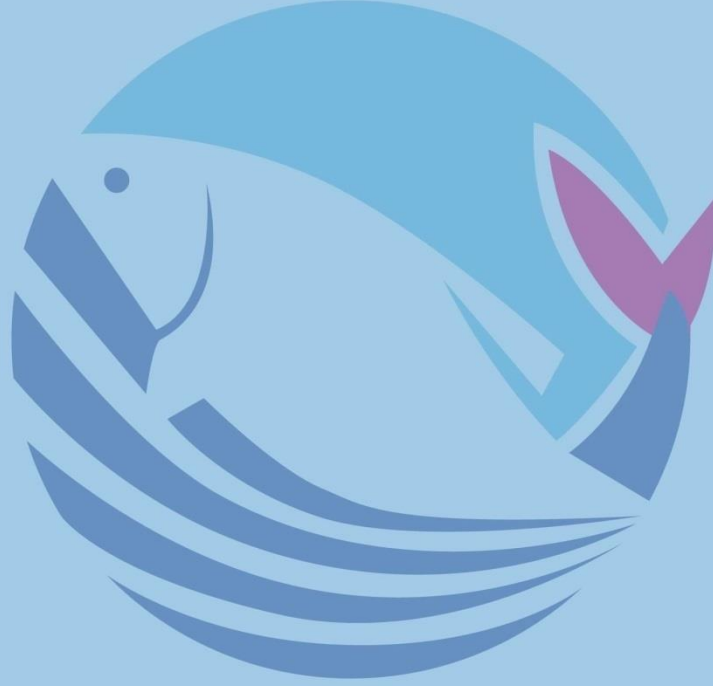


# Acta Aquatica Turcica

**Türk Su Bilimleri  
Dergisi**



**2024**

**Vol:20**

**Number:2 | Cilt:20**

**Sayı:2**

**e-ISSN: 2651-5474**

Yayın Tarihi: Haziran - 2024

ACTA AQUATICA TURCICA  
TÜRK SU BİLİMLERİ DERGİSİ  
E-ISSN: 2651-5474

(YIL: 2024 – CİLT: 20 – SAYI: 2)

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi  
Adına Sahibi /  
Owner of Behalf of Isparta University of Applied Sciences, Eğirdir Fisheries Faculty

Ayşegül KUBİLAY

**Baş Editör / Editor in Chief**

Yunus Ömer BOYACI

**Editörler / Editors**

Şengül BİLGİN  
Nalan Özgür YİĞİT  
Seçil METİN  
Mustafa CEYLAN  
Salim Serkan GÜÇLÜ  
Viktoras LIORANČAS  
Tom WIKLUND  
Aynur LÖK  
Ercüment GENÇ  
Selda TEKİN ÖZAN  
Hüseyin SEVGİLİ  
Mehmet CİLBİZ  
Nezire Lerzan ÇİÇEK  
Gürkan DİKEN  
Öznur ÖZİL  
Mehmet Arif ZORAL  
Hüseyin KÜÇÜKTAŞ  
Laith A. JAWAD  
Stamatis ZOGARIS

**Mizanpaj Editörleri / Layout Editors**

Deniz KARA  
Şeydanur KAN  
Mustafa AKIN

**İngilizce Editörü / English Editor**

Aliye SARMAŞIK

**İletişim / Contact**

Acta Aquatica Turcica  
Yayın Komisyonu Başkanlığı,  
32260 Doğu Yerleşkesi-İSPARTA  
Tel: 0 246 2146401 Faks: 0 246 2146445  
<http://dergipark.org.tr/actaquatr>  
E-Posta: actaquatr@isparta.edu.tr

E-ISSN: 2651-5474

Yayın Tarihi: Haziran - 2024

**ACTA AQUATICA TURCICA**  
**E-ISSN: 2651-5474**  
**(YIL: 2024 – CİLT: 20– SAYI: 2)**

**YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD\***

Altan LÖK	Ege University, TÜRKİYE
Doru Stelian BĂNĂDUC	Lucian Blaga” University of Sibiu, ROMANIA
Ercüment GENÇ	Ankara University, TÜRKİYE
Erdoğan ÇİÇEK	Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, TÜRKİYE
Erik JEPPESEN	Aarhus University, DENMARK
Eugenia BEZİRTZOGLU	Democritus University of Thrace, GREECE
Hamid Reza ESMAEILI	Shiraz University IRAN
Karim ERZINI	University of Algarve, PORTUGAL
Magdolna Müllerne TRENOVSZKI	Szent Istvan University, HUNGARY
Özkan ÖZDEN	İstanbul University, TÜRKİYE
Pavel KOZAK	University of South Bohemia, CZECHIA
Stamatis ZOGARİS	Hellenic Centre for Marine Reseaech, GREECE
Stefan BERGLEITER	Naturland, GERMANY
Süheyla KARATAŞ STEINUM	İstanbul University, TÜRKİYE
Tom WİKLUND	Åbo Akademi University, FINLAND
Viladimir PESIC	University of Montenegro, MONTENEGRO
Yazdan KEIVANY	Isfahan University of Technology, IRAN
Laith A. JAWAD	Unitec Institute of Technology, NEW ZELAND

\* Liste akademik unvan ve isme göre alfabetik sırayla hazırlanmıştır.

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

### **ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES:**

Kültür ortamında yetiştiriciliği yapılan tatlısu istakozu ( <i>Pontastacus leptodactylus</i> , Eschscholtz, 1823) 'nda hareketli <i>Aeromonas</i> Septisemi ve histopatolojik bulgular <b>Şeydanur Kan, Pınar Yıldırım, Özlem Özmen, Seval Bahadır Koca, Ayşegül Kubilay.....</b>	<b>089-096</b>
Evaluation of gastropods as biomaterials: <i>Monodonta turbinata</i> (Born, 1780) <b>Erkan Uğurlu .....</b>	<b>097-107</b>
Assessment of Büyük Menderes River (West of the Türkiye) surface water quality with water quality index (WQI), comprehensive pollution index (CPI) and geographic information systems (GIS) <b>Nigar Zeynalova, Ahmet Demirak, Mustafa Döndü, Feyyaz Keskin.....</b>	<b>108-127</b>
Effects of inactivated <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , and Poly I:C on mRNA expression levels of CXCL-10 and CXCL-9 gene in Japanese flounder <b>Ergi Bahrioğlu, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono.....</b>	<b>128-139</b>
Optimization of collagen isolation from Carp ( <i>Carasobarbus luteus</i> ) scales using response surface methodology <b>Ümran Cansu.....</b>	<b>140-150</b>
<b><i>DERLEME / REVIEW:</i></b>	
Paraziter Balık Zoonozları <b>Ahmet Erdem Dönmez.....</b>	<b>151-167</b>
Türkiye Denizlerinde Önerilen Açık Deniz Koruma Alanları <b>Ertan Karahanlı.....</b>	<b>168-181</b>

## Kültür Ortamında Yetiştiriciliği Yapılan Tatlısu Istakozu (*Pontastacus leptodactylus*, Eschscholtz, 1823)'nda Hareketli *Aeromonas* Septisemi ve Histopatolojik Bulgular

### Aeromonas Septicemia Infection and Histopathologic Findings in Cultured Narrow-Clawed Crayfish (*Pontastacus leptodactylus*, Eschscholtz, 1823)

Şeydanur Kan<sup>1,\*</sup>, Pınar Yıldırım<sup>1</sup>, Özlem Özmen<sup>2</sup>, Seval Bahadır Koca<sup>1</sup>, Ayşegül Kubilay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Burdur-TÜRKİYE

\*Sorumlu Yazar: [seydanurmutlu@isparta.edu.tr](mailto:seydanurmutlu@isparta.edu.tr)

Geliş: 18.05.2023

Kabul: 07.08.2023

Yayın: 01.06.2024

**Alıntılama:** Kan, Ş., Yıldırım, P., Özmen, Ö., Bahadır Koca, S., & Kubilay, A. (2024). Kültür ortamında yetiştiriciliği yapılan tatlısu istakozu (*Pontastacus leptodactylus*, Eschscholtz, 1823) 'nda hareketli *Aeromonas* Septisemi ve histopatolojik bulgular. *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 089-096. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1298890>

**Özet:** Bu çalışmada yetiştiriciliği yapılan kerevitlerde (*Pontastacus leptodactylus*) hastalık belirtileri gösteren 15 adet bireyde bakteriyel, paraziter ve fungal incelemeler yapılmış; patolojik incelemeler için iç organlardan örnek alınmıştır. İncelemeler neticesinde paraziter ve fungal patojene rastlanılmamıştır. Kerevitlerin hepatopankreasından Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine yapılan bakteriyolojik ekimden saf bakteri kolonisi izole edilmiştir. Yapılan testler sonucunda bakterinin *Aeromonas* sp. cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Kerevitlerde hastalık çıktıktan sonraki 21 gün içinde %100 ölüm görülmüştür. Histopatolojik olarak; hepatopankreas ve bağırsak dokularında belirgin değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Hepatopankreatik dokuda; epitellerde belirgin vakuolizasyon, tübüllerde düzensizlik, epitel hücrelerinde proliferasyon, nükleer piknoz ve inflamatuvar hücre infiltrasyonları ile karakterize edilen belirgin patolojik bulgular tespit edilmiştir. Bu çalışmanın bulguları *Aeromonas* sp.'nin kerevitlerde önemli patolojik bulgular oluşturduğunu göstermiştir.

**Abstract:** In this study, bacterial, parasitic, and fungal analyses were carried out on 15 individuals showing disease symptoms in crayfish (*Pontastacus leptodactylus*). Samples were collected from internal organs for pathological examinations. As a result of the pathological examinations, no parasitic and fungal pathogens agents were found. Samplings were gathered from the hepatopancreas and streaked onto tryptic soy agar (TSA) 96 and consequently, a pure bacterial colony was obtained. As a result of the bacterial tests, the bacteria were determined to be *Aeromonas* sp. genus. Narrow-clawed crayfish showed 100% mortality within 21 days of disease outbreak. Histopathologically, significant changes were observed in hepatopancreas and intestinal tissues. In hepatopankreatic tissue, prominent pathological findings characterized by prominent vacuolization in the epithelium, irregular tubules, proliferation of epithelial cells, nuclear pycnosis, and inflammatory cell infiltrations were detected. The findings of this study demonstrated that *Aeromonas* sp. caused important pathological findings in narrow-clawed crayfish.

#### Anahtar kelimeler

- *Aeromonas* sp.
- Kerevit
- Enfeksiyon
- Histopatoloji

#### Keywords

- *Aeromonas* sp.
- Narrow-Clawed Crayfish
- Infection
- Histopathology

## 1. GİRİŞ

Tatlı su istakozu (kerevit) Crustacea sınıfı, Decapoda, on bacaklı takımına aittir. Bilinen dört familyası vardır: Astacidae, Cambaridae, Cambaroididae ve Parastacidae (Crandall & Grave 2017). Astacidae familyasına ait olan *Pontastacus leptodactylus* Türkiye, Ukrayna, Güneybatı Rusya, İran, Kazakistan, Belarus, bir çok Avrupa Ülkesi ve Amerika da dağılım göstermektedir (Skurdal & Taugbøl, 2002; Dobrzycka-Krahel & Fidalgo 2023).



Ekonomik bir tür olan kerevitin avcılık ve çok az miktarda yetiştiricilik yoluyla üretimi yapılmaktadır. *P. leptodactylus* türünün dünya yetiştiricilik üretimi 2019 yılında 42 ton olup 35 tonunu İran, 7 tonunu Bulgaristan üretmektedir (FAO, 2023). Türkiye’ de *P.leptodactylus*’un yetiştiricilik yoluyla ticari üretimi bulunmamaktadır. 2021 yılı avcılık yoluyla üretimi ise 1.011 tondur (TÜİK, 2023). Avcılık yoluyla üretim 1984 yılında 8000 tonlardayken, Türkiye’ de görülen kerevit vebası nedeniyle üretim hızla düşmüştür. Aradan geçen 39 yıla rağmen eski üretim verilerine hala ulaşamamıştır. Bu üretim verileri Türkiye’ de kerevit avcılığı yapılan alanlarda hastalığın etkisinin hala devam ettiğini göstermektedir. Kerevit popülasyonlarındaki azalma nedeniyle bu türün yetiştiriciliği önem kazanmıştır. Üniversitelerde ve enstitülerde yetiştiricilik problemlerine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte, kültür ortamında bazı patojenlerle karşılaşmaktadır. Kerevitlerin istilacı patojenlerle savaşması, esas olarak hücrel ve hümorale bağışıklık da dahil olmak üzere sadece doğuştan gelen bağışıklık sistemine bağlıdır (Loker vd., 2004; Cerenius & Söderhäll, 2018). Bu nedenle kerevitlerin patojenlerle mücadelesi oldukça zordur.

Aeromonas türü bakteriler oksidaz pozitif, fakültatif, Gram-negatif bakterilerdir (Holt, 1977). *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, *A. veronii* ve *A. sobria* dahil olmak üzere su ekosistemlerinde (göller, nehirler, kıyı suları, sediment gibi) yaygın olarak bulunmaktadır (Michael & Duffey, 1988; Palu vd., 2006; Austin & Austin, 2012). Balık (Li vd., 2013), kerevit (Jiravanichpaisal vd., 2009; Hayakijkosol vd., 2017), karides (Halder vd., 2014), yengeçler (Sun vd., 2013) vb. gibi çok sayıda sucul türlerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hareketli Aeromonas türü bakteriler tarafından üretilen ekstrasellüler enzimler Aeromonasların virulensi ve patojenitesi açısından önemli olup akuatik canlılarda yüksek mortaliteye sebep olabilmektedir (Farmer vd., 2006; Cascón vd., 2000; Tomás, 2012; Rasmussen-Ivey vd., 2016; Özdemir & Arslan, 2021 )

Tatlı su istakozlarında potansiyel patojenik virüsler, bakteriler, mantarlar üzerine yapılan bir çok çalışma mevcuttur (Maestracci & Vey, 1988; Chinain & Vey 1988; Diler & Bolat, 2001; Corbel vd., 2001; Jiravanichpaisal vd., 2009; Dragičević vd., 2020). Avsever vd., 2011 tatlı su istakozunda (*P. leptodactylus*) *Saprolegnia* ve *A. hydrophila* ko-enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda, Yuan vd., (2021) *Procambarus clarkii* türünde beyaz benek sendromu virusu (White spot syndrome, WSSV) ve *A.veronii* ko-enfeksiyonunu bildirmişlerdir. Jiravanichpaisal vd., (2009), yapmış oldukları bir çalışmada tatlı su kereviti *Pacifastacus leniusculus*'un hemolimften *A. hydrophila* izole etmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak kültürü yapılan kerevitlerde yüksek mortaliteye sebep olan akut hareketli Aeromonas enfeksiyonunun kerevitlerde oluşturduğu histopatolojik bulguların incelenmesidir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Bakteriyel izolasyon ve identifikasyonu

Hastalık bulguları, menşei Eğirdir Gölü olan ve Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesinde 3 ay boyunca günde 1 kez canlı vücut ağırlıklarının %3’ü oranında beslenmekte olan kerevitlerde gözlenmiştir. Kerevitler bu süreçte haftada 2 kez sifonlanan, 21±1 °C su sıcaklığına sahip, 1m<sup>3</sup> hacimli tank içerisinde 80 adet olarak stoklanmışlardır. Kerevitlerin ortalama boyları 7,67±0,40 cm ve ağırlıkları 12,15±1.50g olarak ölçülmüştür

Kerevitlerde ölümler görülünce rastgele seçilen 15 adet kerevit örneği steril kaplara alınmış ve laboratuvar ortamına aseptik koşullarda taşınmıştır. Kerevitlerin her birinin hepatopankreasından Triptik Soy Agar (TSA) (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. Aynı zamanda kerevitlerin paraziter ve fungal incelemeleri solunga, kabuk ve iç organlarından ezme preparat hazırlanarak ışık mikroskopunda incelenerek yapılmıştır. Ekim yapılan besiyeri 24°C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda saf koloni varlığı gözlemlenmiştir. Bakteri cinsinin tanımlanması için; Gram boyama, bakterilerin şekli ve boyutu, hareketi, oksidaz ve katalaz aktiviteleri, O/F (Merck) testi yapılmıştır (OIE, 2003; Buller, 2004; Austin & Austin, 2012).

### 2.2. Histopatolojik yöntem

Ölü kerevitlerden hepatopankreas ve bağırsak dokuları alınarak %10 formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. İki günlük fikzasyonun ardından doku örnekleri tam otomatik bir doku takip cihazı (Leica

ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile yapılan rutin takip işleminin ardından parafine gömme işlemi gerçekleştirilmiştir. Parafin bloklarından tam otomatik mikrotom (Leica RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile 5µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bir gece kurutmanın ardından kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Kerevitlerde morfolojik ve klinik bulgular

Hastalıklı kerevitlerde günlük yem tüketimi takibinde iştahsızlık ve yem alımında azalma gözlemlenmiştir. Verilen günlük yemlerin çoğunun tüketilmediği görülmüştür. Deneysel olarak kültürü yapılan kerevitlerde bulguların başlamasının ardından 21 gün içinde %100 ölüm oranı gözlenmiştir.

Kerevitlerin dış kabuklarında herhangi bir lezyon veya renk değişimi gözlenmemiş (Şekil 1), nekropsi yapılan kerevitlerde viseral organlarda herhangi bir semptomla rastlanmamıştır. Aynı zamanda kerevitlerin solungaç ve kabuklarından yaş preparatlar hazırlanarak paraziter ve fungal incelemeler de yapılmış fakat herhangi bir patojen tespit edilmemiştir.



Şekil 1. İnceleme yapılan kerevit.

#### 3.2. Bakteri identifikasyonu

Yapılan bakteriyolojik ekimlerde üremiş olan saf bakteri kolonisinden; biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik özellikleri sonucunda bakterinin *Aeromonas* sp. cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

İzole edilen bakteri kolonilerinin krem rengi, yuvarlak ve saf olduğu görülmüştür. Gram boyamada pembe renkli kısa çubuklar gözlenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1. *Aeromonas* sp.nin fenotipik özellikleri

	<i>Aeromonas</i> sp.
Koloni yapısı	Krem rengi, yuvarlak, hafif kabarık koloniler
Sitokrom oksidaz	+
Katalaz	+
Hareket	+
Gram boyama	-
O/F	Fementatif
Vibriostat O/129	Dirençli

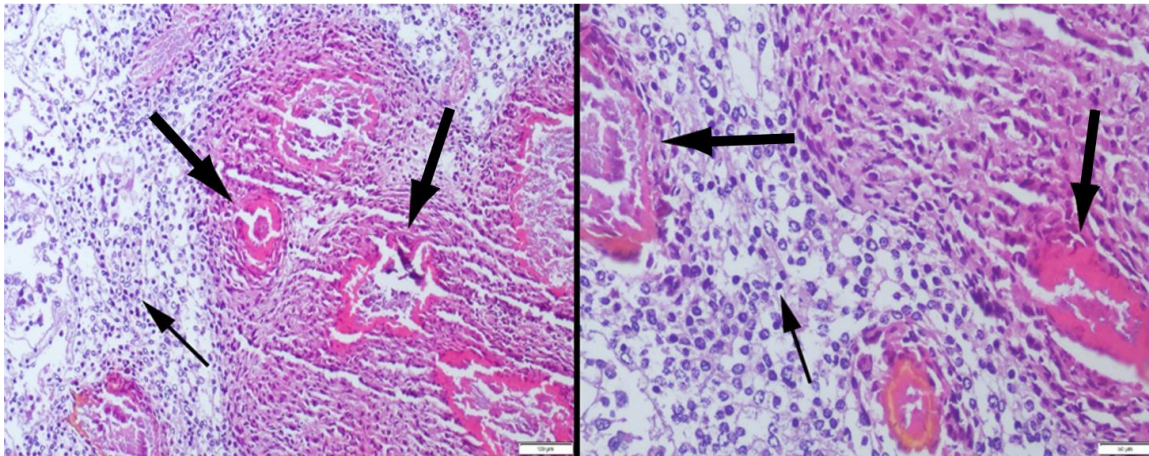




Şekil 2. İzole edilen bakteri kolonisinin yapısı ve mikroskopta Gram boyama görüntüsü (100x).

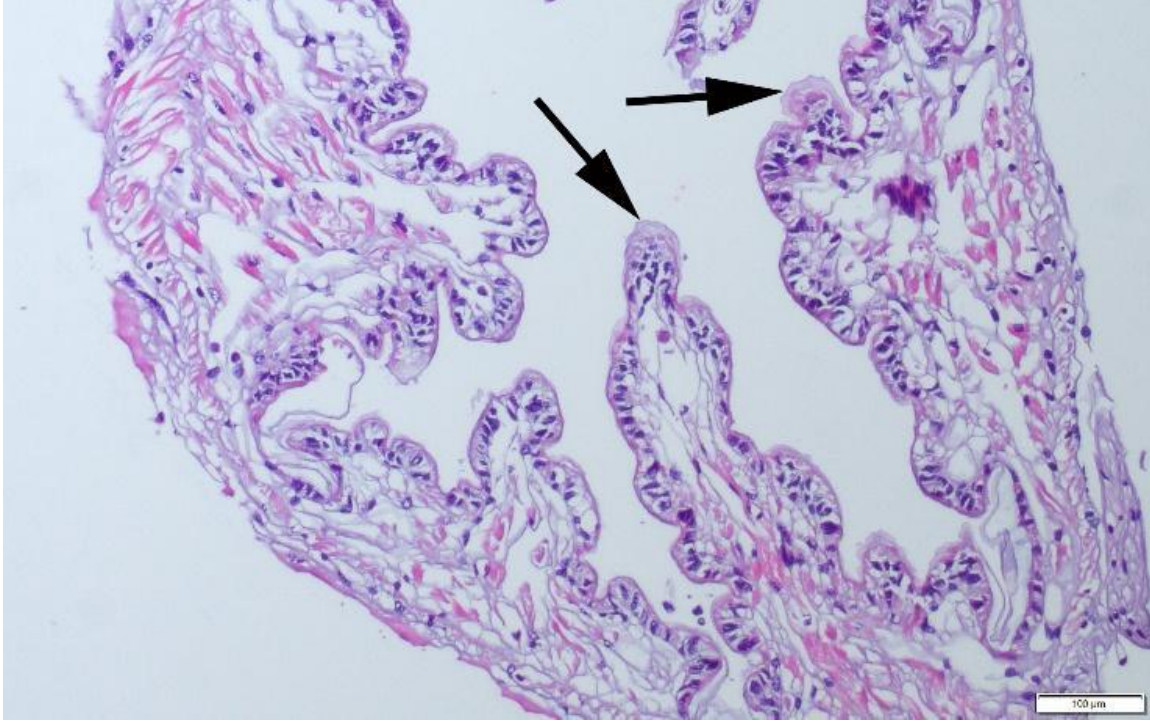
### 3.3. Hepatopankreas ve bağırsak histopatolojisi

Hepatopankreas ve bağırsakların histopatolojik incelemesinde belirgin değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir. Hepatopankreas epitelinde belirgin vakuolizasyon, tübüllerde düzensizleşme, epitel hücrelerinde proliferasyon, nükleer piknoz ve enflamatuar hücre infiltrasyonları ile karakterize edilen belirgin lezyonlar gözlemlenmiştir. Bağırsak, epitel hücrelerinde çok sayıda nekrotik hücre ve belirgin vakuolar dejenerasyon ile karakterize bulgular gözlemlenmiştir (Şekil 3,4).



