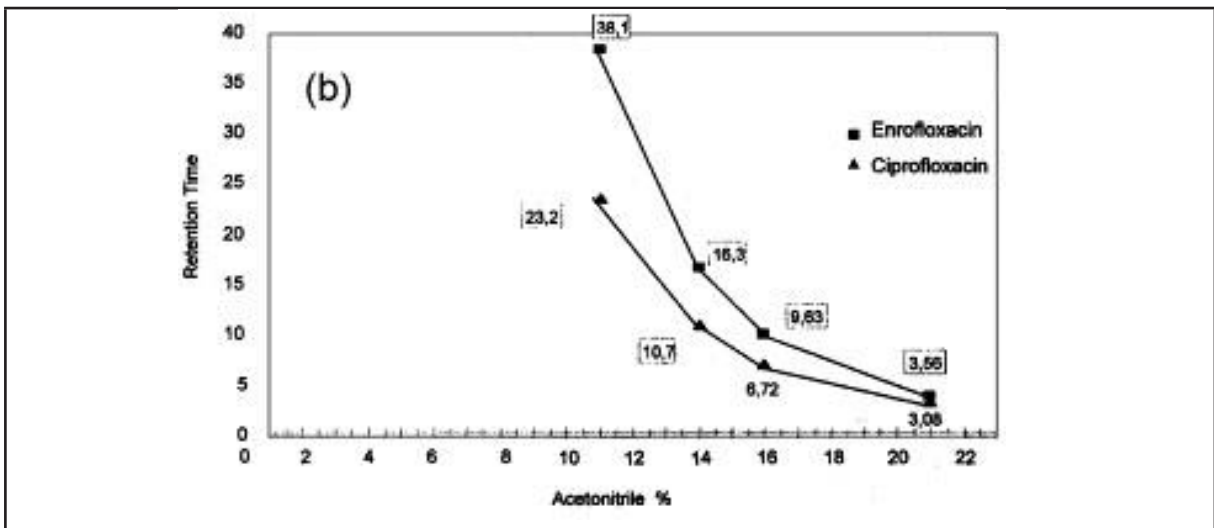
## BULGULAR

Bu tez çalışmasında, tüketime sunulan alabalıklarda iki farklı antibiyotik grubuna ait kalıntı seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İzmir ilinden 3 adet, Ankara ilinden 3 adet alabalık çiftliği seçilmiş ve buralardan belli periyotlarda toplam 120 adet alabalık numunesi toplanmış ve analizler Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü Toksikoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada;

- Farklı çiftliklerden alınan alabalıklarda oksitetrasiklin kalıntısının Charm II test ile tespiti,
- Farklı çiftliklerden alınan alabalıklarda enrofloksasin kalıntısının Ridascreen ELISA test ile saptanması,



Şekil 1. Kinolonun kromatografik sistemin tipik kromatogramları. (a) Siprofloksasin enrofloksasin ve sarafloksasin: Mobil fazı: acetonitril – 0.02 M fosfat buffer pH 3.0 (18.82). Akış hızı: 1 ml min. Floresan dedektörü: Eksitasyon dalga boyu: 280 nm, Emisyon dalga boyu: 450 nm. (Ramos vd., 2003).



Şekil 2. 278 nm ve 1 ml/dk akış hızında Symmetry C18 (150x46 µm) kolonu ile siprofloksasin ve enrofloksasin retensiyon zamanı üzerinde mobil fazda (0,02 M fosfat tampon pH 3) asetonitrilin etkisi (Ramos vd., 2003).

c) Oksitetrasiklin ve enrofloksasin kalıntılarının varlığı tespit edilen numunelerde HPLC ile miktar tayini yapılmıştır.

Bu kapsamda; Aralık 2007-Mart 2008 tarihleri arasında toplam 40 adet, Nisan Haziran 2008 tarihlerinde toplam 40 adet, Temmuz-Eylül 2008 tarihleri arasında toplam 40 adet alabalık numunesi farklı çiftliklerden toplanmış ve analizleri yapılmıştır.