Şekil 3. Hepatopankreasın histopatolojik görünümü. Bir kerevitte merkezi nekroz (kalın oklar) ve şiddetli enflamatuar hücre infiltrasyonları (ince oklar) ile karakterize çok sayıda granüloamatöz lezyon, HE, Barlar= 100µm (sol resim) ve 50µm (Sağ resim).





**Şekil 4.** Bağırsak histopatolojik görünümü. Epitel hücrelerde çok sayıda nekrotik hücre (oklar). HE, Bar= 100µm.

#### 4. TARTIŞMA

Ekonomik bir tür olan kerevitin üretimini sınırlayan faktörlerin başında hastalık problemleri yer almaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada kültür ortamındaki kerevitlerde tespit edilen *Aeromonas* sp. akut ve % 100 ölüme sebep olmuştur. 21 gün içinde tankta bulunan bütün kerevitlerin öldüğü gözlemlenmiştir. *A. hydrophila* ile yapılan çalışmalarda, bu bakterinin doğal ortamdaki kerevitlerin mikro floranın bir parçası olduğu bildirilmektedir (Khalil vd., 2009; Raissy vd., 2014). Avsever vd., (2011) İznik Gölü'nden avladıkları kerevitlerin hemolenfinde *A. hydrophila* tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada *A. hydrophila* ile Saprolegnia ko-enfeksiyonu gördüklerini bildirmişlerdir. Yuan vd., (2021) *Procambarus clarkii* türünde *A. veronii* ve beyaz benek sendromu virusu (White spot syndrome, WSSV) ko-enfeksiyonu bildirmişlerdir.

Salighehzadeh vd., (2019) Haft Baram Gölü'nden (Güney İran, Fars eyaleti) hastalık belirtileri gösteren kerevitlerden, *A. Leptodactylus*, *A. hydrophila* ve *Fusarium solani* ko-enfeksiyonu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada kerevitlerde *Aeromonas* sp. tespit edilmiş olup herhangi bir paraziter veya fungal enfeksiyon bulgusuna rastlanılmamıştır. Bununla deneysel amaçlı tam kontrollü yetiştiricilik şartlarının uygulanmasından dolayı fungal ve paraziter enfeksiyona rastlanmadığı düşünülmektedir.

Raissy vd., (2014) İran Aras Baraj Gölü'ndeki *Astacus leptodactylus* türünün kaslarında da *A. hydrophila* izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda *Aeromonas* sp. hepatopankreastan izole edilmiştir.

*Aeromonas* türlerinin kerevitlerde yüksek ölüm oranlarına neden olduğu bildirilmektedir. Hayakijkosol vd., (2017) *A. hydrophila*'nın II. evre *Cherax quadricarinatus* larvalarında yüksek ölüm oranlarına neden olduğunu ve *A. hydrophila*'nın penisilin, kloramfenikol/florfenikol ve tilmikozine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Jiravanichpaisal vd., (2009) da *Pacifastacus leniusculus* bireylerine  $1.24 \times 10^7$  CFU/mL 200 µL enjeksiyon yoluyla verdiklerinde *A. hydrophila*'nın 6 saat içinde % 100 mortaliteye yol açtığını bildirmişlerdir. Ayrıca farklı sıcaklık uygulamalarında 4°C'de tüm kerevitlerin hayatta kaldığını, bununla birlikte 20°C'de bireylerin hızla öldüğünü belirtmişlerdir. Balıklarda da *Aeromonas* türlerinin yüksek oranlarda ölümler yaptığı rapor edilmiştir. Raj vd., (2019) da *A. veronii* izolatının nil tilapialarında 120 saat içinde balıkların %100'ünü öldürdüğünü belirtmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da kerevitlerde hastalık çıktıktan sonraki 21 gün içinde %100 ölüm görülmüştür.

İncelenen hasta kerevitlerin hepatopankreatik dokularında, epitelde belirgin vakuolizasyon, tübüllerde düzensizlik, epitel hücrelerinde proliferasyon, nükleer piknoz ve enflamatuar hücre infiltrasyonları tespit edilmiştir. Bağırsaklarda hücre dejenerasyonunda önemli vaskulizasyon ve anormal sıralı epitel hücreleri belirlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızın patolojik çalışmalarının sonuçlarına benzer olarak, SamCookiyaei vd., (2012) de *A. hydrophila* maruz bırakılan kerevitlerin hepatopankreas ve solungaç kesitlerinde hemosit agregasyonu ve nükleus piknozu içinde nekroz olduğunu belirlemişlerdir. Yuan vd., (2021) ve Zhu vd., (2021) de *A. veronii* ile enfekte kerevitlerin *Procamburus clarkii* hepatopankreasında epitel vakuolizasyonu ve hücre parçalanması, barsakta hücrelerin vakuolizasyonunu kütikulanın dejenerasyonunu, düzensiz şekilli ve anormal şekilde düzenlenmiş epitel hücreleri gözlemlemişlerdir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçlarına göre *Aeromonas* sp., *P.leptodactylus* türünde dış morfoloji olarak hızlı bir belirti göstermeden akut ve % 100 oranında ölümlere aynı zamanda hepatopankreas ve bağırsakta da olumsuz patolojik bulgulara sebep olmaktadır.

Sonuç olarak aeromonas türleri akuatik canlılarda florada doğal olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir. Yetiştiricilik şartlarında stres ve optimum koşullardaki değişikliklere bağlı olarak hastalığa sebep olmaktadır. *Aeromonas* enfeksiyonlarında bakterinin ekstrasellüler enzimlerinden dolayı akuakültürde kitle halinde ölümlere sebep olmaktadır. Bu nedenle söz konusu patojenin oluşturabileceği hastalık problemlerinin önlenmesi için profilaktif önlemlerin alınması önem arz etmektedir.

## FİNANS

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan eder.

## YAZAR KATKILARI

Çalışma kurgusu: SBK; Literatür taraması: ŞK, PY, SBK, AK; Metodoloji: ŞK, PY, AK; Deneyin gerçekleştirilmesi: ŞK, PY, ÖÖ, SBK, AK; Veri analizi: ŞK, PY, ÖÖ, SBK, AK; Makale yazımı: ŞK, PY, ÖÖ, SBK, AK; Denetleme: AK. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

## ETİK ONAY BEYANI

Bu çalışmada tatlı su istakozu kullanılması nedeniyle Yerel Etik Kurul Onayına gerek duyulmamıştır.

## VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan verilere birinci yazardan talep üzerine erişilebilir. Veriler, gizlilik veya etik kısıtlamalar nedeniyle kamuya açık değildir.

## KAYNAKÇA

- Austin, B., & Austin, D. A. (2012). *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 5th ed. Springer.
- Avsever, M. L., Hilmioğlu Polat, S., Türk, N., & Metin, D. Y. (2011). Tatlı su istakozlarından (*Astacus leptodactylus*) *Saprolegnia* sp. ve *Aeromonas hydrophila* izolasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 17(5), 873-875. <https://doi.org/10.9775/Kvfd.2011.4714>
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. <https://doi.org/10.1079/9780851997384.0000>
- Cascón, A., Fregeneda, J., Aller, M., Yugueros, J., Temprano, A., Hernanz, C., Sánchez, M., Rodríguez-Aparicio, L., & Naharro, G. (2000). Cloning, characterization, and insertional

- inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 23(1), 49–59. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00206.x>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2018). Crayfish immunity – Recent findings. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.010>
- Chinain, M., & Vey, A. (1988). Experimental study of *Fusarium solani*: Infections in *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea, Decapoda). *Diseases of Aquatic Organisms*, 5, 215–223. <https://doi.org/10.3354/dao005215>
- Corbel, V., Zuprizal, Z., Shi, C., Huang, Sumartono, Arcier, J.-M., & Bonami, J.-R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases*, 24(7), 377–382. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00302.x>
- Crandall, K. A., & De Grave, S. (2017). An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology*, 37(5), 615–653. <https://doi.org/10.1093/jcobiol/rux070>
- Diler, O., & Bolat, Y. (2001). Isolation of *Acremonium* species from crayfish, *Astacus leptodactylus* in Egirdir Lake. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 21(4), 164–168.
- Dobrzycka-Krahel, A., & Fidalgo, M. L. (2023). Euryhalinity and Geographical Origin Aid Global Alien Crayfish Invasions. *Water*, 15(3), 569. <https://doi.org/10.3390/w15030569>
- Dragičević, P., Bielen, A., Petrić, I., & Hudina, S. (2020). Microbial pathogens of freshwater crayfish: A critical review and systematization of the existing data with directions for future research. *Journal of Fish Diseases*, 44(3), 221–247. <https://doi.org/10.1111/jfd.13314>
- Farmer, J. J., Arduino, M. J., & Hickman-Brenner, F. W. (2006). The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt, (Eds). *The Prokaryotes* (pp. 564–596). Springer. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x\\_19](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_19)
- Halder, S. K., Maity, C., Jana, A., Ghosh, K., Das, A., Paul, T., Mohapatra, P. K. D., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2014). Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.011>
- Hayakijkosol, O., Owens, L., & Picard, J. (2017). Case report of bacterial infections in a redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) hatchery. *Aquaculture*, 475, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.038>
- Holt, J. G. (1977). *The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co.
- Jiravanichpaisal, P., Roos, S., Edsman, L., Liu, H., & Söderhäll, K. (2009). A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(1), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.02.002>
- Khalil, R. H., El-Banna, S. A., & Mahfouz, N. B. (2009). Study on micro flora of wild freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*). In *Proceedings of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center, 24-26 October 2009* (pp. 257–261). Massive Conferences and Trade Fairs.
- Li, C., Wang, R., Su, B., Luo, Y., Terhune, J., Beck, B., & Peatman, E. (2013). Evasion of mucosal defenses during *Aeromonas hydrophila* infection of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(4), 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.11.009>
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S.-M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198(1), 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
- Maestracci, V., & Vey, A. (1988). Fungal infection of gills in crayfish: Histological, cytological and physiopathological aspects of the disease. *Freshwater Crayfish*, 7, 187–194. <https://doi.org/10.5869/fc.1988.v7.187>

- Michael, J. J., & Duffey, P. S. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: Current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 980–997
- OIE (Office International des Epizooties). (2003). *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 4th ed. Office International des Epizooties.
- Özdemir, F., & Arslan, S. (2021). Balıktan İzole Edilen Hareketli Aeromonas Türlerinin Bazı Ekstrasellüler Enzimlerinin Belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 2(1), 13-23.
- Raissy, M., Khamesipour, F., Rahimi, E., & Khodadoostan, A. (2014). Occurrence of *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in crayfish (*Astacus leptodactylus*) from Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(4), 944-954.
- Rasmussen-Ivey, C. R., Figueras, M. J., McGarey, D., & Liles, M. R. (2016). Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>
- Raj, N. S., Swaminathan, T. R., Dharmaratnam, A., Raja, S. A., Ramraj, D., Lal, K. K., (2019). *Aeromonas veronii* caused bilateral exophthalmia and mass mortality in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in India. *Aquaculture* 512, 734278. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734278>
- Palu, A. P., Gomes, L. M., Miguel, M., Balassiano, I. T., Queiroz, M., Freitas-Almeida, A. C., & Oliveira, S. (2006). Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*, 23, 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.07.002>
- Salighehzadeh, R., Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Khalafian, M., Gholamhosseini, A., & Soltanian, S. (2019). Molecular and clinical evidence of *Aeromonas hydrophila* and *Fusarium solani* co-infection in narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 132(2), 135–141. <https://doi.org/10.3354/dao03309>
- SamCookiyaei, A., Afsharnasab, M., Razavilar, V., Motalebi, A. A., Kakoolaki, S., Asadpor, Y., Yahyazade, M. Y., & Nekuie Fard, A. (2012). Experimentally pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* in freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*) in iran. *Iranian journal of fisheries sciences*, 11(3), 644-656.
- Sun, S., Qin, J., Yu, N., Ge, X., Jiang, H., & Chen, L. (2013). Effect of dietary copper on the growth performance, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1195–1201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.021>
- Tomás, J. M. (2012). The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *ISRN Microbiology*, 2012, 256261. <https://doi.org/10.5402/2012/256261>
- Yuan, G., Zhu, L., Jiang, X., Zhang, J., Pei, C., Zhao, X., Li, L., & Kong, X. (2021). Diagnosis of co-infection with white spot syndrome virus and *Aeromonas veronii* in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, 532, 736010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736010>
-



## Evaluation of Gastropods as Biomaterials: *Monodonta turbinata* (Born, 1780)

Gastropodların Biyomalzeme Olarak Değerlendirilmesi: *Monodonta turbinata* (Born, 1780)

Erkan Uğurlu<sup>1,\*</sup> 

İskenderun Technical University, Faculty of Marine Science and Technology, İskenderun, Hatay-TÜRKİYE

\*Corresponding Author: [erkn.ugurlu@yahoo.com](mailto:erkn.ugurlu@yahoo.com)

Received: 23.05.2023

Accepted: 14.11.2023

Published: 01.06.2024

**How to Cite:** Uğurlu, E. (2024). Evaluation of gastropods as biomaterials: *Monodonta turbinata* (Born, 1780). *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 097-107. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1301286>

**Abstract:** *Monodonta turbinata* is a densely populated species along the coasts of İskenderun Bay, Mediterranean Sea. The shells of *M. turbinata* contain a high amount of chitin for the chitosan production. The goal of this research is to produce chitin and chitosan from *M. turbinata* shells and characterize them using X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques. In addition, the samples were analyzed for solubility and deacetylation degree. The yields of chitin and chitosan obtained from *M. turbinata* were calculated as 60.26±0.96% and 80±1.29%, respectively. FTIR spectrum analysis results revealed the existence of functional groups in various bands and confirmed that the samples were chitin and chitosan. As a result of the FTIR, the deacetylation degree (DD) value was established to be 84.83%. The crystalline index (CrI) of chitin obtained from shells was computed as 54.92%. SEM analysis results displayed the morphological differences between chitin and chitosan biopolymers. The results indicate that *M. turbinata* shells, a waste product from İskenderun Bay, hold promise as a chitin and chitosan source for various applications in Türkiye.

### Keywords

- Gastropods
- Biomaterial
- Polymer
- Chitin
- Chitosan

**Özet:** *Monodonta turbinata*, İskenderun Körfezi kıyılarında yoğun olarak bulunan bir türdür. Bu türler, kitosana dönüştürülebilir yüksek miktarda kitin içerir. Bu araştırmanın amacı, *M. turbinata* kabuklarından kitin ve kitosan elde etmek ve X-ışını kırınımı (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) teknikleri kullanarak karakterize etmektir. Ayrıca asitteki çözünürlüğü ve deasetilasyon dereceleri de belirlenmiştir. *M. turbinata* kabuklarından elde edilen kitin ve kitosan verimleri sırasıyla %60,26±0,96 ve %80±1,29 olarak hesaplanmıştır. FTIR spektrum analizi sonuçları farklı bantlarda fonksiyonel grupların varlığını göstermiş ve örneklerin kitin ve kitosan olduğunu doğrulamıştır. FTIR analizi kullanılarak DD değeri %84,83 olarak bulunmuştur. Kabuklardan elde edilen kitinin kristal indeksi (CrI) %54,92 olarak hesaplanmıştır. SEM analiz sonuçları, kitin ve kitosan biyopolimerleri arasındaki morfolojik farklılıklarını ortaya koymuştur. İskenderun Körfezi'nde yoğun bir popülasyona sahip *M. turbinata* kabuk atığının, Türkiye'deki çeşitli uygulamalar için umut verici bir kitin ve kitosan kaynağı olduğunu göstermektedir.

### Anahtar kelimeler

- Gastropod
- Biyomateryal
- Polimer
- Kitin
- Kitosan

## 1. INTRODUCTION

Natural products that play important roles in the regulation of biological systems are known as secondary bioactive metabolites. The marine area is rich in natural products with unrivaled effectiveness. Marine animals are composed of bioactive molecules with extraordinary properties due



to the unique properties of the marine environment (Soltani et al., 2015). In recent years, it is known that the oceans are a rich and sufficient source of natural products (Dhinakaran et al., 2012).

Chitin polymer, which is a structural amino polysaccharide, is the most abundant in the world after cellulose and has a fibrous structure. The sources of chitin are the exoskeleton of crustaceans such as shrimp, crabs and lobsters. Chitin was first described in 1884 and has been reported to have a poly ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine) structure (Rinaudo, 2006). The chitin biopolymer has remarkable properties (biodegradability, nontoxicity, biocompatibility, etc.). In addition, this biopolymer is used in pharmaceutical, medical and industrial fields (Yadav et al., 2015). Chitosan is formed as a result of advanced deacetylation of chitin and is the most important derivative of chitin. Chitosan is a weak base and is insoluble in water, but soluble in acidic aqueous solutions. It is mainly evaluated by its molecular weight (MW) and degree of acetylation (DA) (Younes & Rinaudo, 2015). The amine groups in the structure of chitosan have an important advantage in terms of affecting various biological activities.

In recent years, various studies have been carried out on chitin and chitosan. Researchers emphasize obtaining chitin biopolymers from natural sources. There are chemical, biological and thermal methods to obtain chitosan from naturally sourced chitin (Kumari et al., 2015; El Knidri et al., 2018; Kaczmarek et al., 2019; Zainol Abidin et al., 2020). The fact that chitosan biopolymers are biodegradable, biocompatible and non-toxic has attracted a lot of attention in many industries such as cosmetic health, agriculture, food, paper, and wide application areas (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003).

Individuals of *Monodonta turbinata* (Born, 1780) (Gastropoda, Prosobranchia, Trochidae) are marine gastropod mollusks. They are distributed in all coastal areas of the Mediterranean and can be easily found all year round. *M. turbinata* lives in the rocky areas of the tidal zone. It can survive out of the water for several hours and tolerate high temperatures. This species eats algae residue scraped from rocks. *Monodonta* is distributed in the Mediterranean and Western Atlantic, from Portugal to Morocco and the Canary Islands.

Gastropods form the dominant group of molluscs on the coast of İskenderun Bay in the Northeast Mediterranean (Bakır et al., 2012). Most of the studies on *M. turbinata*, which has a dense population on the coasts of İskenderun Bay, were limited to the biology, heavy metal accumulation, nutrition and biomonitoring of this species, and no studies on biomaterial production such as chitin and chitosan were encountered. It is very significant that the species to be used as biomaterials are sustainable, easily available and abundant.

In this study, it was aimed to extract chitin and chitosan from *M. turbinata*, one of the most abundant examples of gastropods in the İskenderun Bay. In addition to the extensive application areas of chitin and chitosan in many industrial areas, this species has not been economically evaluated. In this context, chitin and chitosan were produced from *M. turbinata* shells. Yield, deacetylation degree, solubility, X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses of chitin and chitosan biopolymers were performed.

## 2. MATERIALS and METHOD

### 2.1. Materials

In the present study, *M. turbinata* was randomly collected from the coastal region of İskenderun (36.58968° N, 36.14690° E) at the Northeast Mediterranean coast in April 2023 (Figure 1). Sampling was done manually with a pocket knife, and a total of 50 samples were collected. The *M. turbinata* species were quickly taken to the lab in a box (Figure 1). The soft tissues of *M. turbinata* were removed, washed with plenty of water and the shells were dried in an oven at 60 °C. The dried shells were weighed and then pulverized using a grinder. Approximately 200 g of dry *M. turbinata* shell was used (Alabaraoye et al., 2018).



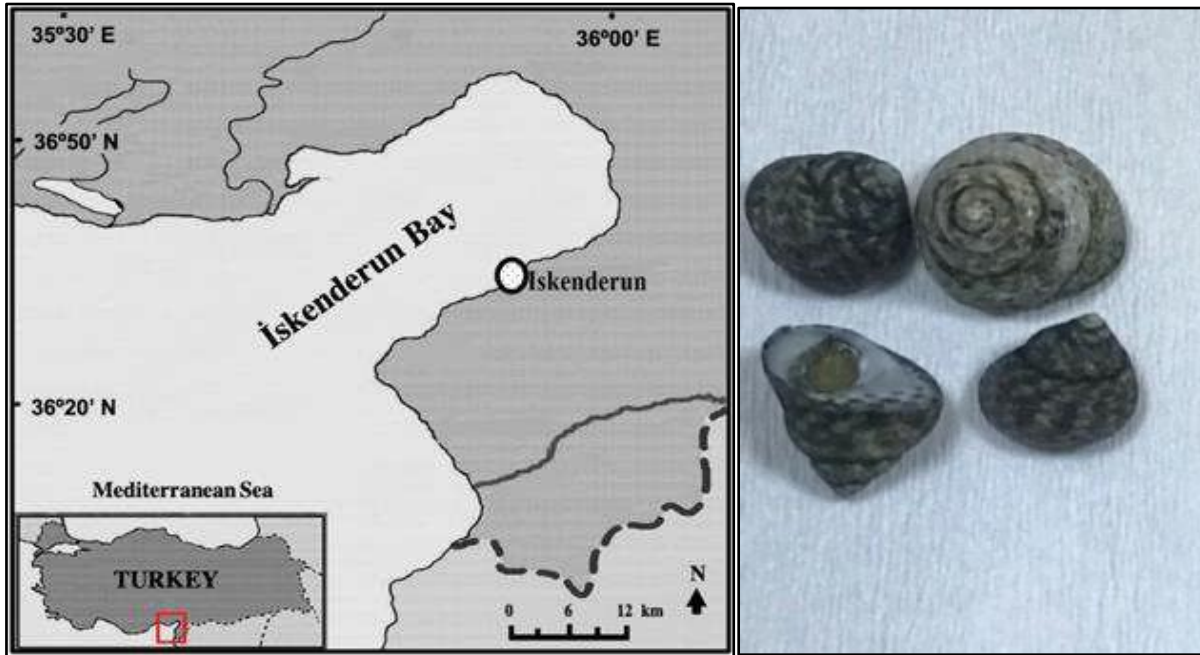


Figure 1. Study area (Anonymous, 2023; GM, 2023) and *M. turbinata*.