Farklı çiftliklerden, farklı havuzlardan alınan alabalık örnekleri oksitetrasiklin kalıntısının tespiti için Charm II test ile analiz edilmiştir. Oksitetrasiklin kalıntı analizleri sonucunda kalıntı varlığı tespit edilememiştir. Enrofloksasin kalıntısı için RidaScreen Enro/Cipro Test ile numunelerin analizi yapılmıştır. Sadece iki adet numunede enrofloksasin kalıntısı tespit edilmiş ve HPLC yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır.

Analiz dönemlerine ait Charm II ve ELISA test sonuçları Tablo 2, 3 ve 4'te verilmiştir.

Tablo 2. Aralık 2007-Mart 2008 dönemi bulguları

Çiftlik	Örnek Adedi	Oksitetrasiklin	Enrofloksasin
İ-1	6	-	-
İ-2	6	-	-
İ-3	7	-	-
A-1	7	-	-
A-2	7	-	-
A-3	7	-	-

Tablo 3. Nisan 2008-Haziran 2008 dönemi bulguları

Çiftlik	Örnek Adedi	Oksitetrasiklin	Enrofloksasin
İ-1	7	-	-
İ-2	7	-	-
İ-3	7	-	-
A-1	7	-	-
A-2	6	-	-
A-3	6	-	-

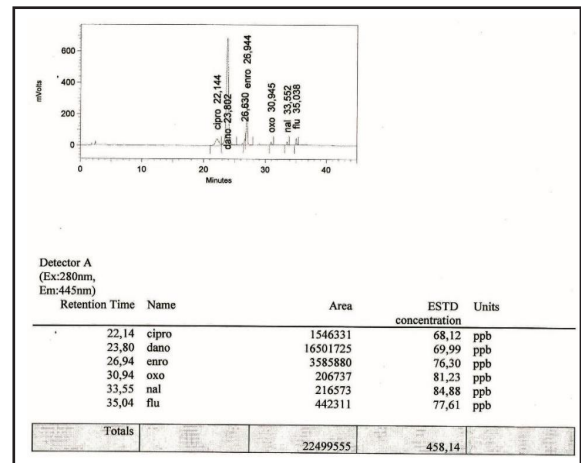
Tablo 4. Eylül 2008-Aralık 2008 dönemi bulguları

Çiftlik	Örnek Adedi	Oksitetrasiklin	Enrofloksasin
İ-1	7	-	-
İ-2	7	-	-
İ-3	6	-	-
A-1	6	-	(2 numunede) +
A-2	7	-	-
A-3	7	-	-

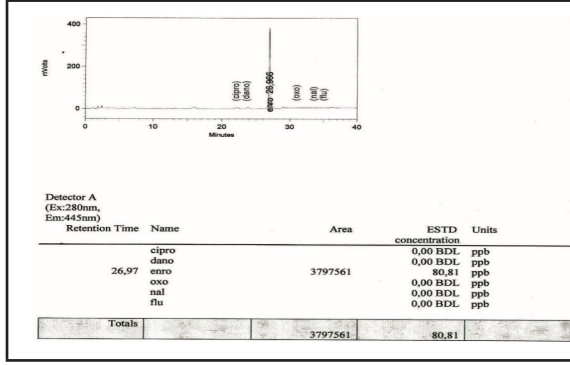
Analizler sonucunda Charm II test ile yapılan 3 periyotluk dönemlerde alınan 120 adet numunenin oksitetrasiklin kalıntı analizleri sonucunda oksitetrasiklin kalıntısına rastlanılmamıştır. Analizlerin sonucunda 120 numuneden 120'sinde kontrol noktasından büyük değerler okunmuş ve sonuçların negatif olduğu görülmüştür.