## 2.2. Extraction

The demineralization was stirred at 500 rpm for 6 hours using 1M HCl at a ratio of 1:10 (w/v) at ambient temperature. The obtained shell powder was washed to neutralize under running water. Finally, the shell powder was collected and washed using distilled water and dried at 50 °C for 18 hours. Deproteinization was mixed at 500 rpm by adding 1M NaOH at a ratio of 1:10 (w/v) followed by heating at 70 °C for 18 hours. The shell powder was neutralized by washing under the water. The shell powders were gathered and washed again with distilled water. Finally, the shell powders were dried in an oven for 18 hours, then weighed and placed in polyethylene tubes. The resulting shell powder is chitin. Then, the chitin was deacetylated with 50% NaOH at a ratio of 1:10 (w/v) at 100 °C for 4 hours at 500 rpm (Al Sagheer et al., 2009; Marei et al., 2016). The resulting deacetylated solid was filtered, gathered, and washed using distilled water. Finally, the chitosan was dried in an oven for 18 hours, then weighed and placed in polyethylene tubes.

## 2.3. Yields

The yields of the chitin and chitosan obtained from the powders were calculated by correlating the weights of the raw bark powders with the weights of chitin and chitosan taken later. The chitin and chitosan yields were calculated as described by Luo et al. (2019).

$$Y_{Chitin} = \frac{W_{chitin}}{W_{Raw\ shell}} \times 100 \quad (1)$$

$$Y_{Chitosan} = \frac{W_{Chitosan}}{W_{chitin}} \times 100 \quad (2)$$

where, Y: yield, W: weight

## 2.4. Solubility

To determine the acid solubility of chitin and chitosan powders obtained from *M. turbinata* shells, 1g from each was weighed. It was dissolved in 100 mL of 1% acetic acid solution. The solution was then stirred and kept at ambient temperature for 2 hours. Then, it was filtered through filter paper that was weighed before and the filter paper was dried. The dried paper and samples were weighed again. The percent solubility was analyzed from the weight gain rate of the filter paper x100 (Nessa et al. 2011).

## 2.5. Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis

FTIR analyses of *M. turbinata* chitin and chitosan material were performed with a Jasco/FT/IR-

6700 instrument set with ATR. IR spectra were observed between 4000 and 400  $\text{cm}^{-1}$  at a determination of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The DD of the polymer was computed according to the study used by Brugnerotto et al. (2001) (Eqs. 3 and 4)

$$\%DA = \left[ \left( \frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 0.3822 \right] / 0.3133 \quad (3)$$

$$\%DD = 100 - \%DA \quad (4)$$

where, DD = deacetylation degree (%) and DA = acetylation degree (%). A1320 was the peak region of the 1320  $\text{cm}^{-1}$  band and A1420 was the apex area of the 1420  $\text{cm}^{-1}$  band, A1320 is the peak for the amide group and A1420 was the peak for the amine group.

## 2.6. X-Ray Diffraction (XRD) Analysis

X-Ray diffraction (XRD) studies were performed to determine the crystallinity of the obtained chitin and chitosan biopolymers. Malvern Panalytical EMPYREAN 3rd generation analytical (UK) device was worked with Cu Ka radiation ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) at 40 kV and 30 mA. Data were gathered at a scan amount of 1°/min with a scan position of 5 to 45°. The crystalline index (CrI) method was used by Yuan et al. (2011) Eq (5),

$$CrI_{110} = \left( \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \right) \times 100 \quad (5)$$

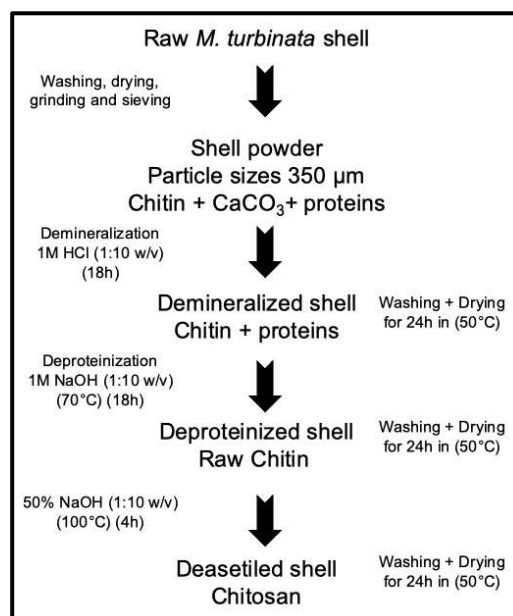
where  $I_{110}$  is the highest intensity of the (110) diffraction peak at  $2\theta = 20^\circ$  and  $I_{am}$  is the amorphous deflection signal at  $2\theta = 16^\circ$ .

## 2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The surface areas and structures of *M. turbinata* chitin and chitosan biopolymers were visualized by SEM. Before imaging the chitin and chitosan materials, gold-palladium coating was performed with the POLARON SC7620 device. The distribution of coated chitin and chitosan biopolymers was shown with the SEM device (JEOL JSM-6380LA) using 15 kV (Marei et al., 2016).

## 3. RESULTS and DISCUSSION

Chitin and chitosan were extracted from *M. turbinata* shell waste as a result of deproteinization, demineralization and deacetylation processes, and the quality of the extracted chitin and chitosan biopolymers was determined (Figure 2).



**Figure 2.** Isolation process of chitin and chitosan from *M. turbinata* shells.

### 3.1. Yields

Many researchers reported that the yields of the obtained chitin and chitosan biopolymers differ among marine species. The results obtained by Fadlaoui et al. (2019) showed a yield of 8.27% chitin and 5.89% chitosan. Majekodunmi et al. (2017) reported that the yield of chitosan obtained from *Mytilus edulis* shells was 51.8% and the yield of chitosan obtained from *Laevicardium attenuatum* shells was 43.8%. Al Sagheer et al. (2009) reported that the yield of chitin from *Metapenaeus affinis*, *Penaeus semisulcatus*, *Portunus pelagicus* male, *P. pelagicus* female, *Thenus orientalis* and cuttlefish were 19.13%, 16.75%, 20.8%, 20.14%, 21.26%, and 7.4%, respectively. Ahyat et al. (2017) reported that yields of chitin and chitosan from the shells of *Portunus pelagicus* were 20.24% and 13.56%, respectively. Bolat et al. (2010) reported that chitin and chitosan from the shells of *Potamon potamios* were 6.83% and 4.56%, respectively. Kabalak et al. (2020) reported that yields of chitin from *Polyphylla fullo*, *Lucanus. cervus*, *Gryllotalpa gryllotalpa* and *Bradyporus (Callimenes) sureyai* shells were 11.3%, 10.9%, 10.1% and 9.8% respectively. In this study, the dry weight of chitin and chitosan from the shells of *M. turbinata* were  $60.26 \pm 0.96\%$  and  $80 \pm 1.29\%$ , respectively (Figure 3). The chitin and chitosan yields are affected not only by the variation of the organisms used for production of the chitin and chitosan, but also by the place where these organisms live in different geographical locations.



**Figure 3.** Dry weight of chitin and chitosan obtained from *M. turbinata* shells.

### 3.2. Solubility

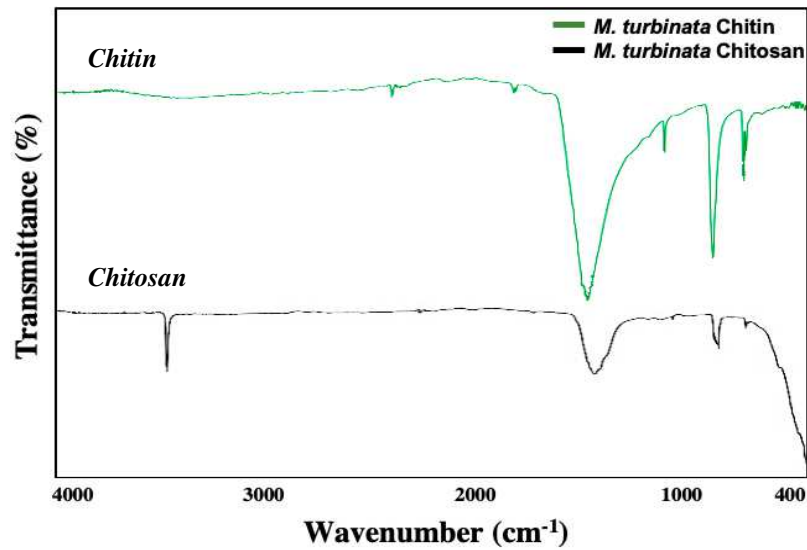
According to the results, *M. turbinata* chitin biopolymer had a low solubility value of  $59.11 \pm 1.48\%$ . It was determined that the chitosan biopolymer obtained from *M. turbinata* shells showed an excellent solubility of  $88.69 \pm 1.71\%$ . Similarly, Alabaraoye et al. (2018) obtained the chitin content from 6 different shellfish wastes and reported their solubility between 58.33% and 85.71%. Demir et al. (2016) reported that the chitosan solubility obtained from crab shell in acetic acid was  $99.29 \pm 0.001\%$ . The main purpose of this method is to assure the precision of the readings from acetyl groups and proteins, since the residues or other impurities may adversely affect the results in the samples during the analysis processes. Chitosan biopolymer affects parameters such as the degree of deacetylation and many physicochemical properties including solubility and crystallinity.

### 3.3. FTIR Analysis

FTIR analysis was achieved to determine the structure of chitin and chitosan obtained from *M. turbinata* shells by identifying characteristic bands of these polymers. Figure 4 shows the FTIR spectra for chitin and chitosan from *M. turbinata* shells.

The FTIR spectrum of *M. turbinata* chitin showed bands at  $3395.41 \text{ cm}^{-1}$  (stretching and vibrating of aliphatic O-H),  $2953.28 \text{ cm}^{-1}$  (C-H vibration of  $-\text{CH}_3$ ),  $1785.76 \text{ cm}^{-1}$  (stretching and vibration of C-O and C=O),  $1443.46 \text{ cm}^{-1}$  (bending vibration of  $-\text{NH}$  and stretching vibration of  $-\text{CN}$ ),  $1081.87 \text{ cm}^{-1}$

(-C-O-C) and  $855.28\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta$ -1,4 glycosidic).

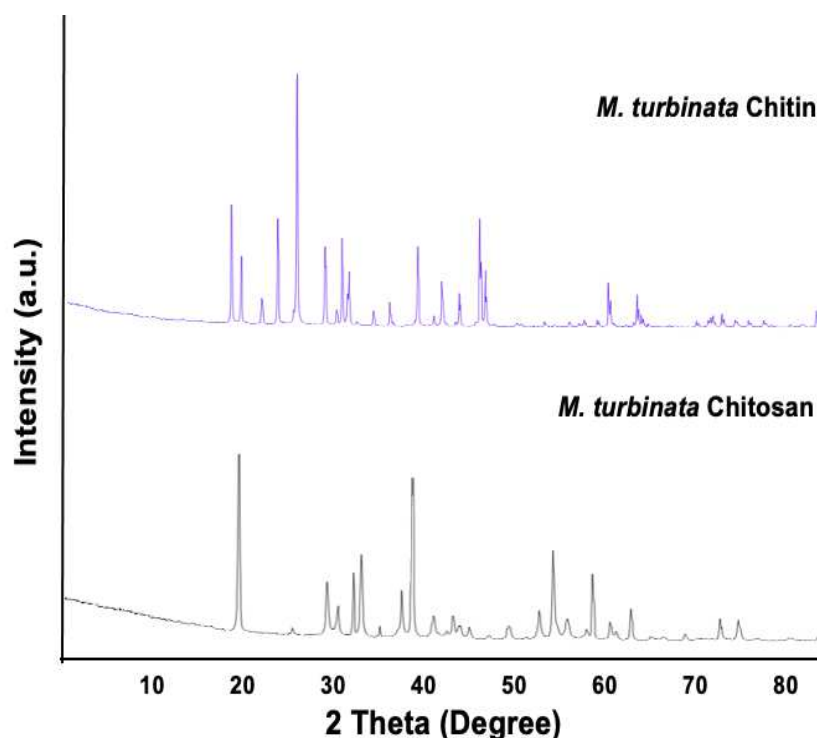


**Figure 4.** FTIR spectra of chitin and chitosan isolated from *M. turbinata* shells.

FTIR spectra of chitosan obtained from *M. turbinata* chitin observed bands at  $3471.62\text{ cm}^{-1}$  (OH stretch overlapped with NH stretch and inter-hydrogen bonds of the polysaccharide),  $2948.77\text{ cm}^{-1}$  (C-H stretch),  $1627.92\text{ cm}^{-1}$  (amide I band, C=O stretch),  $1483.05\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}_2$  bending),  $1407.16\text{ cm}^{-1}$  (C-H bending),  $1275.78\text{ cm}^{-1}$  (amide III band, C-N stretch),  $1094.32\text{ cm}^{-1}$  (bridge C-O-C stretch), and  $983.62\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C stretch). Analysis of chitin and chitosan with FTIR spectrum yielded results similar to previous studies (Hajji et al., 2014; Kumari et al., 2015; Demir et al., 2016; Alabaraoye et al., 2018; Kabalak et al., 2020; Varma & Vasudevan, 2020). The absorbance mode of the FTIR spectra was used to calculate DD and DA in *M. turbinata*. The %DA of chitin obtained from *M. turbinata* shells was calculated as 15.17%. In addition, the %DD of chitosan was calculated as 84.83%. Öğretmen et al. (2022) reported that the %DD of chitosan obtained from pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) was 81%. Alabaraoye et al. (2018) reported that the %DA of chitin materials obtained from mussel, oyster, shrimp and crab species were %91, 85.62, 51.61 and 69.4, respectively. It is estimated that the results found in these two studies and the current study are due to the difference in species and experimental process.

### 3.4. XRD Analysis

To identify the location of the crystal structures and to know the functional properties of the mechanisms in *M. turbinata*, the chitin and chitosan powders were analyzed by XRD. The XRD pattern of the biopolymers of *M. turbinata* shells, chitin and chitosan are presented in Figure 5.



**Figure 5.** XRD spectra of chitin and chitosan isolated from *M. turbinata* shells.

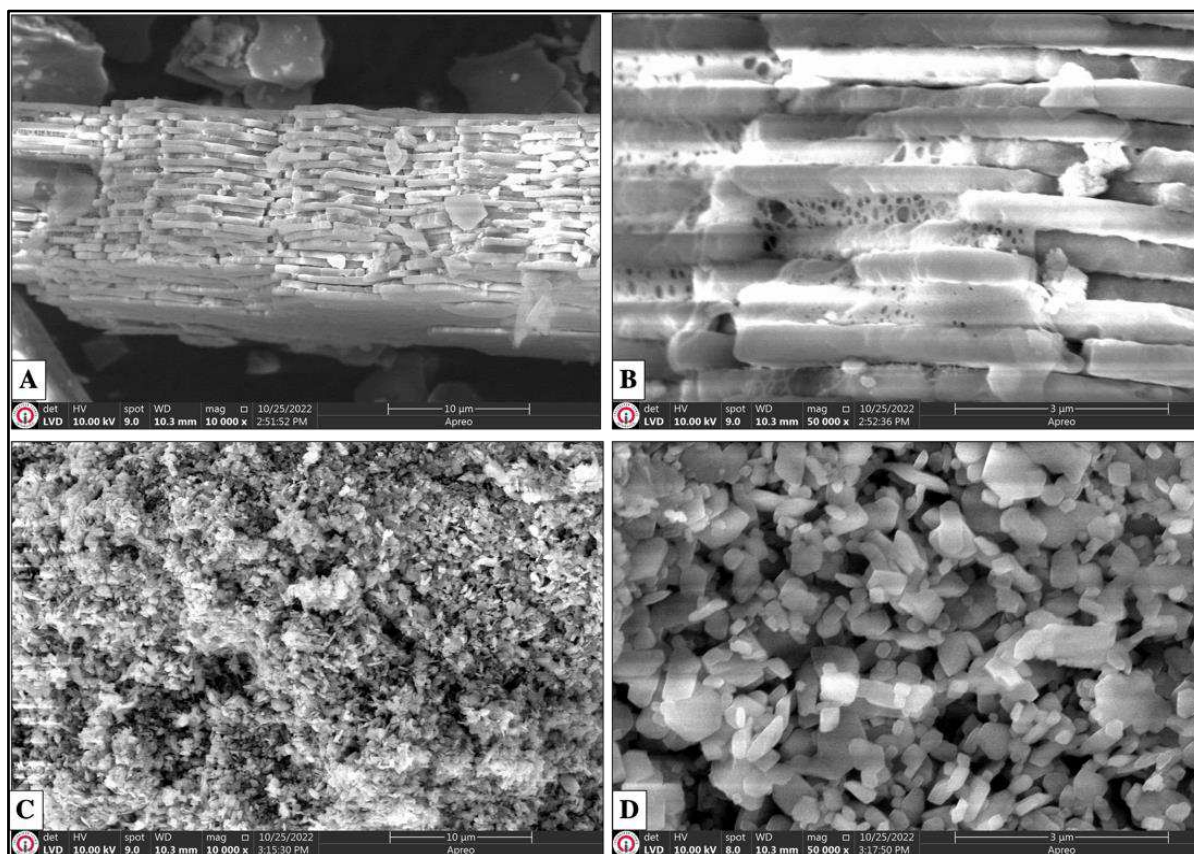
The XRD analysis in this study shows that  $\alpha$ -chitin is extracted. XRD analysis of the *M. turbinata* chitin determined 17 peaks of crystal reflection in the 10-90° range, with the 8 greatest peaks (19.10°, 20.30°, 24.50°, 28.40°, 30.10°, 32.20°, 41.30° and 48.70°) determined (Figure 5). The greatest peak reflection was found to be about 20-30° (1100° count s<sup>-1</sup>) at 2 $\theta$ . 18 peaks were defined in the XRD examination of *M. turbinata* chitosan, and the nine greatest peaks (20.15°, 29.60°, 32.90°, 34.10°, 38.20°, 39.60°, 54.65° and 59.40°) were decided. The greatest peak of the chitosan was determined at about 2 $\theta$  at 20.15° and 39.60° (1200° count s<sup>-1</sup> and 1080° count s<sup>-1</sup>) (Figure 5).

The crystalline index (CrI) of chitin obtained from *M. turbinata* shells was calculated as 54.92%. Kaya et al. (2014) reported that CrI value of chitin extracted from *Fomitopsis pinicola* was 52%. Gbenebor et al. (2017) reported that CrI values of chitin from shrimp exoskeleton were between 79.4-87.4%. Phuong et al. (2017) reported that CrI value of chitin from black tiger shrimp was 54.7%. Odili et al. (2020) reported that CrI value of chitin from crab shell was 80%. Uğurlu & Duysak (2023) reported CrI values of chitin obtained from *D. setosum* testa and spines were 68% and 67%, respectively. The CrI value observed in this study was similar to the CrI values of chitins obtained from other organisms.

### 3.5. SEM analysis

Figure 6 shows the SEM of chitin (Figure A and B) and chitosan (Figure C and D) prepared from shells of *M. turbinata*. The surface structure of the obtained chitin was studied. It was observed that the chitin biopolymers have porous and fibril structures. It also showed that chitin from *M. turbinata* showed regularly arranged dense pores. Chitosan prepared from *M. turbinata* chitin shows a highly porous structure. It is revealed that the chitin biopolymer has a smoother surface area than chitosan.





**Figure 6.** SEM micrographs of chitin (A and B) and chitosan (C and D) extracted from *M. turbinata* at different magnifications.

The presence of pores and fibers in *M. turbinata* chitin and chitosan biopolymers was similar to chitin and chitosan in previous studies in pink shrimp, fishing waste, Nigerian shrimp, and other crustaceans (Uğurlu & Duysak, 2023; Mohan et al., 2021; Varma et al., 2021; Kumari et al., 2015; Isa et al., 2012; Al Sagheer et al., 2009).

#### 4. CONCLUSION

Chitin and chitosan biopolymer were obtained from the gastropod species *Monodonta turbinata*, which has dense populations on the coasts of İskenderun Bay. The chitin and chitosan yields obtained from *M. turbinata* were calculated as  $60.26 \pm 0.96\%$  and  $80 \pm 1.29\%$ , respectively. The deacetylation degree from *M. turbinata* was calculated as  $84.83\%$  using FTIR analysis. The solubility of chitosan from *M. turbinata* shell was  $59.11 \pm 1.48\%$ . XRD analysis showed that the *M. turbinata* shells have a crystalline structure. The CrI value of *M. turbinata* shell was found to be  $54.92\%$ . XRD FTIR and SEM analysis results of chitin and chitosan biopolymers prepared from *M. turbinata* shells have confirmed that they can be used commercially in many different areas (food, cosmetics, medicine etc.). These results suggest that *M. turbinata* shell is one of the most remarkable and good sources of chitin and chitosan.

#### ACKNOWLEDGMENT

I would like to thank Cansev Genç for her support in laboratory studies.

#### FUNDING

No financial support was received for the present study.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests in this paper.



## ETHICAL STATEMENTS

Local Ethics Committee Approval was not obtained because experimental animals were not used in this study.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data is not shared.

## REFERENCES

- Ahyat, N. M., Mohamad, F., Ahmad, A., & Azmi, A. A. (2017). Chitin and chitosan extraction from *Portunus pelagicus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21(4), 770-777. <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2104-02>
- Alabaraoye, E., Achilonu, M., & Hester, R. (2018). Biopolymer (Chitin) from various marine seashell waste: isolation and characterization. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 2207–2218. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1118-y>
- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., & Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410-419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.032>
- Anonymous, (2023). Türkiye'nin Komşuları Dilsiz Haritası. Retrieved on June 11, 2023 from <https://www.sosyalciniz.net/turkiyeninkomsulari-dilsiz-haritasi/>
- Bakır, B. B., Öztürk, B., Doğan, A., & Önen, M. (2012). Mollusc fauna of İskenderun Bay with a checklist of the region. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(1), 171-184.
- Bolat, Y., Bilgin, Ş., Günlü, İ., Izcı, L., Koca, D. B., Çetinkaya, S. & Koca, H. U. (2010). Chitin-chitosan yield of freshwater crab (*Potamon potamios*, Olivier 1804) Shell. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(4), 227-231.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.
- Demir, D., Öfkeli, F., Ceylan, S., & Bölgen Karagülle, N. (2016). Extraction and characterization of chitin and chitosan from blue crab and synthesis of chitosan cryogel scaffolds. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 3(3), 131-144. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.00634>
- Dhinakaran, D. I., Prasad, D. R. D., Gohila, R., & Lipton, P. (2012). Screening of marine sponge-associated bacteria from *Echinodictyum gorgonoides* and its bioactivity. *African Journal of Biotechnology*, 11(88), 15469-15476.
- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1181-1189.
- Fadlaoui, S., El Asri, O., Mohammed, L., Sihame, A., Omari, A., & Melhaoui, M. (2019). Isolation and characterization of chitin from shells of the freshwater crab *Potamon algeriense*. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, (24), 23-35.
- Gbenebor, O. P., Adeosun, S. O., Lawal, G. I., Jun, S., & Olaleye, S.A. (2017). Acetylation, crystalline and morphological properties of structural polysaccharide from shrimp exoskeleton. *Engineering Science and Technology, an International Journal*, 20(3), 1155-1165.
- GM, [Google Maps]. (2023). Google Maps. Retrieved on June 5, 2023 from <https://www.google.com/maps>
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., & Jellouli, K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 298-306.
- Isa, M. T., Ameh, A. O., Tijjani, M., & Adama, K. K. (2012). Extraction and characterization of chitin and chitosan from Nigerian shrimps. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 446-453.