Aynı numunelerin enrofloksasin kalıntısı tespiti amacı ile Ridascreen Elisa Test ile analizleri yapılmıştır. Analizlerin sonucunda 120 numuneden sadece 2 numunede test sonucu pozitif olduğu saptanmıştır.

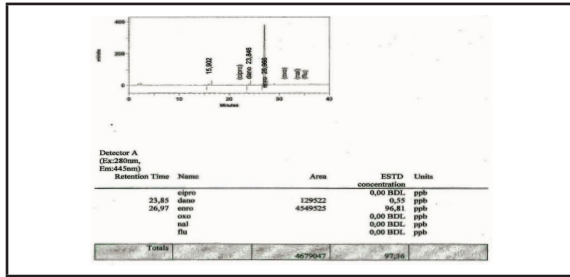
Pozitif çıkan numunelerin enrofloksasin kalıntı varlığını doğrulamak ve miktar tayini için HPLC ile tekrar test edilmiştir. Kalibrasyon için 0 ppb, 50 ppb, 100 ppb konsantrasyonlarda standartlar kullanılarak 3 noktalı kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. 100 ppb standart numune için geri kazanım oranı ortalaması 76.30 ppb olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Geri kazanım sonucu (100 ppb standart)



Şekil 4. 100 no'lu numune HPLC sonucu



Şekil 5. 101 no'lu numune HPLC sonucu

HPLC sonucunda enrofloksasin miktarı 100 no'lu numunede 80,81 ppb (Şekil 4), 101 no'lu numunede 96,81 ppb (Şekil 5) olarak bulunmuştur. Saptanan enrofloksasin düzeyleri, geri kazanım oranı göz önüne alınarak yapılan değerlendirme sonucu, numullerdeki kalıntı miktarları 100 no'lu numunede 105.91 ppb olarak; 101 no'lu numunede ise 126.88 ppb olarak saptanmıştır (Tablo 5).

Ulusal kalıntı programı kapsamında yetiştirilen su ürünlerinde olması gereken maksimum kalıntı limitleri enrofloksasin ve oksitetrasiklin için <100 ppb olarak verilmiştir. Saptadığımız miktarların maksimum kalıntı limitlerinden yüksek olduğu görülmüştür.

## TARTIŞMA

Balıklar, metabolizma hızları önemli ölçüde çevredeki su sıcaklığı tarafından kontrol edilen poikiloterm hayvanlardır. Su

sıcaklığında 1 °C'lik artış metabolizma hızını yaklaşık %10 oranında artırabildiğinden, ilaçların alınımı, emilimi, dağılımı ve eliminasyonu gibi farmakokinetik parametrelerin su sıcaklığı ile önemli ölçüde değişmesi söz konusudur. Farmakokinetik çalışmalar soğuk sulardaki balık türlerinde ilaç kalıntısı probleminin daha büyük boyutta olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca balıklarda antibiyotik kalıntı miktarının, uygulama yolu ya da ilaç formülasyonundaki küçük değişikliklerden nasıl etkilendiği tam olarak bilinmemektedir (Somjetlertcharoen, 2001).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımına izin verilmiş antibiyotiklerin varlığı ve güvenlik seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada toplam 77 tatlı su balık çiftliğinden alınan 194 örnek farklı antibiyotikler (tetrasiklin, penisilin, tilasin, eritromisin, streptomisin ve neomisin), 97 örnek kloramfenikol ve 176 örnek sülfonamid kalıntıları yönünden analiz edilmiştir. Tetrasiklin, penisilin, tilasin, eritromisin, streptomisin ve neomisin için tüm örnekler negatif bulunmuştur. Bunun sebebinin bu antibiyotiklerin vücuttan atılma sürelerinin kısa olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Hiçbir örnekte kloramfenikol kalıntısına rastlanılmamış ve kullanımı yasak olan bu antibiyotik için mümkün olan en düşük belirleme limitleri kullanılarak etkin bir tarama yapılması gerektiğine değinilmiştir. Çalışmada 194 örneğin 5'inde sülfonamid varlığı saptanmış ve nedeninin balık yemlerine katılan sülfome razin olduğu belirlenmiştir (Şinigoj-Gaçnik vd., 2005). Çalışma bulguları değerlendirildiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir.