- Kabalak, M., Aracagök, D., & Torun, M. (2020). Extraction, characterization and comparison of chitins from large bodied four Coleoptera and Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.194>
- Kaya, M., Akata, I., Baran, T., & Menteş, A. (2014). Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan Produced from Medicinal Fungus (*Fomitopsis pinicola*). *Food Biophysics*, 10, 162–168
- Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczęsna-Antczak, M., & Daroch, M. (2019). Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 243.
- Kumari, S., Rath, P., Kumar, A. S. H., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, 77-85.
- Luo, Q., Wang, Y., Han, Q., Ji, L., Zhang, H., Fei, Z., & Wang, Y. (2019). Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. *Carbohydrate Polymers*, 209, 266-275.
- Majekodunmi, S. O., Olorunsola, E. O., & Uzoaganobi, C. C. (2017). Comparative physicochemical characterization of chitosan from shells of two bivalved mollusks from two different continents. *American Journal of Polymer Science*, 7(1), 15-22. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20170701.03>
- Marei, N. H., Abd El-Samie, E., Salah, T., Saad, G. R., & Elwahy, A. H. (2016). Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 871-877.
- Mohan, K., Muralisankar, T., Jayakumar, R., & Rajeevgandhi, C. (2021). A study on structural comparisons of  $\alpha$ -chitin extracted from marine crustacean shell waste. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100037.
- Nessa, F., Masum, S. M., Asaduzzaman, M., Roy, S., Hossain, M., & Jahan, M. (2011). A Process for the Preparation of Chitin and Chitosan from Prawn Shell Waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), 323–330. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i4.7330>
- Odili, C., Sekunowo, O., Gbenebour, P., & Adeosun, O. (2020). Characterization and properties comparison of Nigerian crab-shell extracts. *Uşak University Journal of Engineering Sciences*, 3(1), 1-12.
- Öğretmen, Ö. Y., Karsli, B., & Çağlak, E. (2022). Extraction and Physicochemical Characterization of Chitosan from Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) Shell Wastes. *Journal of Agricultural Sciences*, 28(3), 490-500 <https://doi.org/10.15832/ankutbd.861909>
- Phuong, P.T.D., Minh, N.C., Cuong, H.N., Minh, N. V., Han, N. T., Hoa, N.V., Yen, H.T.H., & Trung, T. S. (2017). Recovery of protein hydrolysate and chitosan from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) heads: approaching a zero waste process. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1850-1856. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2616-6>
- Rinaudo, M. Chitin and Chitosan. (2006). Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Soltani, M., Parivar, K., Baharara, J., Kerachian, M. A., & Asili, J. (2015). Putative mechanism for apoptosis-inducing properties of crude saponin isolated from sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) as an antioxidant compound. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(2), 180.
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145-171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Uğurlu, E., & Duysak, Ö. (2023). A study on the extraction of chitin and chitosan from the invasive sea urchin *Diadema setosum* from İskenderun Bay in the Northeastern Mediterranean. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(8), 21416-21424. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23728-9>
- Varma, R., & Vasudevan, S. (2020). Extraction, characterization, and antimicrobial activity of chitosan from horse mussel *Modiolus modiolus*. *ACS Omega*, 5(32), 20224-20230.
-

- Varma, R., Vasudevan, S., Chelladurai, S., & Narayanasamy, A. (2021). Synthesis and Physicochemical Characteristics of Chitosan Extracted from *Pinna deltoides*. *Letters in Applied NanoBioScience*, 11(4), 4061-4070.
- Yadav, P., Yadav, H., Shah, V. G., Shah, G., & Dhaka, G. (2015). Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(9), ZE21.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133-74.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Haggard, W. O., & Bumgardner, J. D. (2011). Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. *Materials*, 4(8), 1399-1416.
- Zainol Abidin, N. A., Kormin, F., Zainol Abidin, N. A., Mohamed Anuar, N. A. F., & Abu Bakar, M. F. (2020). The potential of insects as alternative sources of chitin: An overview on the chemical method of extraction from various sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4978.
-

## Assessment of Büyük Menderes River (West of the Türkiye) Surface Water Quality with Water Quality Index (WQI), Comprehensive Pollution Index (CPI) and Geographic Information Systems (GIS)

### Büyük Menderes Nehri (Türkiye'nin Batısı) Yüzey Suyu Kalitesinin Su Kalite İndeksi (WQI), Kapsamlı Kirlilik İndeksi (CPI) ve Coğrafi Bilgi Sistemleri (GIS) ile Değerlendirilmesi

Nigar Zeynalova<sup>1\*</sup>, Ahmet Demirak<sup>1</sup>, Mustafa Döndü<sup>2</sup>, Feyyaz Keskin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Department of Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla-TÜRKİYE

<sup>3</sup>Environmental Problems Research and Application Center, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla-TÜRKİYE

\*Corresponding Author: [ze.nigar07@gmail.com](mailto:ze.nigar07@gmail.com)

Received: 31.05.2022

Accepted: 02.08.2023

Published: 01.06.2024

**How to Cite:** Zeynalova, N., Demirak, A., Döndü, M., & Keskin, F. (2024). Assessment of Büyük Menderes River (West of the Türkiye) surface water quality with water quality index (WQI), comprehensive pollution index (CPI) and geographic information systems (GIS). *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 108-127. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1308181>

**Abstract:** In the present study some of the water quality parameters were spatially examined with water quality and pollution indices in the Büyük Menderes River (BMR). In addition, the more effective parameters on the indices were determined among the parameters measured in the study. The measured water quality parameters were detected as WT:16.5-25.9 °C, pH:7.5-9.3, DO:nd-12.2 mgL<sup>-1</sup>, EC:312-30215 µScm<sup>-1</sup>, Salt:0.17-19.6 ‰, NO<sub>2</sub>-N:nd-0.31 mgL<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub>-N:nd-1.08 mgL<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>-N:0.035-25.2 mgL<sup>-1</sup>, TP:0.011-7.45 mgL<sup>-1</sup>, MBAS:nd-7.79 mgL<sup>-1</sup> ve COD:nd-128.9 mgL<sup>-1</sup>. In the present study, several parameters were determined as the second class and third class of water quality according to the Turkish Water Pollution Control Regulation\*. WQI value range was determined as from Bad (38.82) to Excellent (92.35), and CPI as from "Sub Clean (0.39) to Highly Polluted (9.62)" in the stream. It was determined that there was no compatibility between WQI and CPI used in determining the environmental risks in the study area. The GIS was found to be effective in interpreting the spatial distribution of the results obtained and in identifying the key areas that require control. Different statistical analyses were used to determine the relationships between variables. In multiple linear regression (MLR) analysis, it was determined that the most critical parameter affecting the indices was NH<sub>4</sub>-N. The results obtained from WQI and CPI in the present study indicate that anthropogenic activities are effective in the region.

\*:TWPCR, Quality criteria of inland surface water resources in terms of general chemical and physicochemical parameters by Class

#### Keywords

- Surface water quality
- Water quality index
- Comprehensive pollution index
- Physicochemical parameters

**Özet:** Bu çalışma, Büyük Menderes nehrindeki bazı su kalite parametrelerini mekansal olarak su kalite ve kirlilik indeksleri ile incelemeyi, ayrıca çalışmada ölçülen hangi parametrenin indeksler üzerinde daha etkili olduğunu belirlemeyi amaçlamıştır. Ölçülen su kalite parametreleri Yüzey Suyu Sıcaklığı:16,5-25,9 °C, pH:7,5-9,3, Çözünmüş Oksijen:nd-12,2 mgL<sup>-1</sup>, Elektriksel İletkenlik:312-30215 µScm<sup>-1</sup>, Tuzluluk:0,17-19,6‰, Nitrit Azotu (NO<sub>2</sub>-N):nd-0,31 mgL<sup>-1</sup>, Nitrat Azotu (NO<sub>3</sub>-N):nd-1,08 mgL<sup>-1</sup>, Amonyum Azotu (NH<sub>4</sub>-N):0,035-25,2 mgL<sup>-1</sup>, Toplam Fosfor:0,011-7,45 mgL<sup>-1</sup>, Anyonik Yüzey Aktif Madde:nd-7,79 mgL<sup>-1</sup> ve Kimyasal Oksijen İhtiyacı:nd-128,9 mgL<sup>-1</sup> olarak tespit edildi. Çalışmamızda Türkiye Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği (SKKY, Kıtaiçi yerüstü su kaynaklarının genel kimyasal ve fizikokimyasal parametreler açısından sınıflarına göre kalite kriterleri)'ne göre birden fazla parametrenin ikinci sınıf ve üçüncü sınıf su kalitesinde olduğu belirlendi. Su kalitesi indeksi değer aralığı akarsuda Kötü (38,82)-Mükemmel (92,35), kapsamlı kirlilik

#### Anahtar kelimeler

- Yüzey suyu kalitesi
- Su kalite indeksi
- Kapsamlı kirlilik indeksi
- Fizikokimyasal parametreler



indeksi ise “Az Kirlı (0,39)-Çok Kirlı (9,62)” Őekinde tespit edildi. Çalışma alanında çevresel risklerin belirlenmesinde kullanılan su kalite indeksi ve kapsamlı kirlilik indeksi arasında bir uyumun olmadıŐı belirlendi. Coğrafi bilgi sisteminin, elde edilen sonuçların mekansal dağılımlarının yorumlanmasında ve kontrol gerektiren kilit alanların belirlenmesinde etkili olduğu görüldü. DeĐiŐkenler arası iliŐkilerin belirlenmesinde farklı istatistiksel analizler kullanıldı. Çoklu doğrusal regresyon (MLR) analizinde indeksleri etkileyen en önemli parametrenin NH<sub>4</sub>-N olduğu tespit edildi. Çalışma sonucunda elde edilen su kalite indeksi ve kapsamlı kirlilik indeksi sonuçları antropojenik faaliyetlerin bölge üzerinde etkili olduğuna iŐaret etmektedir.

## 1. INTRODUCTION

Water is necessary for the continuity of vital activities in every period of human life, and the presence and quality of water are especially important (Minareci and Çakir, 2018; Şimşek and Mutlu, 2023). Sustainable use of surface water is one of the indispensable issues, especially considering freshwater resources. Determining the quality and pollution level of these waters is essential for the environment and human health (Döndü et al., 2022). River water quality can vary depending on numerous factors such as the geology of the area, vegetation and human activities (point and non-point). River water pollutants usually come via stream discharges, groundwater seepage, stormwater runoff, and atmospheric deposition (Yang et al., 2021). Surface water quality in rivers is indispensable for both human communities and aquatic organisms (Zhong et al., 2018). However, it has been reported by many researchers that water quality deteriorates due to anthropogenic activities and this situation is a serious threat especially for developing countries (Singh et al., 2005; Gazzaz et al., 2012; Yılmaz and Koç, 2016; Aksever and BüyüŐshahin, 2017; Wu et al., 2018; Yang et al., 2020; Yang et al., 2021; Döndü et al., 2022; Ellassassi et al., 2022; Özdemir et al., 2022). Besides, river ecosystems attract more attention due to their importance in ecological integrity as well as for their economic contribution (Sun et al., 2019; Tibebe et al., 2019).

In recent years, with the increasing importance of water quality, different evaluation methods have been developed and used. The most common methods in scientific studies today include the use of water quality and pollution indices (Hurley et al., 2012; Şener et al., 2017; Ewaid et al., 2018; Matta et al., 2020; Yılmaz et al., 2020; Valentini et al., 2021; Döndü et al., 2022; Şimşek et al., 2022; Özdemir et al., 2023; Şimşek and Mutlu, 2023), principal component analysis (PCA) (Olsen et al., 2012; Wang et al., 2017; Zeinalzadeh and Rezaei, 2017; Basatnia et al., 2018; Zhong et al., 2018; Ellassassi et al., 2022), geographic information system (GIS) (Şener et al., 2017; Döndü et al., 2022), and multiple linear regression (MLR) (Basatnia et al., 2018; Ewaid et al., 2018; Valentini et al., 2021). One of the most used interpolation methods on GIS is Inverse Distance Weighted (IDW) (Aminu et al., 2015; Rostami et al., 2019). IDW is one of the most used geostatistical and mathematical interpolation techniques nowadays (Yang et al., 2020). This technique is used for spatiotemporal mapping and surveying of surface water quality, assessing potential pollution of river water (Zhong et al., 2018).

Environmental studies were carried out at different locations in the BMR, including many areas of the basin (Akçay et al., 2003; Koca et al., 2008; Bulut et al., 2012; Tekin Özan and Aktan, 2012; Yilgor et al., 2012; Gülcü-Gür and Tekin-Özan, 2015; Yılmaz and Koç, 2016; Aksever and BüyüŐshahin, 2017; Durmaz et al., 2017; Minareci and Çakir, 2018; Minareci et al., 2018; Algül and Beyhan, 2020; Esen and Hein, 2020; Yılmaz et al., 2020; Akyildiz and Duran, 2021). However, among these studies, there is almost no detailed study in which water quality and pollution indices are used alone or together with GIS and covering the entire basin. In this regard, it is thought that our study is especially important considering the quality of drinking and irrigation water used extensively in the region.

The aims of this study are (i) to evaluate the current status of water with water quality and pollution indices in BMR which is one of the most important rivers of Türkiye, and to compare the indices (ii) to determine the most effective water quality parameters on quality and pollution indices (iii) to analyze the water quality parameters spatially and to evaluate them with statistical analyses and GIS.

## 2. MATERIAL and METHODS

### 2.1. Study area and sampling sites

The BMR has a length of 584 km and it is the longest river in the Aegean region of Türkiye (Figure



1). BMR is located in Western Anatolia, southwest of Türkiye, between the coordinates 37°04'-38°95' North and 27°05'-30°76' East. The borders of the basin, which constitutes 3.2 percent (26.361 km<sup>2</sup>) of Türkiye's land surface, includes many provinces such as Aydın, Uşak, Denizli, Muğla, Afyon, Isparta, Burdur and İzmir (Durkan et al., 2008; Koca et al., 2008; Yılmaz and Koç, 2016; Durmaz et al., 2017; Minareci et al., 2018; SYGM, 2018; Yılmaz et al., 2020).

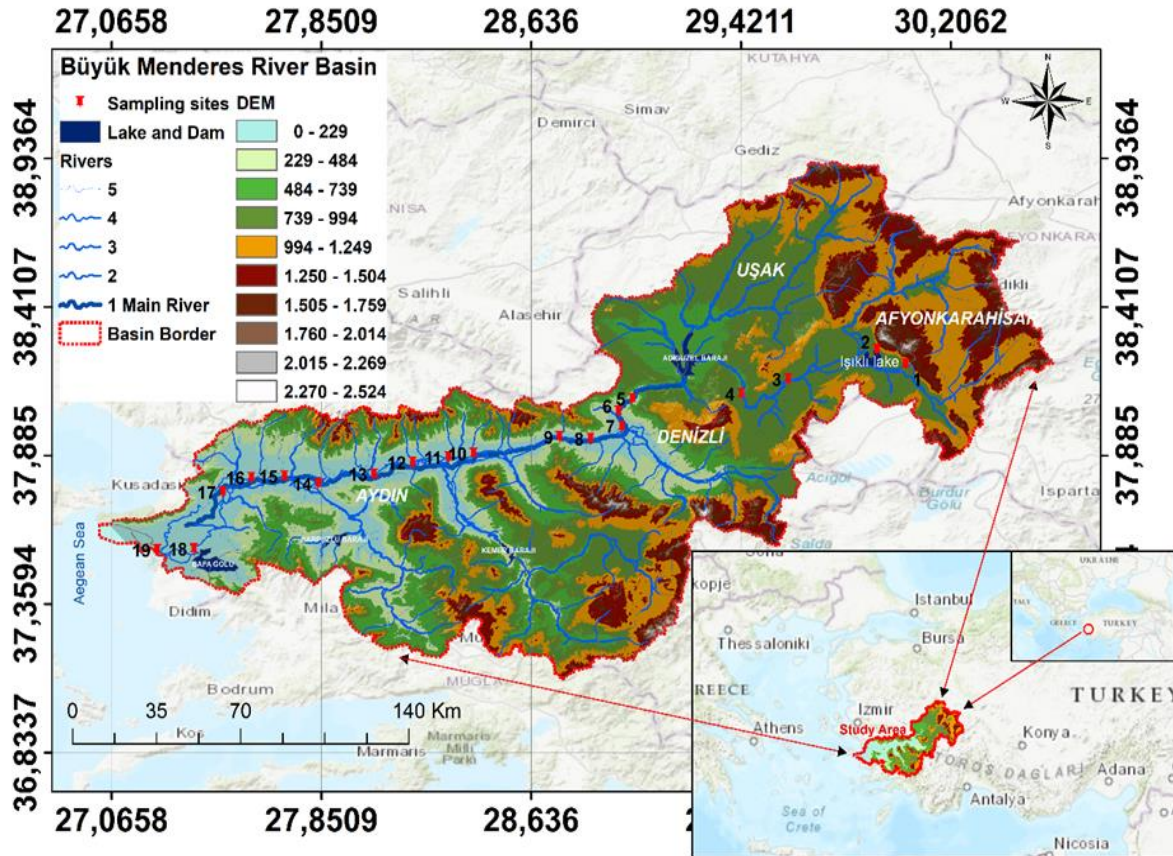


Figure 1. Study area map, sampling sites and digital elevation model (DEM).

Most of the river water is used for irrigation purposes. The population of the basin has reached 2.5 million people, the majority of whom are distributed in 323 municipalities (Yılmaz et al., 2020). The river basin is very important from an agricultural point of view (Minareci ve Çakır, 2018). Cotton, wheat, corn, clover, sunflower, vegetables and fruits are the traditional cultivated of these areas according to the irrigation tradition (SYGM, 2018). Leather and textile industry are highly developed in the basin (Çondur and Cömertler, 2010). The region is adversely affected by domestic waste water originating from settlements, industrial waste water originating from industrial establishments, water returning from irrigation containing fertilizers and chemicals (because pesticides are used) and geothermal power plant waste water (Akçay et al., 2003; Durkan et al., 2008; Koca et al., 2008; Yılmaz and Koç, 2016; Minareci and Çakır, 2018). In the BMR, chosen as the research area, 19 sampling sites with potential pollution were determined and samples were collected from points shown below (Table 1). The view of the basin boundary, study area height (DEM) and sampling sites are given in Figure 1.



**Table 1.** Coordinates and names of sampling sites.

1 Gökgöl, Denizli (38°12'19.02"N-30°2'19.37"E)	11 Nazilli, Aydın (37°52'32.55"N-28°19'40.40"E)
2 Işıklı Lake, Denizli (38°15'25.97"N 29°55'41.85"E)	12 Yenipazar, Aydın (37°51'27.72"N-28°11'33.57"E)
3 Yahyalı, Denizli (38° 09'6.50"N-29°35'53.05"E)	13 Köşk, Aydın (37°48'58.69"N-28°2'53.79"E)
4 Çal, Denizli (38° 6'1.84"N-29°25'21.55"E)	14 Aydın (37°46'56.36"N-27°50'22.55"E)
5 Cindere, Denizli (38° 5'0.63"N-29°0'53.45"E)	15 Yazıdere, Aydın (37°48'35.31"N-27°42'46.76"E)
6 Mahmutlu, Denizli (38° 2'17.92"N-28°57'46.44"E)	16 Karaağaçlı, Aydın (37°48'13.88"N-27°35'19.17"E)
7 Ahmetli, Denizli (37°59'7.80"N-28°58'30.50"E)	17 Söke, Aydın (37°45'11.41"N-27°28'54.47"E)
8 Karakıran, Denizli (37°56'31.76"N-28°51'29.88"E)	18 Sarıkemer, Aydın (37°33'7.75"N-27°22'25.61"E)
9 Buharkent, Aydın (37°56'50.34"N-28°44'35.71"E)	19 Batıköy, Aydın (37°32'52.29"N-27°14'14.01"E)
10 Hamzalı, Aydın (37°53'21.65"N-28°25'14.24"E)	

## 2.2. Water quality parameters and experimental studies

Samples were collected by conducting a field study in September 2021 from the sampling sites determined in the BMR. Water samples were filled into the 2 L polyethylene bottles and transported as a cold chain to the laboratory. Electrical conductivity (EC,  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ), salinity (Salt, ‰), pH, water temperature (WT, °C), and dissolved oxygen (DO,  $\text{mgL}^{-1}$ ) were measured at the sampling sites using a multiparameter device named the Hach HQ40d brand. All the parameters measured in this study and the methods used are given in Table 2. Water analysis was done by APHA (2017) and EPA (1971) methods in the laboratory of Mugla Sıtkı Koçman University Environmental Problems Research and Application Centre, accredited by the internationally recognized Turkish Accreditation Agency (TURKAK). TIN ( $\text{NH}_4\text{-N}+\text{NO}_2\text{-N}+\text{NO}_3\text{-N}$ ) was obtained by summing the nitrogen values. The samples were studied in 3 repetitions and the averages were noted. In the calibration charts prepared for the parameters,  $r^2 > 0.99$  was determined. Double distilled water obtained from the Human Zener UP900 brand distilled water device was used in the preparation of all solutions. In analyses using the colorimetric method, measurements were made using an Agilent Cary60 UV/V brand spectrophotometer. All chemicals used in the analyses are of analytical purity and belong to Merck and Sigma Aldrich brands.

**Table 2.** Methods used in water analysis.

Analyses	Name of the method	Reference Metod	Measurement range
WT	Laboratory and field methods	SM 2550 B	0-100 °C
pH	Electrometric method	SM 4500 H <sup>+</sup> B	1-14
DO	Membrane electrode method	SM 4500-O H	0-50 $\text{mgL}^{-1}$
EC	Laboratory and field methods	SM 2510 B	0-200 mS/cm
Salt	Laboratory and field methods	SM 2520 B	0-70 ‰
$\text{NO}_2\text{-N}$	Spectrophotometric	SM 4500 B	>0.01
$\text{NO}_3\text{-N}$	Brucine method	EPA 352.1	>0.1
$\text{NH}_4\text{-N}$	Spectrophotometric	SM 4500 B	>0.02
TP	Spectrophotometric	SM 4500-P B ve E	>0.01
MBAS	Spectrophotometric	SM 5540-C	>0.025
COD	Titrimetric method	TS2789 (Part A- B)	>1

SM: Standard method, TS: Turkish Standard

## 2.3. Water quality index (WQI) and Comprehensive pollution index (CPI)

WQI is a single number that is easy to understand and interpret mathematically and that is derived from the conversion of multiple water quality data (Kükreler and Mutlu, 2019). The following equation (1) was used to determine the WQI.

$$\text{WQI} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i P_i}{\sum_{i=1}^n P_i} 1$$

In this equation, n is the total number of parameters,  $C_i$  is the value assigned to parameter i after normalization and  $P_i$  is the relative weight of parameter i (Pesce and Wunderlin, 2000).  $P_i$  values range between 1 and 4 (Kocer and Sevgili, 2014). The WQI is calculated between 0 and 100 and a value

closer to 100 indicates better water quality conditions. Water quality is divided into five classes according to WQI values: very bad (0-25), bad (26-50), medium (51-70), good (71-90) and excellent (91-100) (Kocer and Sevgili, 2014). Limit values of Turkish water quality standards were taken into consideration during the calculations made (TS266, 2005). In this study, eight water quality parameters (WT, pH, DO, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N, TP and COD) were used for WQI calculation.

CPI is used to determine the pollution level at a given point using water quality monitoring data (Son et al., 2020). The following empirical equation (2) was used to determine the CPI.

$$CPI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n PI_i \quad (2)$$

where n is the number of parameters; PI<sub>i</sub> is the pollution index number i. PI<sub>i</sub> is calculated according to the following equation (3).

$$PI_i = \frac{C_i}{S_i} \quad (3)$$

where C<sub>i</sub> is the concentration of parameter in water; S<sub>i</sub> is the limit value according to environmental standards. CPI is classified into five categories: Clean (0-0.2), Sub clean (0.21-0.40), slightly polluted (0.41-1.00), medium polluted (1.01-2.00), and heavily polluted (CPI ≥ 2.01). In this study, eight water quality parameters (WT, pH, DO, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N, TP, and COD) were used for CPI calculation.

## 2.4. Data analysis

In this study, descriptive statistics and Kolmogorov-Smirnov & Shapiro-Wilk normality tests were used to determine the distribution of the data, Kruskal-Wallis test was used to determine the differences of the variables between sampling sites, Spearman's rho correlation was used to analyze the relationships between the variables, PCA was used to detect potential pollutant sources and the relationships between the data and MLR was used to determine the parameters affecting the water quality indices. SPSS 22 and Origin 2022b were used for statistical analyses. Before performing MLR analysis, analysis prerequisites (linearity, normality, multicollinearity, and homoscedasticity) were fulfilled. For multicollinearity control, correlation coefficients between all independent variables were found to be less than 0.8, and the variance inflation factor (VIF) of linear regression was found to be <10 (Ewaid et al., 2018). The spatial analysis of the collected data was conducted in GIS, and a thematic map of each water variable was developed by using the IDW interpolation technique (Gong et al., 2014). During the mapping process, ArcGIS software (10.7.1) was utilized.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

### 3.1. Water quality and statistical analysis

The descriptive statistical results of the data in the study area are given in Table 3, the distribution of the data at the sampling sites is given in Figure 2 and the correlation results are given in Figure 3. The differences in the variables between sampling sites are given in Table 5. A significant difference was found between the distributions of the variables at the sampling sites (Table 5, p=0.000). The distributions of the values in GIS are given in Figure 4, Figure 5, and Figure 6.

**Table 3.** Physicochemical analysis results in water samples.

Descriptive Statistics					
	Unit	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
WT	°C	16.5	25.9	21.5	2.42
pH	-	7.5	9.3	8.3	0.49
DO	mgL <sup>-1</sup>	nd	12.2	6.84	3.70
EC	µScm <sup>-1</sup>	312.0	30215	3101	6614
Salt	%o	0.17	19.6	1.86	4.29
NO <sub>2</sub> -N	mgL <sup>-1</sup>	nd	0.310	0.060	0.08
NO <sub>3</sub> -N	mgL <sup>-1</sup>	nd	1.08	0.28	0.31
NH <sub>4</sub> -N	mgL <sup>-1</sup>	0.035	25.2	2.75	6.28
TP	mgL <sup>-1</sup>	0.011	7.45	0.85	2.22
MBAS	mgL <sup>-1</sup>	nd	7.79	0.54	1.74
COD	mgL <sup>-1</sup>	nd	128.9	41.5	34.1

nd: not determined

WT is one of the most important parameters affecting aquatic life. Living things are very sensitive to water temperature changes (Özdemir et al., 2014). Physical properties of water such as density, viscosity, vapor pressure, surface tension and chemical properties such as biochemical reaction rates are significantly affected by water temperature (Wu and Kuo, 2012). The highest WT was detected at sampling site fourteen with 25.9 °C, while the lowest value was detected at sampling site one with 16.5 °C (Figure 1, Figure 2a and Table 3).

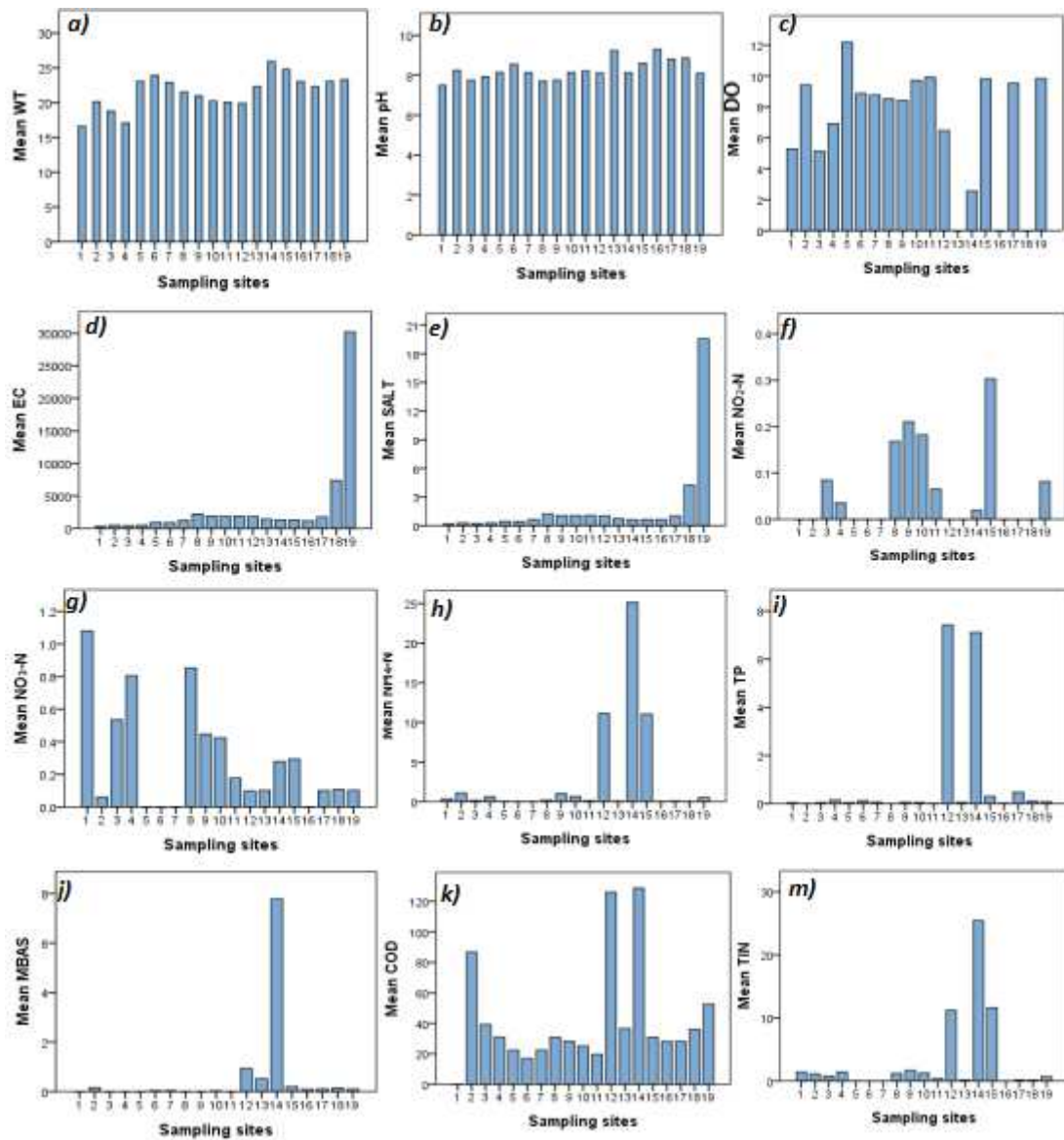
**Table 4.** The comparison of this study with other studies and standards.

References/ Parameters	WT	pH	DO	MBAS	COD	TP	NH <sub>4</sub> -N	NO <sub>2</sub> - N	NO <sub>3</sub> - N	WQI	CPI
Akyildiz and Duran, (2021)	19.74	8.29	7.51	-	-	-	-	0.52	3.31	-	-
Yılmaz et al. (2020)	-	8.03	7.30	-	16.64	-	0.45	0.17	2.07	a-b	-
Minareci et al. (2018)	15.6	8.24	6.04	0.24	-	0.018	-	-	-	-	-
Aksever and Büyüksahin, (2017)	10.53	8.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yılmaz and Koc, (2016)	-	-	7.43	-	29.60	-	-	0.06	2.02	-	-
Bulut et al. (2012)	14.30	8.17	9.08	-	-	-	-	-	1.05	-	-
Kara et al. (2004)	11.0	7.5	7.33	-	20.0	-	-	0.001	0.34	-	-
Akcay et al. (2003)	19.0	8.15	11.6 5	-	42.4	-	-	-	-	-	-
<b>This study (2022)</b>	21.5	8.3	6.84	0.54	41.5	0.85	2.75	0.06	0.28	c-d	e-f
<b>TWPCR (2023) 1<sup>st</sup></b>	≤25	6-9	>8	-	<25	<0.08	<0.2	-	<3	-	-
<b>TWPCR (2023) 2<sup>nd</sup></b>	≤25	6-9	6	-	50	0.2	1	-	10	-	-
<b>TWPCR (2023) 3<sup>rd</sup></b>	≤30	6-9	<6	-	>50	>0.2	>1	-	>10	-	-

a: good, b: very poor, c: bad, d: excellent, e: Sub clean, f: heavily polluted

Gökgöl Wetland Protection Area is in the sampling region one and is located between Afyon-Denizli border. Sampling site fourteen is at the entrance to the center of Aydın, and high concentrations of MBAS were detected in this region. Mean WT was determined as 21.5±2.42 °C in the BMR basin. WT showed a positive ( $p<0.001$ ) correlation with pH and MBAS, and a negative ( $p<0.001$ ) correlation with NO<sub>3</sub>-N (Figure 3). The average water temperature value we obtained is higher than the studies conducted in the region and is of the first class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).

pH significantly affects the treatment and use of water, and the pH of water is a measure of its reactive properties (Bulut et al., 2012; Aksever and Büyüksahin, 2017). The pH of the water consumed by humans is between 6.5 and 8.5, and pH is very important as it affects the solubility, availability and use of nutrients by aquatic organisms (Yılmaz et al., 2020; Ram et al., 2021).



**Figure 2.** Distribution of data in the study area at sampling sites (a:WT, b:pH, c:DO, d:EC, e:Salt, f:NO<sub>2</sub>-N, g:NO<sub>3</sub>-N, h:NH<sub>4</sub>-N, i:TP, j:MBAS, k:COD, m:TIN).

The highest pH was determined as 9.3 at sampling site sixteen, while the lowest value was determined at sampling site one as 7.5 (Figure 1, Figure 2b and Table 3). At sampling site sixteen of Karaağaçlı (Aydın) region, the water became very shallow and the flow almost came to a standstill (Figure 1). While pH showed a high positive correlation ( $r=0.54$ ) with MBAS, it showed a high negative correlation ( $r=-0.65$ ) with NO<sub>3</sub>-N (Figure 3). The average pH value we determined in the basin is higher than other studies conducted in the region, and it is of the first class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).

DO is one of the most important water quality parameters (Yılmaz et al., 2020; Döndü et al., 2022; Özdemir et al., 2022). DO below 2 mg/l is called hypoxia and is not suitable for the survival of living organisms (Rounds et al., 2013).

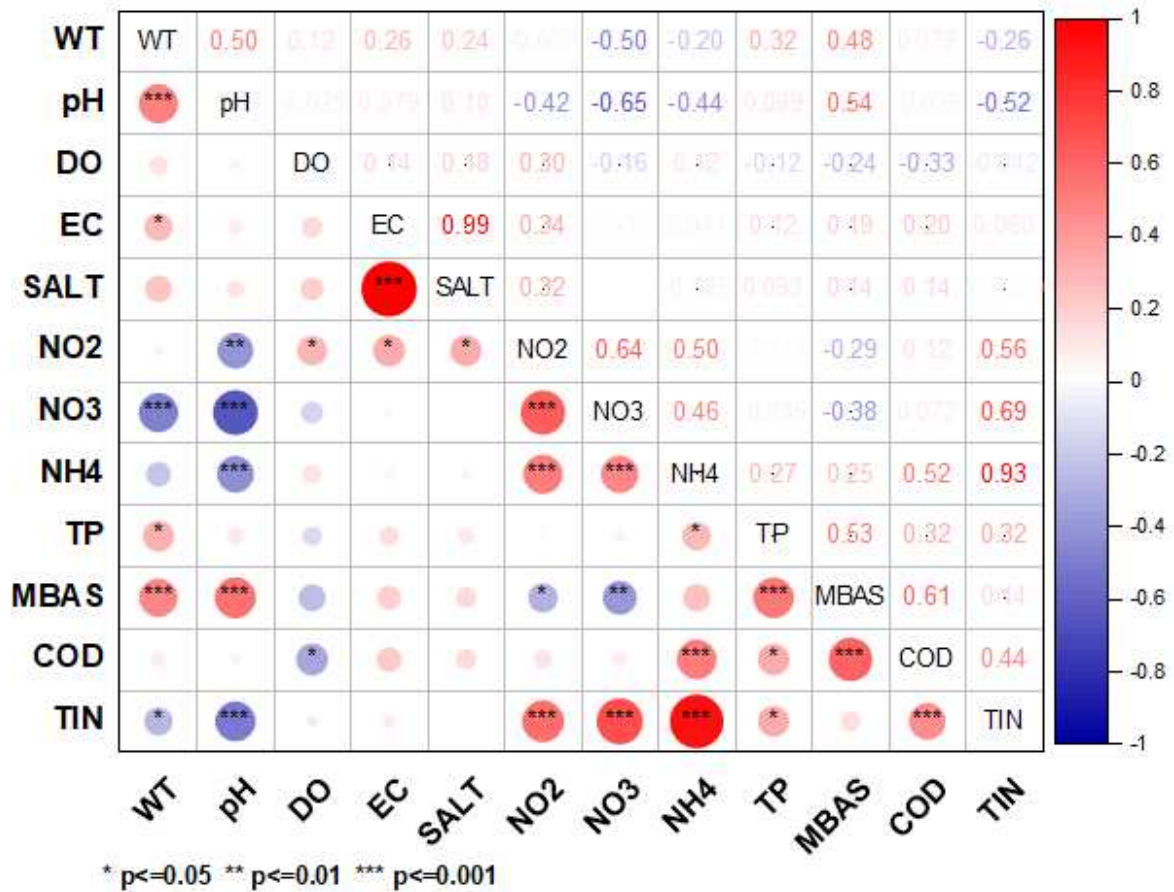


Figure 3. Correlation results of water quality parameters.

The highest DO was determined as 12.20 mgL<sup>-1</sup> at sampling site five, while the lowest value was determined with nd (not determined) at sampling sites thirteen, sixteen, and eighteen (Figure 1, Figure 2c, and Table 3). The mean DO was determined as 6.84±3.7 mgL<sup>-1</sup> in the basin. Sampling site thirteen located in the Köşk (Aydın) region and sampling site eighteen located in the Sarıkemer (Aydın) region were quite shallow and the amount of water was greatly reduced. Agricultural areas are dense in these areas and there are olive oil factories at some points. However, it is affected by multiple streams and environmental activities. The average DO value we determined in the basin is one of the lowest values in the studies conducted in the region, and it is in the second-class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).

Table 5. Kruskal Wallis Test results for water quality parameters.

	Test Statistics <sup>a,b</sup>										
	WT	pH	DO	EC	Salt	NO <sub>2</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	NH <sub>4</sub> -N	TP	MBAS	COD
Chi-Square	55.294	55.665	55.851	55.884	55.702	55.899	55.224	55.657	55.809	55.832	55.638
Asymp. Sig.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

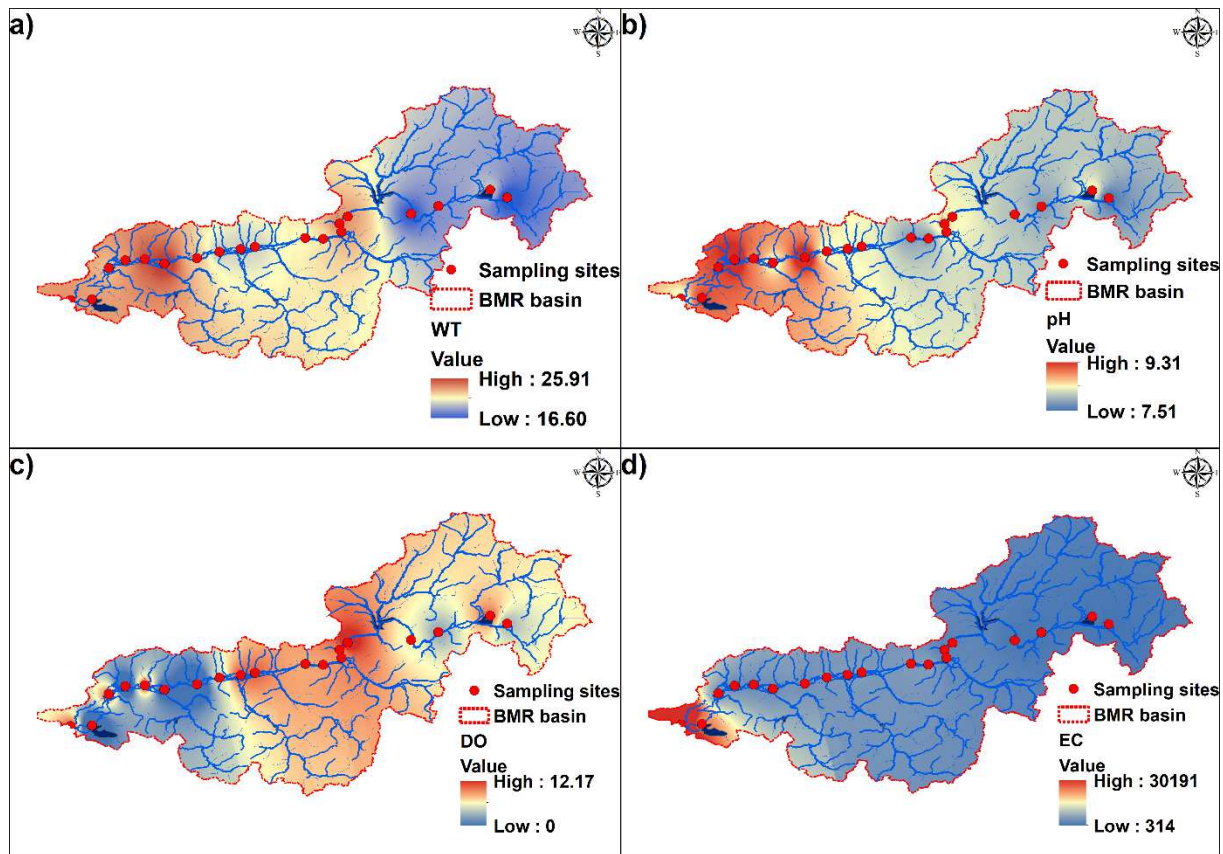
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Sampling Sites

EC is a parameter that indicates the ability to conduct current in the water and the total amount of salt or ions dissolved in the water (Yılmaz et al., 2020). The salinity of water used for drinking is specified as 1500 µScm<sup>-1</sup> (Tibebe et al., 2019). Yılmaz et al. (2020) determined the EC value as 1160

$\mu\text{Scm}^{-1}$ , and Akyildiz and Duran (2021) as  $1449 \mu\text{Scm}^{-1}$ . In our study, the highest EC was determined with  $30215 \mu\text{Scm}^{-1}$  at sampling site nineteen, while the lowest value was determined at sampling site one with  $312 \mu\text{Scm}^{-1}$  (Figure 2d). It showed a high positive correlation ( $p < 0.001$ ) with EC-Salt (Figure 3). Sampling site nineteen is located in the outlet region of the basin (Batiköy, Aydın) close to the marine area (Figure 1). Akyildiz and Duran (2021) determined the salinity value as 2.61% in their studies in the basin. The salinity data in our research move in parallel with the EC values. The highest salinity was determined at sampling site nineteen as 19.56%, while the lowest value was determined at sampling site one as 0.17% (Figure 1).

$\text{NO}_2\text{-N}$  does not accumulate much in the environment and turns into nitrate nitrogen as a by-product (Boyd and Tucker, 1992). The highest  $\text{NO}_2\text{-N}$  was detected at sampling site fifteen with  $0.310 \text{ mgL}^{-1}$ , while the lowest value was detected as nd at more than one sampling site (Figure 1, Figure 2f, and Table 3). Sampling site fifteen is located in Yazıdere (Aydın) region and there are dense agricultural areas and domestic discharges around it. Again in this region, there are retreats and shallows in the water. The mean  $\text{NO}_2\text{-N}$  value was determined as  $0.06 \text{ mgL}^{-1}$ .  $\text{NO}_2\text{-N}$  showed a high positive correlation with  $\text{NO}_3\text{-N}$  and  $\text{NH}_4\text{-N}$  (Figure 3). The average  $\text{NO}_2\text{-N}$  value we obtained in the study was determined at a low level compared to Akyildiz and Duran (2021) and Yılmaz et al. (2020) (Table 4).