İngiltere'de 2000 yılında gerçekleştirilen ulusal kalıntı izleme programında 1250 adet alabalık ve somonda antibiyotik kalıntıları araştırılmış ve hiçbirinde antibiyotik kalıntısına rastlanmamıştır (Anonim, 2002a). Benzer şekilde Avustralya'da marketlerden

Tablo 5. Enrofloksasin kalıntısı tespit edilen numunelere ait değerlendirme

Numune sayısı	Pozitif numune sayısı	Pozitif numune oranı (%)	MR (ppb)	Örnek No	Pozitif örneklerde kalıntı düzeyi (ppb)
120	2	1,6	<100	100	105,91
				101	126,88



toplanan 60 balık örneğinin incelendiği ulusal kalıntı izleme programında toplam 54 antimikrobiyel madde araştırılmış yalnızca 10 örnekte düşük seviyelerde malaşit yeşili saptanmıştır (Anonim, 2005). İrlanda’da aynı çerçevede 2003 yılında gerçekleştirilen kalıntı izleme programında örneklerin kullanımını yasak olan antibiyotikler bakımından negatif olduğu, maksimum kalıntı limitleri belli olan antibiyotikler için ise analiz edilen 163 örneğin 5 tanesinde oksitetrasiklin konsantrasyonlarının MRL seviyesinden yüksek olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2003). Çalışmada incelenen 120 örnekte tetrasiklin kalıntısına rastlanmamış olması, inceleme yeri ve zamanın farklılığından kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

Marketlerde satışa sunulmuş balıklarda antibiyotik kalıntılarının araştırıldığı bir başka çalışmada ise toplam 12 tür balık, oksitetrasiklin, oksolinik asit, miloksasin, ve sülfomonomethoksin varlığı bakımından incelenmiş ancak kalıntı belirlenememiştir (Ueno vd., 1999).

Murray vd. (1988), marketlerden aldıkları 54 balık örneğinin 7’sinde miktarı 8-37 ng/g arasında değişen tetrasiklin kalıntısı saptamışlar ancak bu değerlerin tetrasiklinler için belirtilmiş 100 ng/g’lık maksimum kalıntı limitlerinin altında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları benzer bulunmuştur. Balık çiftliklerinde antimikrobiyellerin hastalıkların tedavisinde kullanıldığı su ve sediment örneklerinin kalıntı analizinde HPLC ve ELISA metotları karşılaştırılmıştır. Gıdalarda antibiyotiklerin saptanması için ticari ELISA kitleri kullanılabilir (Himmelsbach ve Buchberger, 2005).

Piyasada bulunan en son gelişmeler yüksek hassasiyetle taranan örnek sayısını artırarak rutin olarak uygulanmasını sağlamaktadır (Toldra ve Reig, 2006).

Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan ve canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde uygulanmakta olan ulusal kalıntı kontrol programı; Avrupa Birliğinin 96/23/EC sayılı direktifi ile uyumlaştırılması tamamlanmış olan “*Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli*

*Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik*” esaslarına göre yürütülür. Programın amacı; hayvansal orijinli gıdaların izin verilmeyen uygulama, yasaklı madde ve izinli veteriner ilaçları yönünden güvenli olduğunu sağlamaktır (Anonim, 2006).

2006 yılı kalıntı izleme sonuçları, analiz edilen su ürünleri dahil çeşitli hayvansal gıdaları içeren numunelerde hormon ve diğer yasaklı madde bulunmadığını ve numunelerin %96,5’inin ölçülebilir düzeyde veteriner ilaç kalıntısı içermediğini göstermektedir. Çevresel bulaşanlar açısından analiz edilen numunelerin sonuçları kalıntı seviyelerinin düşük olduğunu ve tüketici sağlığı için riskli bir durumun olmadığını göstermektedir (Anonim, 2006).