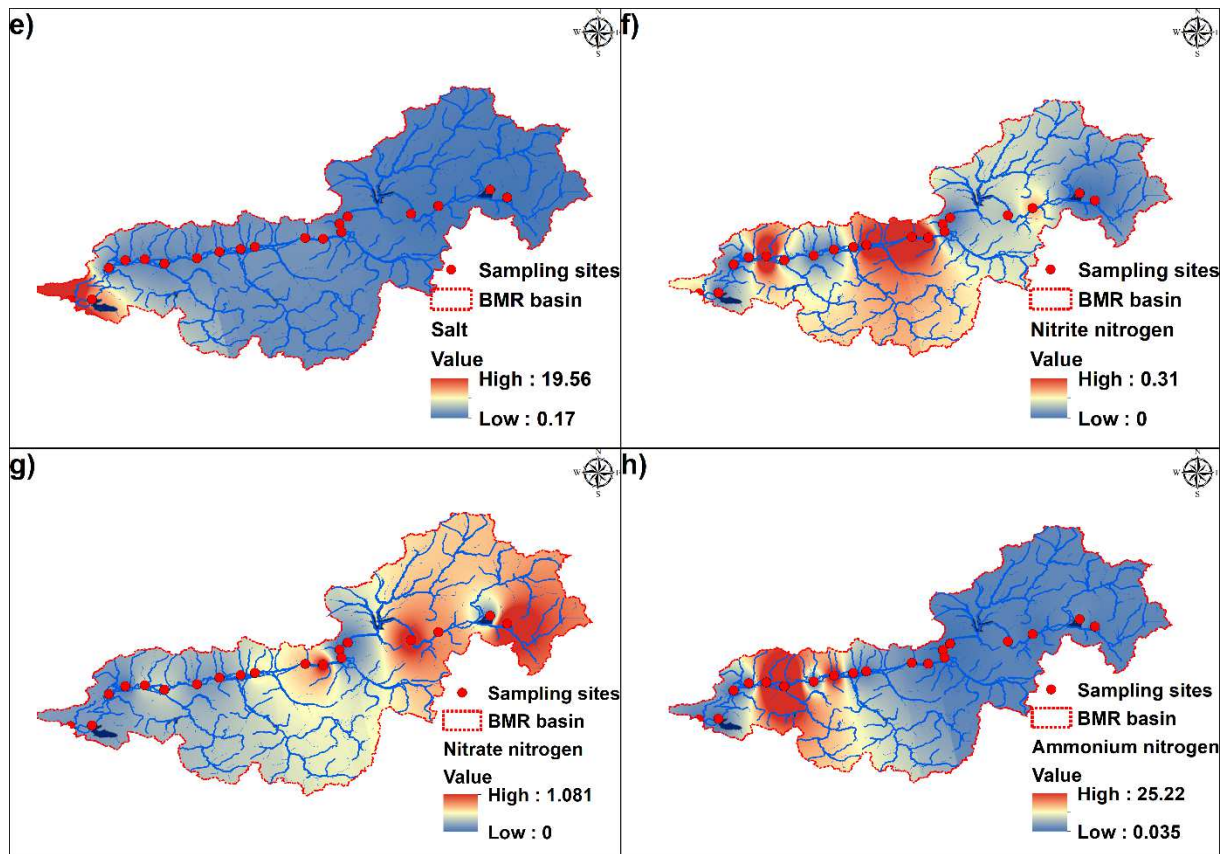
**Figure 4.** GIS map of mean WT (a), pH (b), DO (c), and EC (d).

$\text{NO}_3\text{-N}$  values above  $5 \text{ mg/l}$  in surface water indicate intense domestic and agricultural activities (Chapman and Kimstach, 1996). While the highest  $\text{NO}_3\text{-N}$  value was detected at sampling site one as  $1.081 \text{ mgL}^{-1}$ , the lowest value was found in more than one sampling sites as nd (Figure 1, Figure 2 and Table 3). The presence of animal fertilizers and intensive agricultural work at sampling site one may be effective in increasing these values. Especially the pouring of animal manures to the bottom of the trees near the river can contribute to this situation. The mean value was found to be  $0.28 \text{ mgL}^{-1}$ . The average nitrate nitrogen value we determined in the basin is one of the lowest values among the



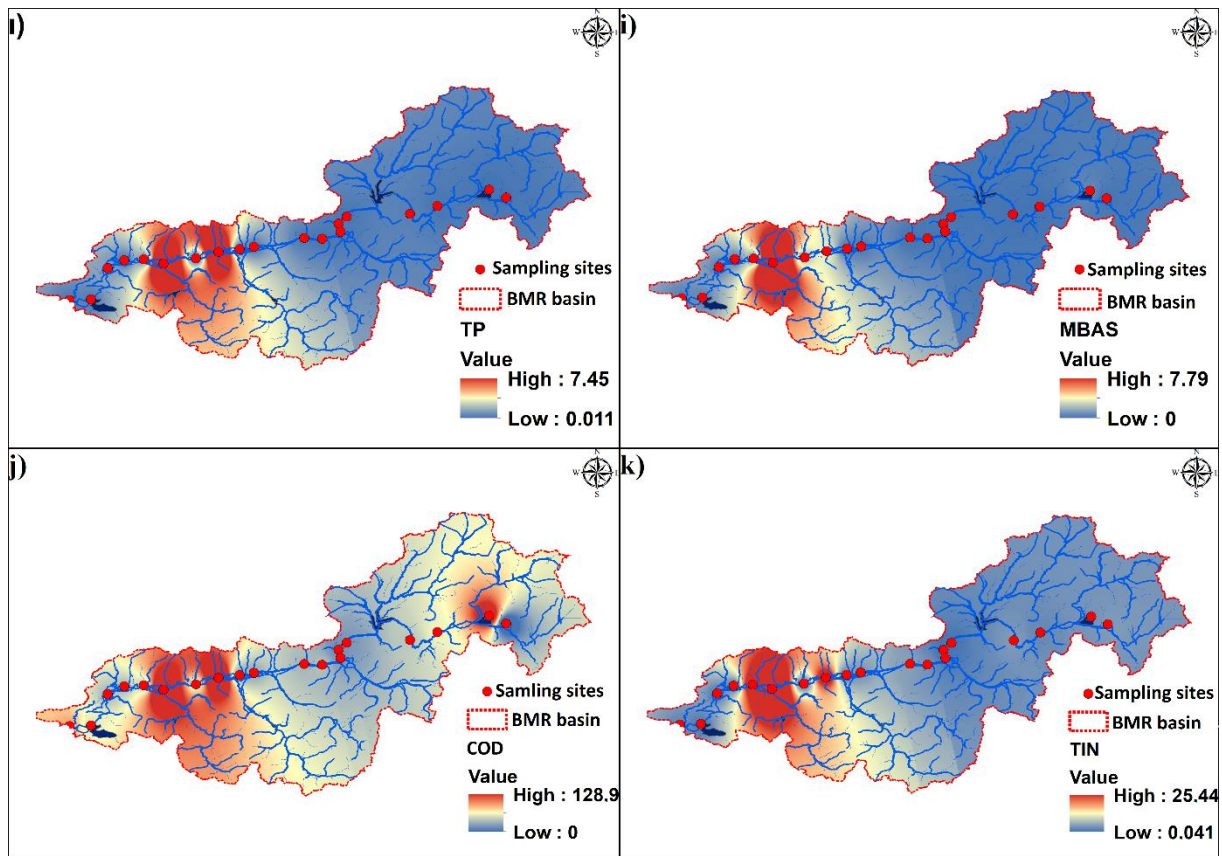
studies conducted in the region, and it is of the first class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).

$\text{NH}_4\text{-N}$  is the most general form of nitrogen in aquatic ecosystems. Ammonia can pass quickly through the gills, causing nervous system toxicity and even death (Osman and Kloas, 2010; Yılmaz and Koc, 2016). The highest  $\text{NH}_4\text{-N}$  value was determined at sampling site fourteen as  $25.2 \text{ mgL}^{-1}$ , while the lowest value was determined at sampling site eighteen as  $0.035 \text{ mgL}^{-1}$  (Figure 1, Figure 2h and Table 3). At this point, it is thought that it is effective in increasing the  $\text{NH}_4\text{-N}$  values of both agricultural and industrial wastewater. The average  $\text{NH}_4\text{-N}$  value we determined in the basin is higher than the studies conducted in the region, and it is in the third class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).



**Figure 5.** GIS map of mean Salt (e),  $\text{NO}_2\text{-N}$  (f),  $\text{NO}_3\text{-N}$  (g), and  $\text{NH}_4\text{-N}$  (h).

Phosphate concentrations ranging from  $0.05$  to  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  are considered threshold values for natural waters (Tibebe et al., 2019). The highest TP was detected at sampling site twelve as  $7.45 \text{ mgL}^{-1}$ , while the lowest value was determined at sampling site two and eight as  $0.011 \text{ mgL}^{-1}$  (Figure 1, Figure 2i and Table 3). Sampling site twelve, which is close to Yenipazar (Aydın) district, is quite shallow and the water contained is dark in color. The average TP value we determined in the basin is higher than the studies conducted in the region, and it is in the third class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).



**Figure 6.** GIS map of mean TP (i), MBAS (j), COD (k) and TIN (l).

With bioaccumulation, MBAS can pose a threat to human health. Since MBAS is not naturally found in waters, it may be caused by activities along the basin and cause eutrophication in water bodies (Wu and Kuo, 2012). The highest MBAS was detected at sampling site fourteen as  $7.79 \text{ mgL}^{-1}$ , while the lowest value was determined at more than one sampling sites as nd (Figure 1, Figure 2j and Table 3). The white foamy appearance and detergent smell at the sampling site 14, which is close to the central region of Aydın, is in line with the high data we obtained. The average MBAS value we determined in the basin is higher than Minareci et al. (2018) (Table 4).

COD is accepted as a useful measure of water quality as it indicates the amount of organic pollutants (Viessman and Hammer, 1998). High COD values are indicative of the pollution of wastewater discharged from residential, agricultural and industrial activities (Bellos et al., 2004; Yılmaz and Koc, 2016). The highest COD was detected as  $128.9 \text{ mgL}^{-1}$  at sampling site fourteen, while the lowest value was determined as nd at sampling site one (Figure 1, Figure 2k and Table 3). We found that the average COD value in the basin was higher than previous studies, and is of the second class water quality determined by TWPCR (2023) (Table 4).

Total inorganic nitrogen (TIN) concentration was obtained by calculating nitrogen values. The highest TIN was determined at sampling site fourteen as  $25.44 \text{ mgL}^{-1}$ , while the lowest value was determined at sampling site six as  $0.041 \text{ mgL}^{-1}$  (Figure 1, Figure 2m and Table 3).

PCA analysis was applied to determine the similarity relationships between water quality variables and the sources of pollutants (Figure 7). Kaiser-Meyer-Olkin (KMO)–Bartlett test and Varimax (Rotation Method) Kaiser normalization were used to determine whether the data set was suitable for PCA. KMO ( $>0.53$ ) - Bartlett's test was  $p=0.000$ , indicating that PCA can be used in the field. Three main components with eigenvalues greater than 1 (3 components extracted) and constituting 73.8% of the total variance were identified for the study area. Factors are classified according to their effect sizes as "strong" ( $>0.75$ ), "moderate" (0.75-0.50) and "weak" (0.50-0.30) (Li et al., 2011). In PC 1 (with 33.87% of the total variance),  $\text{NH}_4\text{-N}$ , MBAS, COD and TP have strong load, while WT has weak positive load. In PC 2 (with 21.85% of the total variance),  $\text{NO}_3\text{-N}$  has strong positive loads,

while  $\text{NO}_2\text{-N}$  and DO have moderate positive load, WT has strong negative load, and pH has moderate negative load. PC 1 and PC 2 refer to the impact of anthropogenic studies such as agricultural activities, agricultural fertilizers, leather and textile industry, olive oil factories, domestic and industrial wastes. PC 3 showed strong positive load for EC and Salt as 18.09%, WT and DO showed weak positive load. PC 3 points to climatic and biochemical processes.

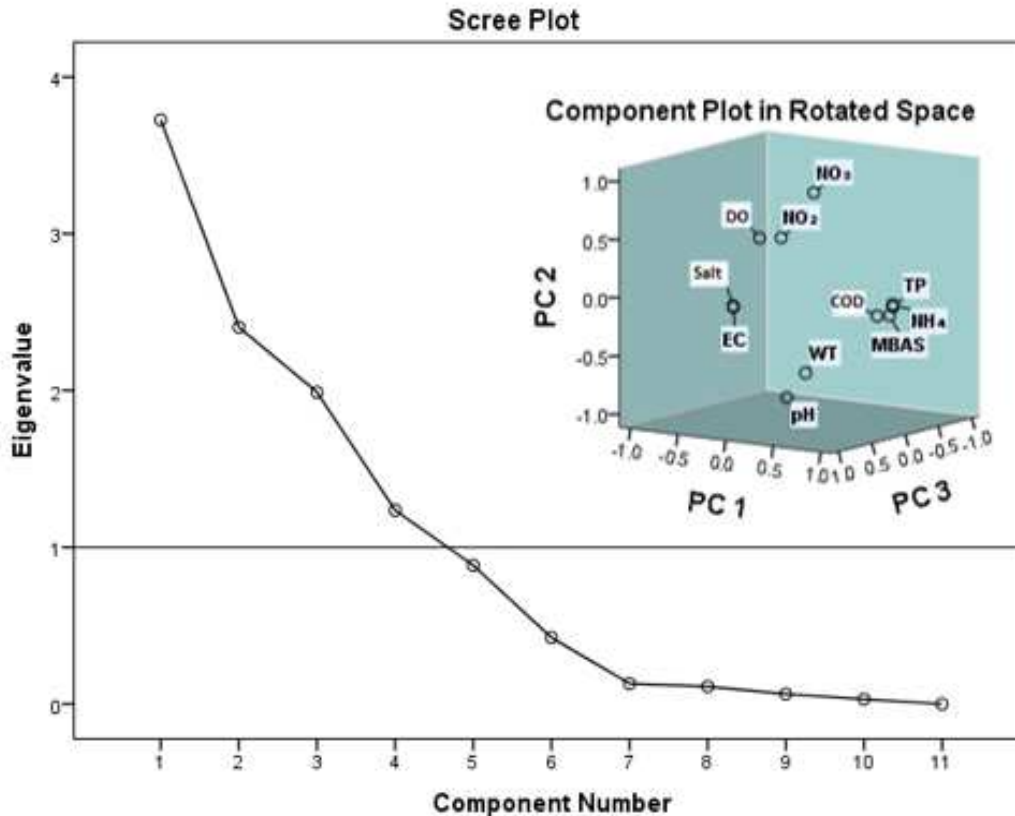


Figure 7. PCA analysis of water variables.

### 3.2. Water quality index (WQI) and Comprehensive pollution index (CPI) results

The smallest WQI value obtained in the study was 38.82 at sampling site fourteen, and the highest WQI was determined at sampling site six as 92.35 (Figure 8 and Table 6). However, the lowest CPI value was 0.39 at sampling site sixteen and the highest CPI was detected at sampling site fourteen as 9.62 (Figure 8 and Table 6). The distribution of the obtained WQI and CPI values in GIS is given in Figure 9. The most important result seen in Figure 8, Figure 9, Table 6 is that the results of both indices were not found to be compatible. Therefore, the use of a single index may not be sufficient to determine the quality or pollution of water and may not give accurate results. However, when the basin is evaluated regionally, both indices point to 3 main regions in total. The first of these is located between sampling sites one and seven located in the a rural area and partially agricultural. Human activities are not very intense at these points. The second region is located between sampling sites eight and fifteen. This area is directly and indirectly affected by the population density of Aydın and Denizli provinces. There are more than one environmental activity (mainly domestic, industrial and agricultural) in the second region. The third region is between the sampling sites sixteen and nineteen. In this region, which is close to the marine area, mostly the effect of domestic wastes and agricultural activities is seen (Figure 1 and Figure 9). However, the existence of many small streams affecting the basin and pouring into the sea with the main river should not be ignored. It is thought that natural or wastewater coming from these areas will be effective in the instant and point changes of the data. In addition, water quality parameters in areas close to the sea may be diluted with sea water. Considering all these factors, it is seen in the GIS map as well as the data that the CPI gives more understandable and certain results together with the results obtained (Figure 9).

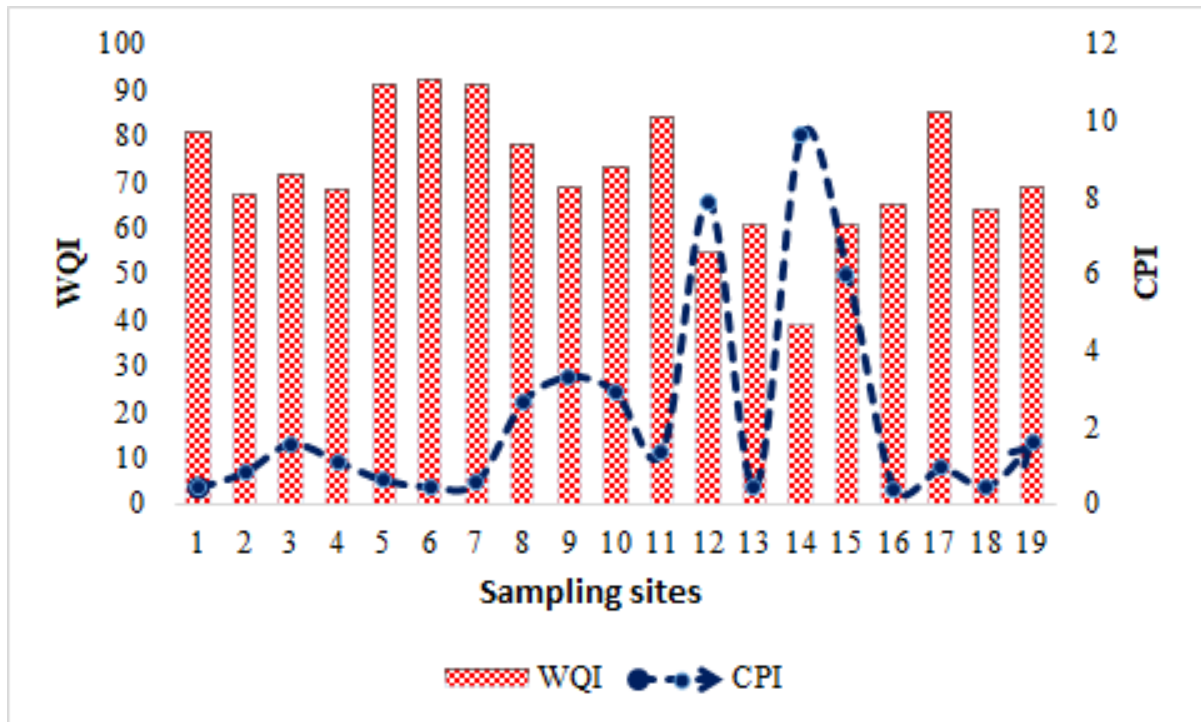


Figure 8. WQI and CPI results of the study area.

Table 6. WQI and CPI results obtained in the study

Sampling sites	CPI	Sampling sites	WQI
1	0.43 (slightly polluted)	1	80.59 (good)
2	0.82 (slightly polluted)	2	67.06 (medium)
3	1.57 (medium polluted)	3	71.76 (good)
4	1.10 (medium polluted)	4	68.24 (medium)
5	0.62 (slightly polluted)	5	91.18 (excellent)
6	0.44 (slightly polluted)	6	92.35 (excellent)
7	0.56 (slightly polluted)	7	91.18 (excellent)
8	2.66 (heavily polluted)	8	78.24 (good)
9	3.31 (heavily polluted)	9	68.82 (medium)
10	2.92 (heavily polluted)	10	72.94 (good)
11	1.36 (medium polluted)	11	84.12 (good)
12	7.90 (heavily polluted)	12	54.71 (medium)
13	0.43 (slightly polluted)	13	60.59 (medium)
14	9.62 (heavily polluted)	14	38.82 (bad)
15	5.98 (heavily polluted)	15	60.59 (medium)
16	0.39 (Sub clean)	16	65.29 (medium)
17	0.93 (slightly polluted)	17	85.29 (good)
18	0.46 (slightly polluted)	18	64.12 (medium)
19	1.59 (medium polluted)	19	68.82 (medium)



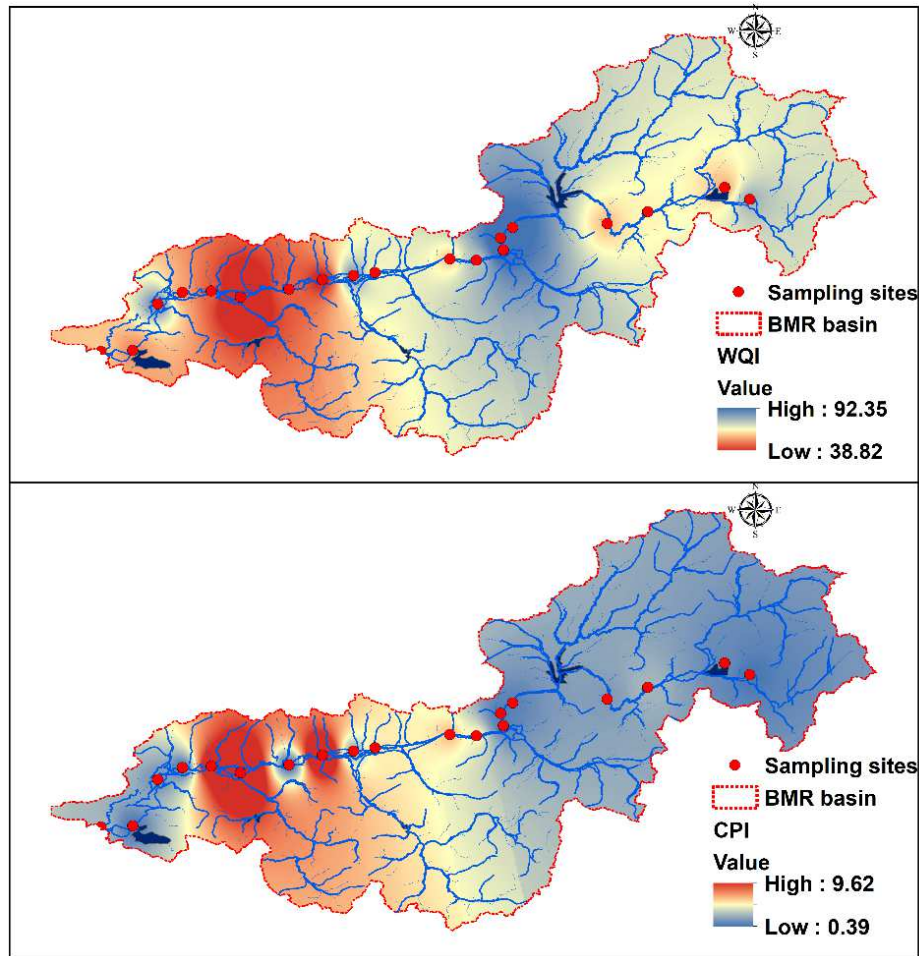


Figure 9. GIS maps of WQI and CPI results.

In this study, WQI and CPI indices were used as dependent variables and water quality parameters were used as independent variables in MLR analysis. With the calculated WQI and CPI values, the WQI and CPI values that can be created as a model can be estimated. In addition, MLR is effective in determining the parameter that most affect the change in water quality. WQI and CPI model summary obtained in the basin is given in Table 7 and Table 8.

Table 7. Model Summary of WQI (BMR).

Model Summary <sup>f</sup>						
Model	R	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Std. EE	Durbin-Watson	ANOVA <sup>f</sup> WQI (BMR)
1	0.756 <sup>a</sup>	0.572	0.564	0.0959896		0.000 <sup>a</sup>
2	0.965 <sup>b</sup>	0.932	0.929	0.0387152		0.000 <sup>b</sup>
3	0.980 <sup>c</sup>	0.961	0.959	0.0295758	1.96	0.000 <sup>c</sup>
4	0.986 <sup>d</sup>	0.972	0.970	0.0250531		0.000 <sup>d</sup>
5	0.988 <sup>e</sup>	0.976	0.974	0.0236260		0.000 <sup>e</sup>

a-b-c-d-e-f; Predictors, (Constant): a) NH<sub>4</sub>-N b) NH<sub>4</sub>-N, DO c) NH<sub>4</sub>-N, DO, COD d) NH<sub>4</sub>-N, DO, COD, NO<sub>2</sub>-N e) NH<sub>4</sub>-N, DO, COD, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N f) Dependent Variable: WQI (BMR)

NH<sub>4</sub>-N by itself showed a high correlation ( $r=0.756$ ,  $r=0.916$ ) with WQI and CPI according to the model summary (Table 7 and Table 8). This shows that among the measured parameters, the most important parameter affecting WQI and CPI in the basin is NH<sub>4</sub>-N. Intensive agricultural activities in the region, domestic and industrial wastes, use of agricultural fertilizers and pesticides and other discharges are thought to be effective in the increase of NH<sub>4</sub>-N. Potential pollutants added to the river water as a result of these activities may progress in the basin and reach the marine area.



**Table 8.** Model Summary of CPI (BMR).

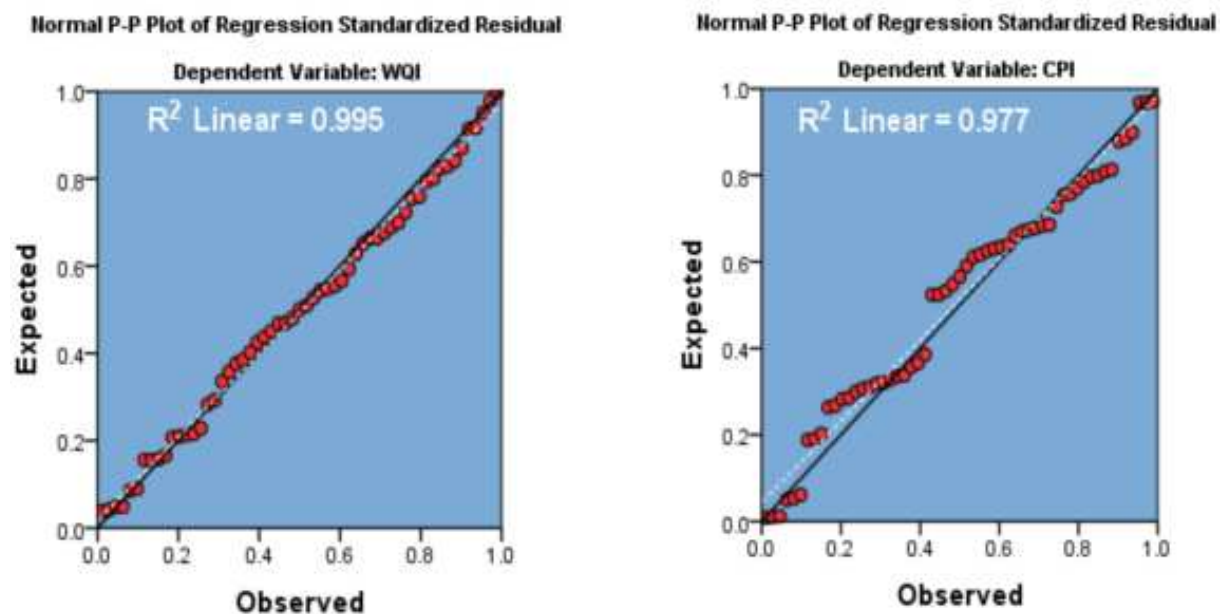
Model Summary <sup>e</sup>						
Model	R	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Std. EE	Durbin-Watson	ANOVA <sup>c</sup> CPI (BMR)
1	0.916 <sup>a</sup>	0.838	0.835	0.3026464		0.000 <sup>a</sup>
2	0.932 <sup>b</sup>	0.868	0.863	0.2756120	1.969	0.000 <sup>b</sup>
3	0.980 <sup>c</sup>	0.961	0.958	0.1519576		0.000 <sup>c</sup>
4	0.983 <sup>d</sup>	0.967	0.964	0.1412761		0.000 <sup>d</sup>

a-b-c-d; Predictors, (Constant): a) NH<sub>4</sub>-N b) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N c) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, TP d) NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, TP, COD e) Dependent Variable: CPI (BMR)

It is seen that there are significant relationships from model to model ( $p=0.000$ , Table 6 and Table 7). Considering the independent variable values, the following regression equations for WQI and CPI were obtained mathematically ( $r=0.988$ ,  $r=0.983$ ).

$$\text{WQI(BMR)}=3.2-0.4\text{NH}_4\text{-N}+0.08\text{DO}-0.02\text{COD}-0.07\text{NO}_2\text{-N}-0.04\text{NO}_3\text{-N}$$

$$\text{CPI(BMR)}=-0.60+0.82\text{NH}_4\text{-N}+1.85\text{NO}_2\text{-N}+1.10\text{TP}+0.03\text{COD}$$



**Figure 10.** Graphic distribution of observed and predicted WQI-CPI values (Normal p-p plot of regression standardized residual).

The appearance of the WQI-CPI created as a model and the calculated WQI-CPI values are shown in Figure 10. In this graph, where the normality of the residual values is tested, it is seen that the calculated and estimated WQI values are quite close to each other ( $r^2=0.995$ ,  $r^2=0.977$ ). Since the calculated and predicted values are  $r^2>0.97$ , the graphs created show that the WQI and CPI models are important.

#### 4. CONCLUSION

It is very important to determine and monitor the water quality of the BMR basin, which is one of the most important rivers of Türkiye. When the study area is evaluated in terms of water quality, it can be divided into three regions. The first region is rural and quieter, the second region is under the influence of more than one activity and is more affected, while the third region is close to the marine area and represents mostly agricultural work. However, it is thought that many natural and wastewater pollutants that reach the marine area by merging with the mainstream may influence the parameters. In our study, according to TWPCR (2023), it was determined that more than one parameter was in the second class, NH<sub>4</sub>-N and TP were in the third class water quality. It was determined that there was an obvious detergent contamination especially at the sampling point fourteen (Entrance of Aydın city

center). WQI and CPI were used since different water quality parameters create confusion in interpretation. WQI values were determined as “Bad-excellent” in the basin, and CPI was determined between “Sub clean and heavily polluted”. Spatial distribution maps in GIS were found to be effective in interpretation. However, it is thought that CPI values and maps give more understandable and certain results. By creating a model with MLR analysis, it was determined that the most important parameter affecting the indices was  $\text{NH}_4\text{-N}$ . As a result of the conducted analyses and calculations, it is thought that the region is under potential environmental risks.

According to the results obtained, it is seen that BMR, which is located in a very large basin, is under the pressure of many pollutants, especially agricultural, industrial, and domestic pollutants. In order to prevent risks and potential pollution in this area, integrated basin management should be established and carried out effectively with relevant institutions and organizations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study reports part of the results obtained within the Ph.D. thesis of Miss Nigar Zeynalova obtained at Muğla Sıtkı Koçman University, Graduate School of Natural and Applied Sciences.

## FUNDING

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

## CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nigar Zeynalova, Mustafa Döndü, and Feyyaz Keskin performed the sample collection, laboratory process, interpretation of the data, and writing the paper. Ahmet Demirak contributed to sample collection, supervision, interpretation of the data, methodology, and writing-review & editing paper.

## ETHICAL STATEMENTS

Not applicable.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data used during the current study are available from the corresponding author on a reasonable request.

## REFERENCES

- Akçay, H., Oğuz, A., & Karapire, C. (2003). Study of heavy metal pollution and speciation in Buyak Menderes and Gediz river sediments. *Water research*, 37(4), 813-822. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00392-5)
- Aksever, F., & Büyüksahin, S. (2017). Assessment of variations in water quality using statistical techniques: a case study of Işıklı Lake, Çivril/Denizli, Turkey. *Arabian Journal of Geosciences*, 10(6), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s12517-017-2877-4>
- Akyıldız, G. K., & Duran, M. (2021). Evaluation of the impact of heterogeneous environmental pollutants on benthic macroinvertebrates and water quality by long-term monitoring of the buyuk menderes river basin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(5), 1-23. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08981-8>
- Algül, F., & Beyhan, M. (2020). Concentrations and sources of heavy metals in shallow sediments in Lake Bafa, Turkey. *Scientific reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68833-2>
- Aminu, M., Matori, A. N., Yusof, K. W., Malakahmad, A., & Zainol, R. B. (2015). A GIS-based water quality model for sustainable tourism planning of Bertam River in Cameron Highlands, Malaysia. *Environmental Earth Sciences*, 73(10), 6525-6537. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3873-6>

- APHA. (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington: In American Public Health Association (APHA).
- Basatnia, N., Hossein, S. A., Rodrigo-Comino, J., Khaledian, Y., Brevik, E. C., Aitkenhead-Peterson, J., & Natesan, U. (2018). Assessment of temporal and spatial water quality in international Gomishan Lagoon, Iran, using multivariate analysis. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(5), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6679-2>
- Bellos, D., Sawidis, T., & Tsekos, I. (2004). Nutrient chemistry of river pinios (Thessalia, Greece). *Environment International*, 30(1), 105-115. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00153-3)
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (1992). Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. pp.188.
- Bulut, C., Atay, R., Uysal, K., & Köse, E. (2012). Çivril Gölü Yüzey Suyu Kalitesinin Değerlendirilmesi. *Anadolu University of Sciences & Technology-C: Life Sciences & Biotechnology*, 2(1).
- Chapman, D., Kimstach, V. (1996). Water Quality Assessments, A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring. WHO by F & FN Spon, London
- Çondur, F., & Cömertler, N. (2010). Çevre Kirliliği ve Yoksulluk İlişkisi: Büyük Menderes Havzası Örneği. *Ekonomi Bilimleri Dergisi*, 2(2), 65-72. (in Turkish).
- Döndü, M., Özdemir, N., Demirak, A., Doğan, H. M., Dincer, N. G., & Keskin, F. (2022). Seasonal assessment of the impact of fresh waters feeding the Bay of Gökova with water quality index (WQI) and comprehensive pollution index (CPI). *Environmental Forensics*, 1-13. <https://doi.org/10.1080/15275922.2022.2081889>
- Durkan, N., Işıloğlu, M., Kabar, K., & Doğan, Y. (2008). Heavy metal levels in some macrofungi from Büyük Menderes river basin, Turkey. *Natura Montenegrina, Podgorica*, 7(2) 465-473.
- Durmaz, E., Kocagöz, R., Bilacan, E., & Orhan, H. (2017). Metal pollution in biotic and abiotic samples of the Büyük Menderes River, Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4274-4283. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6417-7>
- Elassassi, Z., Ougrad, I., Bedoui, I., Kara, M., El Bouch, M., Assouguem, A., ... & Chaouch, A. (2022). Spatial and Temporal Variations of the Water Quality of the Tiflet River, Province of Khemisset, Morocco. *Water*, 14(12), 1829. <https://doi.org/10.3390/w14121829>
- EPA. (1971). Nitrogen, nitrate (colourimetric, Brucine) by spectrophotometer. Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastes, United States Environmental Protection Agency, Approved for NPDES and SDWA, Method 352.1.
- Esen, S. E., & Hein, L. (2020). Development of SEEA water accounts with a hydrological model. *Science of the Total Environment*, 737, 140168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140168>
- Ewaid, S. H., Abed, S. A., & Kadhum, S. A. (2018). Predicting the Tigris River water quality within Baghdad, Iraq by using water quality index and regression analysis. *Environmental Technology & Innovation*, 11, 390-398. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.06.013>
- Gazzaz, N. M., Yusoff, M. K., Ramli, M. F., Aris, A. Z., & Juahir, H. (2012). Characterization of spatial patterns in river water quality using chemometric pattern recognition techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 64(4), 688-698. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.032>
- Gong, G., Mattevada, S., O'Bryant, S.E. 2014. Comparison of the accuracy of kriging and IDW interpolations in estimating groundwater arsenic concentrations in Texas. *Environmental research* 130, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.12.005>
- Gülcü-Gür, B., & Tekin-Özan, S. (2015). The Investigation of heavy metal levels in water and sediment from Işikli Lake (Turkey) in relation to seasons and physico-chemical parameters. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 3(2), 87-96. <https://doi.org/10.3153/JAEFR17012>
- Hurley, T., Sadiq, R., & Mazumder, A. (2012). Adaptation and evaluation of the Canadian Council of Ministers of the Environment Water Quality Index (CCME WQI) for use as an effective tool to characterize drinking source water quality. *Water Research*, 46(11), 3544-3552. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.061>

- Kara, Y., Kara, I., & Basaran, D. (2004). Investigation of some physical and chemical parameters of water in the Lake Isikli in Denizli, Turkey. *International J. Agriculture and Biol*, 6(2), 275-277.
- Koca, S., Koca, Y. B., Yildiz, Ş., & Gürcü, B. (2008). Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. *Biological Trace Element Research*, 122(3), 276-291. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8078-3>
- Kocer, M. A. T., & Sevgili, H. (2014). Parameters selection for water quality index in the assessment of the environmental impacts of land-based trout farms. *Ecological Indicators*, 36, 672-681. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.09.034>
- Kükrer, S., & Mutlu, E. (2019). Assessment of surface water quality using water quality index and multivariate statistical analyses in Saraydüzü Dam Lake, Turkey. *Environmental monitoring and assessment*, 191(2), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7197-6>
- Li, S., Li, J., & Zhang, Q. (2011). Water quality assessment in the rivers along the water conveyance system of the Middle Route of the South to North Water Transfer Project (China) using multivariate statistical techniques and receptor modeling. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 306-317. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.043>
- Matta, G., Kumar, A., Nayak, A., Kumar, P., Kumar, A., & Tiwari, A. K. (2020). Water quality and planktonic composition of river Henwal (India) using comprehensive pollution index and biotic-indices. *Transactions of the Indian National Academy of Engineering*, 5(3), 541-553. <https://doi.org/10.1007/s41403-020-00094-x>
- Minareci, O., & Çakir, M. (2018). Adıgüzel Baraj Gölü'nde (Denizli/Türkiye) deterjan, fosfat, bor ve ağır metal kirliliğinin belirlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(1), 61-67. (in Turkish).
- Minareci, O., Çakir, M., & Minareci, E. (2018). The study of surface water quality in Büyük Menderes River (Turkey): determination of anionic detergent phosphate boron and some heavy metal contents. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(4), 5287-5298. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1604\\_52875298](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1604_52875298)
- Olsen, R. L., Chappell, R. W., & Loftis, J. C. (2012). Water quality sample collection, data treatment and results presentation for principal components analysis—literature review and Illinois River watershed case study. *Water research*, 46(9), 3110-3122. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.028>
- Osman, A. G., & Kloas, W. (2010). Water quality and heavy metal monitoring in water, sediments, and tissues of the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) from the River Nile, Egypt. *Journal of Environmental Protection*, 1(04), 389. <https://doi.org/10.4236/jep.2010.14045>
- Özdemir, N., Demirak, A., & Keskin, F. (2014). Quality of water used during cage cultivation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Bereket HES IV Dam Lake (Muğla, Turkey). *Environmental monitoring and assessment*, 186(12), 8463-8472. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4030-0>
- Özdemir, N., Perkaş, M., & Döndü, M. (2022). Evaluation of Surface Water Quality Parameters by Multivariate Statistical Analyses in Northern Coastal Line of Gökova Bay (Muğla, Turkey). *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 81-91.
- Özdemir, N., Dokuyucu, A., Ceviz, N. A., Döndü, M., Demirak, A., & Keskin, F. (2023). A comparative assessment of the lagoons with water quality indexes and based on GIS: A study on the Aegean Sea and Mediterranean Sea. *Environmental Forensics*, 1-23. <https://doi.org/10.1080/15275922.2023.2218661>
- Pesce, S. F., & Wunderlin, D. A. (2000). Use of water quality indices to verify the impact of Córdoba City (Argentina) on Suquia River. *Water research*, 34(11), 2915-2926. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00036-1)
- Ram, A., Tiwari, S. K., Pandey, H. K., Chaurasia, A. K., Singh, S., & Singh, Y. V. (2021). Groundwater quality assessment using water quality index (WQI) under GIS framework. *Applied Water Science*, 11(2), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s13201-021-01376-7>
- Rounds, S. A., Wilde, F. D., & Ritz, G. F. (2013). Dissolved oxygen (ver. 3.0). *US Geological Survey Technology Water Resources Investment*, 9-A6.



- Rostami, A. A., Isazadeh, M., Shahabi, M., & Nozari, H. (2019). Evaluation of geostatistical techniques and their hybrid in modelling of groundwater quality index in the Marand Plain in Iran. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 34993-35009. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06591-z>
- Singh, K. P., Malik, A., & Sinha, S. (2005). Water quality assessment and apportionment of pollution sources of Gomti river (India) using multivariate statistical techniques-a case study. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 355-374. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.006>
- Son, C. T., Giang, N. T. H., Thao, T. P., Nui, N. H., Lam, N. T., & Cong, V. H. (2020). Assessment of Cau River water quality assessment using a combination of water quality and pollution indices. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 69(2), 160-172. <https://doi.org/10.2166/aqua.2020.122>
- Sun, X., Zhang, H., Zhong, M., Wang, Z., Liang, X., Huang, T., & Huang, H. (2019). Analyses on the temporal and spatial characteristics of water quality in a seagoing river using multivariate statistical techniques: A case study in the Duliujian River, China. *International journal of environmental research and public health*, 16(6), 1020. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061020>
- SYGM. (2018). Tarım ve Orman Bakanlığı, Su Yönetimi Genel Müdürlüğü, Havza Koruma Eylem Planlarının Nehir Havzası Yönetim Planlarına Dönüştürülmesi için Teknik Yardım, Büyük Menderes Nehir Havzası Yönetim Planı, 222s. (in Turkish).
- Şener, Ş., Şener, E., & Davraz, A. (2017). Evaluation of water quality using water quality index (WQI) method and GIS in Aksu River (SW-Turkey). *Science of the Total Environment*, 584, 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.102>
- Şimşek, A., & Mutlu, E. (2023). Assessment of the water quality of Bartın Kışla (Kozcağız) Dam by using geographical information system (GIS) and water quality indices (WQI). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(20), 58796-58812. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26568-3>
- Şimşek, A., Türkten, H., & Bakan, G. (2022). Evaluation of water quality of the middle black sea region, kızılırmak and yeşilirmak rivers using water quality index and statistical analysis. *The Black Sea Journal of Sciences*, 12(2), 645-662.
- Tekin Özan, S., & Aktan, N. (2012). Relationship of heavy metals in water, sediment and tissues with total length, weight and seasons of *Cyprinus carpio* L, 1758 from Işıklı Lake (Turkey). *Pakistan Journal of Zoology*, 44(5), 1405-1416.
- Tibebe, D., Kassa, Y., Melaku, A., & Lakew, S. (2019). Investigation of spatio-temporal variations of selected water quality parameters and trophic status of Lake Tana for sustainable management, Ethiopia. *Microchemical Journal*, 148, 374-384. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.085>
- TS266. (2005). *Water Intended for Human Consumption*. Institution of Turkish Standards Publications (Türkiye).
- TWPCR. (2023). Turkish Water Pollution Control Regulation Official Gazette. No: 32091, (publication date:1/2/2023. Türkiye (in Turkish).
- Valentini, M., dos Santos, G. B., & Muller Vieira, B. (2021). Multiple linear regression analysis (MLR) applied for modeling a new WQI equation for monitoring the water quality of Mirim Lagoon, in the state of Rio Grande do Sul—Brazil. *SN Applied Sciences*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04005-1>
- Viessman, W., & Hammer, M. J. (1998). *Water supply and pollution control*. Pearson Education, New Jersey.
- Wang, J., Liu, G., Liu, H., & Lam, P. K. (2017). Multivariate statistical evaluation of dissolved trace elements and a water quality assessment in the middle reaches of Huaihe River, Anhui, China. *Science of the total environment*, 583, 421-431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.088>
- Wu, E. M. Y., & Kuo, S. L. (2012). Applying a multivariate statistical analysis model to evaluate the water quality of a watershed. *Water Environment Research*, 84(12), 2075-2085. <https://doi.org/10.2175/106143012X13415215906979>
- Wu, Z., Wang, X., Chen, Y., Cai, Y., & Deng, J. (2018). Assessing river water quality using water quality index in Lake Taihu Basin, China. *Science of the Total Environment*, 612, 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.293>



- Yang, W., Zhao, Y., Wang, D., Wu, H., Lin, A., & He, L. (2020). Using principal components analysis and IDW interpolation to determine spatial and temporal changes of surface water quality of Xin'anjiang river in Huangshan, China. *International journal of environmental research and public health*, 17(8), 2942. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082942>
- Yang, S., Liang, M., Qin, Z., Qian, Y., Li, M., & Cao, Y. (2021). A novel assessment considering spatial and temporal variations of water quality to identify pollution sources in urban rivers. *Scientific reports*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87671-4>
- Yılmaz, E., & Koç, C. (2016). Organic pollution of the Büyük Menderes River, Turkey and effects on aquaculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11493-11506. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6397-7>
- Yılmaz, E., Koç, C., & Gerasimov, I. (2020). A study on the evaluation of the water quality status for the Büyük Menderes River, Turkey. *Sustainable Water Resources Management*, 6(6), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s40899-020-00456-x>
- Yilgor, S., Kucuksezgin, F., & Ozel, E. (2012). Assessment of metal concentrations in sediments from Lake Bafa (Western Anatolia): An index analysis approach. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(3), 512-518. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0699-3>
- Zeinalzadeh, K., & Rezaei, E. (2017). Determining spatial and temporal changes of surface water quality using principal component analysis. *Journal of Hydrology: Regional Studies*, 13, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2017.07.002>
- Zhong, M., Zhang, H., Sun, X., Wang, Z., Tian, W., & Huang, H. (2018). Analyzing the significant environmental factors on the spatial and temporal distribution of water quality utilizing multivariate statistical techniques: a case study in the Balihe Lake, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29418-29432. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2943-9>
-

## Effects of inactivated *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, and Poly I:C on mRNA Expression Levels of CXCL-10 and CXCL-9 Genes in Japanese Flounder

İnaktive Edilmiş *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda* ve Poly I:C'nin Japon Pisi Balığındaki CXCL-10 ve CXCL-9 Geninin mRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkileri

Ergi Bahrioğlu<sup>1\*</sup>, Hidehiro Kondo<sup>2</sup>, Ikuo Hirono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Eğirdir Fisheries Faculty, Isparta University of Applied Sciences, Isparta-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Laboratory of Genome Science, Graduate School of Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo-JAPAN

\*Corresponding Author: [ergibahrioglu@isparta.edu.tr](mailto:ergibahrioglu@isparta.edu.tr)

Received: 19. 07.2023

Accepted: 21.08.2023

Published: 01.00.2024

**How to Cite:** Bahrioğlu, E., Kondo, H., & Hirono, I. (2024). Effects of inactivated *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, and Poly I:C on mRNA expression levels of CXCL-10 and CXCL-9 gene in Japanese flounder. *Acta Aquatica Turcica*, 19(0), 000-000. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1312305>

**Abstract:** The present study accomplished the successful cloning and sequencing of the *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes found in the spleen cDNA of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Additionally, the tissue distribution of these two genes was examined at the zero-hour mark. Through qRT-PCR analysis, it was observed that the expression of *JfCXCL10\_L* closely mirrored that of *IL1-β*, displaying an upregulation following the application of Poly I:C (Viral mimic) and formalin-killed *Edwardsiella tarda* (Gram-Negative mimic), while showing a downregulation after the application of formalin-killed *Streptococcus iniae* (Gram-Positive mimic) treatment. This finding strongly suggests a role for *JfCXCL10\_L* in the immune response to viral and gram-negative bacterial stimuli. Regarding *JfCXCL9\_L*, mRNA levels were found to be significantly downregulated after FK<sub>CET</sub> and FK<sub>CSi</sub> treatments, though to varying extents. Interestingly, at specific time points, *JfCXCL9\_L* levels were even lower compared to Poly I:C treatment. These intriguing results shed valuable light on the immune response mechanisms and potential functions of both *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* in the context of the Japanese flounder's immune system.