Kalıntı Kontrol Planında yer alan her grup ürün için numune sayıları “*Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler İle Bunların Kalıntılarının İzlenmesi İçin Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik*”, Ek IV’te verilen metot kullanılarak ve önceki yıla ait hayvan kesimi/ birincil ürün üretim miktarı esas alınarak belirlenmiştir (Anonim, 2006).

2006 su ürünleri programında markete sunum için hazır olan balıklardan ve çiftliklerden üretim zinciri boyunca numune alımı gerçekleştirilmiştir. Bu programda; toplam 848 numune alımı yapılmış, 952 analiz gerçekleştirilmiştir. İzleme basamağında 1 balık numunesinde arsenik, 5 balık numunesinde malaşit yeşili tespit edilmiştir. Malaşit yeşili ile ilgili pozitif bulgularla ilgili olarak, sorumlu çiftliklerde geri izleme başlatılmış ve detaylı araştırmalar yürütülmüştür. Bu kapsamda; 2006/05 sayılı Genelge gereği, her bir işletmeden en az 6 parti olacak şekilde ayırım yapılarak geri izleme numuneleri alınarak analiz için laboratuvara gönderilmiştir. Çiftlik sahibine “Uyarı Mektubu” verilerek geri izleme sonuçlarının pozitif bulguyu teyit etmesi durumunda yönetmelik gereği ürünlerin imhasını da içeren tedbirlerin alınacağı bildirilmiştir. Şüpheli çiftliklerde yerinde yapılan incelemelerde

malaşit yeşilin kullanımına dair bir delil tespit edilememiştir (Anonim, 2006). Çalışma sonuçları tetrasiklinler açısından benzer bulunmuştur. Ancak enrofloksasin kalıntısı açısından iki numunede MRL'yi aştığı saptanmıştır. 2006 kalıntı izleme sonuçları incelendiğinde enrofloksasin yönünden bir tarama yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle, yeni kalıntı izleme programlarında enrofloksasin yönünden inceleme yapılması gereklidir. Nitekim, 2008 ulusal kalıntı izleme programında enrofloksasin kalıntı limitleri verilerek izleme programına dahil edilmiştir. 2008 kalıntı izleme sonuçları elde edilemediği için bir değerlendirme bu aşamada yapılamamıştır.

Dünyadaki su ürünleri üretimine en büyük katkıyı sağlayan Çin'de su ürünleri yetiştiriciliğinde, hastalığa neden olan mikroorganizmaları kontrol etmek için toplam 20 çeşit antibiyotik kullanıldığı bildirilmiştir. Bu antibiyotikler arasında kinolonlar, su ürünlerinde en sık saptanan gruptur, bunu sülfonamidler ve makrolidler takip etmektedir (Liu vd., 2017). Su ürünlerindeki ortalama antibiyotik konsantrasyonları, maksimum kalıntı limitlerinden daha düşük olmasına rağmen, insan sağlığı için risk oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalıdır ve bu risklerin oluşmasını engellemek için daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Guidi vd. (2018) 29 adet nil tilapia ve gökkuşuğu alabalığında yaptıkları çalışmada kinolon ve tetrasiklin grubu 14 antibiyotiğin varlığını LC-MS/MS yöntemi ile araştırmışlar ve 29 örneğin 25'inde maksimum kalıntı limitlerini aşmayacak miktarda enrofloksasin tespit etmişlerdir. Çalışmada kinolon ve tetrasiklinlerin eş zamanlı tespiti için basit, hızlı ve kantitatif bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Birçok antibiyotiği tespit etmek amaçlı hızlı ve güvenilir bir yöntem olan LC-MS/MS yöntemi son yıllarda tercih edilen yöntemdir.

Deniz pisi balığı yetiştiriciliğinde balıkların yemlerine katılan organik asitlerin bağırsak florası ve bağışıklık fonksiyonları üzerine olumlu etkileri olduğu, organik asit karışımlarının balık yetiştiriciliğinde

hastalıkları önleyici yada iyileştirici olarak diyetlerine katılmasının antibiyotiklerin alternatifi olabileceği bildirilmiştir (Katya vd., 2018). Antibiyotiklerin alternatifi olabilecek proflaktik amaçlı yem katkıları üzerinde daha fazla çalışılmalıdır. Han vd. (2020)'nin yaptıkları çalışma, süttten yeni kesilmiş domuz yavrularında organik asitler ve orta zincirli yağ asidi kombinasyonlarının bağışıklık ve bağırsak florası üzerinde etkili olabileceği ve antibiyotiklerin alternatifi olabileceği yönünden umut vadetmektedir.

Thiang vd. (2021), yılında yaptıkları çalışmada Malezya'da bulunan 29 akvakültür çiftliğinden aldıkları yüzey sularında antibiyotik kalıntı varlığını araştırmışlar, 23 antibiyotik tespit etmişlerdir. En fazla tespit edilen antibiyotik grubunun tetrasiklin grubu antibiyotikler olduğunu, tetrasiklinler içinde ise en fazla oksitetrasiklin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Tetrasiklinleri takiben en fazla rastlanılan antibiyotik grubu sülfanamidler ve sonrasında kinolonlar tespit edilmiştir. Kinolonlar arasında ise en sıklıkla rastlanılan antibiyotiğin enrofloksasin olduğunu bildirmişlerdir. Kinolonlar Asya'da bulunan akvakültür çiftliklerinde geniş kullanım alanı bulmakta ve son yıllarda oksitetrasiklinlerden daha popüler hale geldiği belirtilmektedir. Bu antibiyotikler sular ve sedimetlerde stabil olarak kaldığından yapılan çalışmada örnek olarak yüzey suları kullanılması sıklıkla tespit edilmesinin nedeni olarak açıklanabilir.

## SONUÇ

Dirençli bakterilerin gelişimi, orijini bilinmeyen hastalıkların sağaltılmaya çalışılması ya da aşırı doz uygulamasında olduğu gibi yanlış antibiyotik kullanımının bir sonucudur. Bakteriyel hastalıkların kontrolünde aynı ilacın sıklıkla uzun süre ve tedavi edici dozun altında kullanımı genellikle bakteriyel balık patojenlerinde direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Direnç gelişimi, yetiştiricilikte infeksiyöz hastalıkların artışına ve balık patojenlerinin kontrolünde etkili ilaç sayısının azlığından kaynaklanmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklarla mücadelede antibiyotik kullanımı ilk seçenek olarak düşünülmemeli; bakım, besleme ve hijyen koşulları ile çevresel koşulların iyileştirilmesi amaçlanmalıdır. Antibiyotik seçimi yalnızca antibiyotiklerin etkinliğine bakılarak yapılmamalı, çevresel kalıntı riski hedef dışı organizmalar üzerine potansiyel etkiler, mikrobiyel direnci uyarmaya yatkınlık göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde oksitetrasiklin kalıntıları açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, enrofloksasin yönünden incelenen iki numunede maksimum kalıntı limitleri üzerinde değerlerin saptanması önem taşımaktadır. Bununla beraber, incelenen örnek sayısı dikkate alındığında oldukça düşük oranda saptanması, halk sağlığı açısından risk oluşturmayacağı şeklinde değerlendirilmiştir. Bu durum, iki bölgede üç farklı çiftlikten alınan örnekleri ifade etmesi nedeni ile diğer üretim yerlerini de kapsayan ulusal kalıntı izleme programlarının etkinleştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu programlar antimikrobiyellerin satış ve kullanımını da denetlemelidir. Bu programların yürütülmesinde ve denetlenmesinde konuyla ilgili uzman veteriner hekimlerin görev alması sağlanmalıdır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmada elde edilen bulgular halk sağlığı açısından risk oluşturmayacak gibi görünse de, antibiyotiklerin satış ve kullanımının kontrolü ve düzenlenmesi, antimikrobiyal ajanların su ürünleri yetiştiriciliğinde yetersiz hijyen şartlarının alternatif durumu çıkarılması, toplumun su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının potansiyel riskleri yönünden bilinçlendirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonim. (2002a). Veterinary residues committee statutory and non-statutory residue surveillance in 2000. Statutory Residue Surveillance. The United Kingdom's statutory. Erişim adresi (15 Şubat 2006): www.noah.co.uk
- Anonim. (2002b). Charm II Test for

Tetracyclines in Tissue, Serum and Urine, Operators Manuel. Charm Sciences Inc.

- Anonim. (2003). Status of Irish Aquaculture 2003. Erişim adresi (12 Ocak 2006): www.marine.ie/
- Anonim. (2005). Report on a survey of chemical residues in domestic and imported aquacultured fish. Food standards Australia New Zealand. Erişim adresi (25 Ocak 2006): http://www.foodstandards.gov.au/
- Anonim. (2006). Canlı hayvan ve hayvansal ürünlerde kalıntı izleme sonuçları-2006. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Anonim. (2007). Ridascreen® Enro/Cipro, Enzyme Immunoassay for the Quantitative Analysis of Enrofloxacin and Ciprofloxacin. Art. No: R3111. R-Biopharm AG.
- Belitz, H. D., Grosch, W. ve Schieberle, P. (2009). Food Chemistry (1070 p.). 4<sup>th</sup> Edition. Berlin: Springer-Verlag.
- Bermudez-Almada, M. C., Perez-Tello, M. G., Valenzuela-Quintanar, A. I. ve Vazquez-Moreno, L. (1999). Oxytetracycline Residues in Cultured White Shrimp Tissue by HPLC and a Microbial Receptor Assay. *Journal of Food Science*, 64(4), 638–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15100.x>
- Björklund, H. V., Raberg, C. M. ve Bylund, G. (1991). Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 97, 85–96.
- Capone, D. G., Weston, D. P., Miller, V. ve Shoemaker, C. (1996). Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, 145(1-4), 55–75. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01330-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01330-0)
- Food and Agriculture Organization. (FAO). (1997). GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/

- IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture (Reports and Studies, GESAMP. No. 65). FAO: Rome. Erişim adresi: <http://www.gesamp.org/publications/towards-safe-and-effective-use-of-chemical-in-coastal-aquaculture>
- Food and Agriculture Organization. (FAO). (2006). Protecting the food chain. Agriculture. Erişim adresi (21 Ekim 2009): [http://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ\\_06/Guidi\\_LR,Santos\\_FA,Ribeiro\\_A,Fernandes\\_C,Silva\\_LHM,Gloria\\_MBA](http://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ_06/Guidi_LR,Santos_FA,Ribeiro_A,Fernandes_C,Silva_LHM,Gloria_MBA) (2018) Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chemistry*, 245, 1232–1238.
- Han, Y., Zhan, T., Zhao, Q., Tang, C., Zhang, K., Han, Y. ve Zhang, J. (2020). Effects of mixed organic acids and medium chain fatty acids as antibiotic alternatives on the performance, serum immunity, and intestinal health of weaned piglets orally challenged with *Escherichia coli* K88, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 269, 114617.
- Hansen, P. K., Lunestad, B. T. ve Samuelsen, O. B. (1992). Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(12), 1307–1312. <https://doi.org/10.1139/m92-215>
- Himmelsbach, M. ve Buchberger, W. (2005). Residue Analysis of Oxytetracycline in Water and Sediment Samples by High-Performance Liquid Chromatography and Immunochemical Techniques. *Microchimica Acta*, 151(1-2), 67–72. <https://doi.org/10.1007/s00604-005-0372-1>
- Huss, H. H. (1988). Fresh Fish Quality and Quality Changes (FAO Fisheries Series, No. 29). FAO: Rome.
- Huss, H. H. (1995). Fresh Fish Quality and Quality Changes in Fresh Fish (FAO Fisheries Technical Paper, No. 334). FAO: Rome.
- Inglis, V. (2000). Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. In Report and proceedings of the SEAFDEC/FAO/CIDA meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia, 20-22 May 1996, Iloilo, Philippines. Iloilo, Philippines, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. p: 7-22.
- Katya, K., Park, G., Bharadwaj, A. S., Browdy, C. L., Vazquez-Anon, M. ve Bai, S. C. (2018). Organic acids blend as dietary antibiotic replacer in marine fish olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Research*, 49(8), 2861–2868. <https://doi.org/10.1111/are.13749>
- Liu, X., Steele, J. C. ve Meng, X. -Z. (2017). Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. *Environmental Pollution*, 223, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.003>
- Lulijwa, R., Rupia, E. J. ve Alfaro, A. C. (2019). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 1-24. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>
- Murray, J., McGill, A. S. ve Hardy, R. (1988). Development of a method for the determination of oxytetracycline in trout. *Food Additives and Contaminants*, 5(1), 77–83. <https://doi.org/10.1080/02652038809373665>
- Primavera, J. H. (1993). A critical review of shrimp pond culture in the Philippines. *Reviews in Fisheries Science*, 1(2), 151–201. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>

- org/10.1080/10641269309388539
- Ramos, M., Aranda, A., Garcia, E., Reuvers, T. ve Hooghuis, H. (2003). Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 789(2), 373–381. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00212-5](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00212-5)
- Samuelsen, O. B., Solheim, E. ve Lunestad, B. T. (1991). Fate and microbiological effects of furazolidone in a marine aquaculture sediment. *Science of The Total Environment*, 108(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90364-k](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90364-k)
- Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T., Husevåg, B., Hølleland, T. ve Ervik, A. (1992). Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 111-119. <http://doi.org/10.3354/dao012111>
- Samuelsen, O. B., Lunestad, B. T., Ervik, A. ve Fjelde, S. (1994). Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*, 126(3-4), 283–290. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90044-2)
- Šinigoj-Gačnik, K., Cerkvjenik-Flajs, V. ve Vadnjak, S. (2005). Evidence of Veterinary Drug Residues in Slovenian Freshwater Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(1), 109–114. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0725-9>
- Smith, P. (1996). Is sediment deposition the dominant fate of oxytetracycline used in marine salmonid farms: a review of available evidence. *Aquaculture*, 146(3-4), 157–169. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(96\)01382-8](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(96)01382-8)
- Somjetlertcharoen, A. (2001). Evaluation of ceftiofur sodium as a chemotherapeutic agent in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (PhD Thesis). Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.
- Subasinghe, R. P., Barg, U. ve Tacon, A. (2000). Chemicals in Asian aquaculture: need, usage, issues and challenges. In Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines (pp. 1-5). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Thiang, E. L., Lee, C. W., Takada, H., Seki, K., Takei, A., Suzuki, S., Wang, A. ve Bong, C. W. (2021). Antibiotic residues from aquaculture farms and their ecological risks in Southeast Asia: a case study from Malaysia. *Ecosystem Health and Sustainability*, 7(1), 1926337. <https://doi.org/10.1080/20964129.2021.1926337>
- Toldra, F. ve Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(9), 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.002>
- Ueno, R., Sangrungruang, K. ve Miyakawa, M. (1999). A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 32(9), 629–633. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(99\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(99)00136-2)
- World Health Organization. (WHO). (1999). Food safety issues associated with products from aquaculture: report of a joint FAO/NACA/WHO study group (Technical Series No. 883). WHO: Geneva.