### Keywords

- CXC Motif
- Chemokine
- Poly I:C
- *Paralichthys olivaceus*
- Expression

**Özet:** Bu çalışma, Japon pisi balığının (*Paralichthys olivaceus*) dalak cDNA'sında *JfCXCL9\_L* ve *JfCXCL10\_L* genlerinin başarılı bir şekilde klonlandığını ve dizilendiğini bildirmektedir. Bu iki genin dokulardaki dağılımları da herhangi bir stimulant uygulanmadan önce (0h) belirlenmiştir. Ayrıca, qRT-PCR analizi, *JfCXCL10\_L* ekspresyonlarının *IL1-β* ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Poly I:C ve formalinle öldürülmüş *Edwardsiella tarda* (FK<sub>CET</sub>) uygulamasından sonra artan ekspresyon seviyesi gösterirken, formalinle öldürülmüş *Streptococcus iniae* (FK<sub>CSi</sub>) uygulamasından sonra azalan ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir. Bu durum, *JfCXCL10\_L*'nin viral ve gram-negatif bakteriyel uyarılara karşı bağışıklık tepkisinde rolü olduğunu düşündürmektedir. *JfCXCL9\_L* mRNA düzeyleri, FK<sub>CET</sub> ve FK<sub>CSi</sub> uygulamalarından sonra anlamlı derecede düşmüştür. Özellikle belirli zaman noktalarında, *JfCXCL9\_L* düzeyleri Poly I:C uygulamasına kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular, *JfCXCL9\_L* ve *JfCXCL10\_L*'nin Japon pisi balığında bağışıklık tepkisi mekanizmaları ve potansiyel işlevleri konusunda bilgi sunmaktadır.

### Anahtar kelimeler

- CXC Motifi
- Kemokin
- Poly I:C
- *Paralichthys olivaceus*
- Gen Ekspresyonu

## 1. INTRODUCTION

In aquaculture, the successful production and cultivation of a species require specific target traits, such as high disease resistance, rapid growth rate, temperature and salinity tolerance, good meat quality, and high feed conversion efficiency (Sanchez et al., 2008). Among these attributes, disease resistance holds significant importance as diseases pose a serious challenge across all aquaculture species. The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of the most important commercial



marine species commonly found along the Japanese coast. Apart from being harvested, it is also cultivated through aquaculture practices. Various research efforts are being conducted, including initiatives to strengthen natural stocks (Sekino et al., 2003; Watanabe et al., 2006), as well as studies on sexual manipulation since the discovery that female individuals reach market size faster (Yamamoto, 1999). With the advancement of aquaculture (Seikai, 2002), comprehensive investigations have been initiated to explore the metabolism (Yagi & Oikawa, 2014; Imai et al., 2020; Kim, 2022), disease (Hirono et al., 2007; Jung et al., 2020; Zhang et al., 2017), genome (Nakamura et al., 2021; Zhao et al., 2021), and immunity (Kondo et al., 2021) of Japanese flounder. The Japanese flounder, during egg production and other breeding processes, is vulnerable to various viral, bacterial, and protozoan pathogens. It is well-known that mortalities are high during the growth phase due to viral, bacterial, and parasitic diseases (Sanchez et al., 2008).

Fish combats diseases through their immune system. The immune system also consists of innate and adaptive immune systems. The first response to disease generally occurs by the innate immune system (Riera Romo et al., 2016). The adaptive immune system acts highly specific to the specific pathogen in case of the continuous presence of pathogens (Alberts et al., 2002). The innate immune system has to provide the first step of protection against many pathogens in living organisms. The innate immune system executes its duty through diverse types of pathogen recognition receptors (PRRs) (Akira et al., 2006). PRRs recognize the pathogens via their conserved molecular structure, and these conserved structures are called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). These patterns show specific differences among gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, and viruses (Akira et al., 2006). Therefore, different PAMPs are believed to cause different immune responses. A wide range of PAMPs, such as bacterial cell wall contents and viral nucleotides, are usually ligands for Toll-like receptors (TLR) (Li et al., 2017). The Gram-negative bacteria have an outer membrane covering a thin peptidoglycan inner membrane, and this outer membrane is composed of glycolipids, named lipopolysaccharides (LPSs) (Silhavy et al., 2010). The Gram-positive bacteria do not contain a high amount of LPS in their outer membrane as the gram (-) bacteria; therefore, they have a thicker membrane that contains a high amount of peptidoglycan (PGN) and lipoteichoic acid (LTA) (Silhavy et al., 2010; Pietretti et al., 2014).

The immune system generally senses gram-negative bacteria (Hoshino et al., 1999; Mahla et al., 2013), flagellin-containing bacteria (Kumar et al., 2011; Pietretti et al., 2014; González-Stegmaier et al., 2015), peptidoglycans (Mahla et al., 2013; Gillis et al., 2008; Zhang et al., 2014), lipoteichoic acid (Pietretti et al., 2014), or soluble extracellular toxins (Tietze et al., 2006), and viral dsRNA (double-stranded RNA) (Pietretti et al., 2014; Alexopoulou et al., 2007; Don et al., 2012; Hu et al., 2017) by various pathways. Recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by toll-like receptors (TLRs) provides information about the infection type and triggers the immune system to induce the expression of cytokines and chemokines.

Chemokines are chemo-attractants, groups of small cytokines, and they have a crucial role in leukocyte migration in the immune system (Müller et al., 2010; Chen et al., 2013). Chemokines were divided into four sub-family and described in many studies (CC, CXC, CX3C, and XC). Various chemokines were identified in different fish species, and their roles have been characterized to some extent. The role of CXC Chemokine “CXCL10” was newly reported on *Paralichthys olivaceus*, a Japanese flounder (Li et al., 2022). It is revealed that CXCL10 induces immune cell migrations in Japanese flounder as in mammals, such as natural killer cells (NKC), dendritic cells, T cells, and macrophages (Bonecchi et al., 1998). CXCL9 is secreted by T lymphocytes, Natural Killer (NK) cells, dendritic cells, macrophages, eosinophils, and by some non-immune cells such as liver astrocytes, preadipocytes, thyroid, stromal cells, endothelium, tumor cells, and fibroblasts (Cole et al., 1998; Tensen et al., 1999; Ding et al., 2016; Metzemaekers et al., 2018). The role of CXCL9 is known to accumulate  $\gamma\delta$ T (gammadeltaT) cells in mammals that start an autoimmune response to infections, and it is controlled by CXCL9/CXCR3 axis-dependent mechanisms (Valdés et al., 2022).

In this study, we examined CXCL9 chemokine and CXCL10 chemokine mRNA expression levels on various tissues of Japanese flounder induced by various immunostimulants. Poly I:C was used for the viral mimic, formalin killed cell (FKC) of *Streptococcus iniae* was used for the gram-positive bacterial infection mimic, and FKC of *Edwardsiella tarda* was used for a gram-negative bacterial infection mimic.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. cDNA cloning and characterization of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes

A sequence was used for structural analysis of the Japanese flounder CXCL10 Like (*JfCXCL10\_L*) gene from RNA sequence data generated by NGS. Specific primers shown in “Table 1” were designed for PCR confirmation of coding sequences of this gene. The sequence was amplified using RT-PCR, and the *E. tarda* FKC-treated Japanese flounder spleen cDNA library was used as a template. The sequences were amplified with the following PCR conditions: 5 min denaturation step at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and 1 min of extension at 72 °C, and final elongation step at 72 °C for 5 min. Two target genes were detected with 1% EtBr agarose gel electrophoresis, and sequences were confirmed by an automated DNA sequencer ABI 3230 X1 (Applied Biosystems, USA). Then fragments were ligated into the pGEM-T Easy vector (Promega, USA). Plasmids were transformed into *E. coli* competent cell JM109 (Wako, Japan) after ligation. The clones containing the full-length insert of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* were amplified by the colony PCR and verified again by the automated DNA sequencer ABI 3230 X1 (Applied Biosystems, USA). These sequences were used for multiple alignments, phylogenetic tree construction, and further analysis. The tool from NCBI “ORF finder” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) was used to determine the open reading frame of cloned DNA fragments, and amino acid sequences were used for the subsequent analysis.

Predicted signal peptides were detected with the program “SignalP 4.1” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). The NCBI tool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) was used to determine amino acid sequence similarities of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* with the other known CXC Chemokine genes (Accession numbers shown in the phylogenetic tree, Figure 3) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Theoretical molecular weight and isoelectric points were predicted with ExPASy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Unipro UGENE v1.25.0 program (Unipro, Russia, 2017) was used for multiple sequence alignment and constructing a phylogenetic tree with the Neighbor-Joining method (10000 replications of bootstrap). Sequences are accessible on NCBI GenBank via following accession numbers, PP340386 for *JfCXCL9\_L* and PP340387 for *JfCXCL10\_L*.

### 2.2. 0h tissue distribution and expression of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes

#### 2.2.1. Experimental Fish

Fifty individuals of Japanese flounders with an average total length of 7 cm were reared at the Tokyo University of Marine Science and Technology in Japan. The water temperature was kept at 19 - 20 °C for a week before starting to experiment. Fish were fed *ad libitum* with dry commercial pellets once a day for a week. Four tanks were filled with 200 L of continuously filtered artificial seawater, and 12 fish were placed into each tank to represent different experimental groups. An appropriate amount of aeration was provided for each tank, and salinity was kept at 28 ppt at all tanks.

#### 2.2.2. Preparation of immuno-stimulants and tissue sampling

Formalin-killed cells (FKC) of *S. iniae* strain 02 and *E. tarda* strain 54 were used to stimulate the immune system of Japanese flounders. *S. iniae* FKC and *E. tarda* FKC were prepared according to the previous study (Dumrongphol et al., 2009). Poly I:C was dissolved in DEPC-treated water to obtain a final concentration of 1 mg/1 ml.

All fish were injected intraperitoneally with a dosage of 100 µl per fish. Fish were injected with *S. iniae* FKC ( $1 \times 10^{10}$  CFU/ml), *E. tarda* FKC ( $5 \times 10^8$  CFU/ml), Poly (I:C) (1 mg/ml) and PBS as a negative control.

#### 2.2.3. Tissue sampling

Eight tissues (kidney, spleen, intestine, liver, stomach, muscle, heart gill) were collected from 4 fish to construct a 0h (untreated) cDNA library of Japanese flounder. These tissues were used to investigate the tissue distribution of target genes. Three fish were collected from all stimulated groups at 3 hours, 24 hours, and 72 hours post-injection and were killed for tissue sampling. The spleen of each fish was collected into RNALater to construct the cDNA library.

#### 2.2.4. Construction of Japanese flounder cDNA library

RNAiso Plus (Takara Bio, Japan) was used to extract total RNA from all samples, and RNA was purified with an RNeasy® Mini Kit (Qiagen, USA). Purified RNA concentration was measured with Nanodrop Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Japan), and all samples were adjusted to 1000 ng per 20 µl of reaction. A high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems,

USA) was used to reverse transcribe the RNA samples. All procedures were performed following the manufacturer's instructions.

### 2.2.5. RT-PCR, Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR), and statistical analysis

qRT-PCR experiments started after the target length of amplicons was confirmed with RT-PCR. Briefly, *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes amplified from constructed spleen cDNA library of Japanese flounder with P1 and P2 primer sets, respectively. P3, P4, P5, and P6 primer sets were used for qPCR analysis (Table 1), while P5 and P6 were used for control purposes. SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) used for qPCR on StepOnePlus™ Real-time PCR system (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocols. EF1 $\alpha$  was used as an internal control, and all target genes' mRNA expression levels were normalized with EF1 $\alpha$  mRNA expression levels. Afterward, the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used to calculate all mRNA expression levels. Differences in expression levels between the untreated (0h) and the other groups (3h, 24h, and 72h) were determined with a t-test. Statistical analysis was done with R Studio. Differences were considered significant, while p-values were smaller than 0.05.

**Table 1.** Oligonucleotide Primers used in this study.

Primer Names	Forward primer (5 - 3)	Reverse primer (5 - 3)
P1 <i>JfCXCL9_like</i>	GAACGGCTCAGAGTCAACGC	GGTGGCCTGGAGTTAAACACC
P2 <i>JfCXCL10_like</i>	CTACCCCTCACAGTGCTCTG	TCACTGAAGGTGCTTTCGTTAG
P3 <i>JfCXCL9_L_qPCR</i>	ATGCAGCTTTACCCCCAGTC	TCTTTCAGGTGCCCTCTGATTC
P4 <i>JfCXCL10_L_qPCR</i>	TCAAAGTGCTCCTGCTCCTG	CAGAAATTGGTTGCCGGGTAG
P5 <i>JfIL1<math>\beta</math>_qPCR</i>	CAGCACATCAGAGCAAGACAACA	TGGTAGCACCGGGCATTCT
P6 <i>JfEF1<math>\alpha</math>_qPCR</i>	CTCGGGCATAGACTCGTGGT	CATGGTCGTGACCTTCGCTC

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. cDNA Cloning and characterization of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes

cDNA sequence of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes were successfully amplified with designed primers and cloned into the competent cell. The cloned cDNA sequence of *JfCXCL9\_L* showed that it has a 539 bp length, including a 5'-untranslated region (UTR) of 36 bp, 405 bp of ORF encoding 134 amino acids, and a 3'-UTR of 98 bp. The cloned cDNA sequence of *JfCXCL10* showed a 495 bp length, including a 5'-UTR of 122 bp and 285 bp of ORF encoding 94 amino acids acid and a 3'-UTR of 91 bp. These sequences were used for the following bioinformatical analysis. Amino acid sequences derived from the NCBI BLAST database showed that CXCL9 and CXCL10 chemokines have a predicted signal peptide at the N terminus. *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes have 28aa and 20aa lengths of a predicted signal peptide, respectively. Predicted isoelectric points of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes were 10.71 and 9.62; molecular weights were 15.36401 and 10.28315 kDa, respectively.

The structural classification of Chemokines is based on their cysteine residues in amino acid sequences. Typically, chemokines comprise four conserved cysteine residues in mammals, and the first two of these residues specify the subfamily of chemokines. Multiple alignments of several fish species and mammals showed conserved cysteine residues (Figure 2). Six cysteine residues were found in the *JfCXCL9\_L* gene, which is conserved among other fish species, but the mammals have four conserved cysteine residues (Figure 1). The highest ident match of 100% was observed with the predicted nucleotide sequence of “Predicted: *Paralichthys olivaceus* C-X-C motif chemokine 10-like (*LOC109629332*), mRNA” (XM\_020087031.1, NCBI, 2023). On the other hand, the cloned sequence was also matched (99.75%) with “*Paralichthys olivaceus* chemokine CXCL9 (*CXCL9*) mRNA, complete cds” (KU821020.1). Hence, further characterization analysis of this sequence revealed that this mRNA is coding the CXCL9 gene in Japanese flounder.

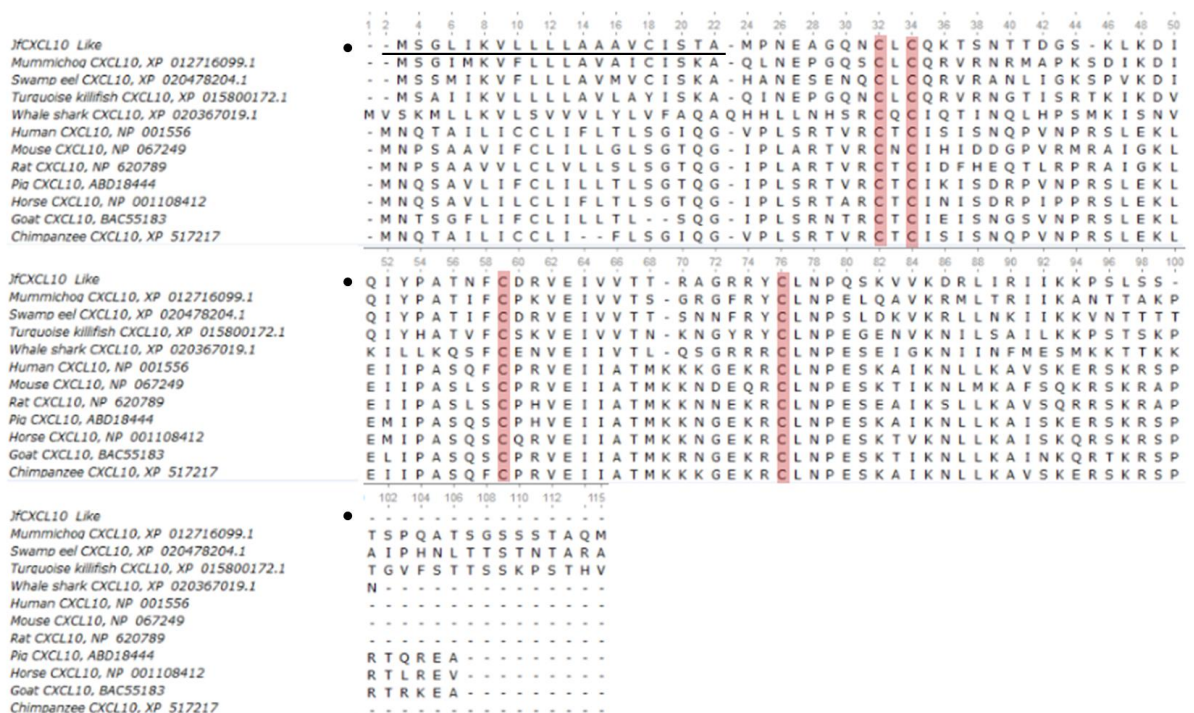
*JfCXCL10\_L* gene in Japanese flounder was found to have four cysteine residues, and they were conserved among the other fish species and mammals (Figure 2). A BLAST search for nucleotide sequence resulted in the highest ident of 100% was observed with the predicted sequence of “*Paralichthys olivaceus* C-X-C motif chemokine 10-like (*LOC109624870*), mRNA” in NCBI database (XM\_020079790.1, NCBI, 2023).



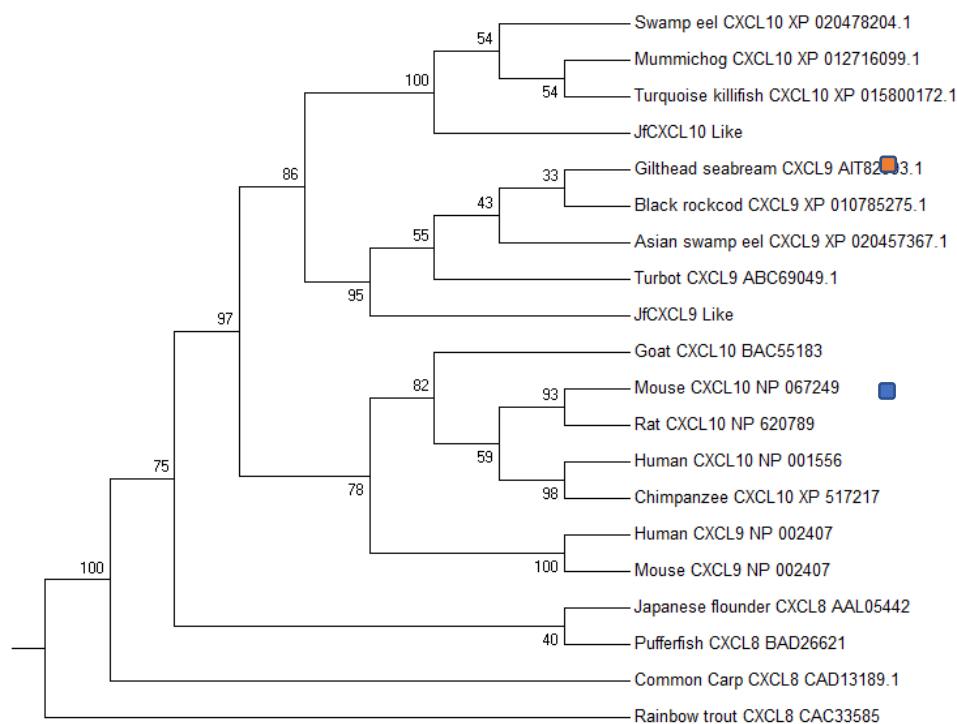
The phylogenetical analysis of amino acid sequences of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* resulted in phylogenetically distinguished clusters between fish and mammalian's CXCL9 and CXCL10 genes (Figure 3).



**Figure 1.** Multiple sequence alignment of known CXCL9 chemokines with Muscle alignment algorithm by using Unipro UGENE v1.25. All amino acid sequences are derived from the NCBI database with accession numbers shown in the figure. Sequence with underlines indicates sign.



**Figure 2.** Multiple sequence alignment of known CXCL10 chemokines with Muscle alignment algorithm by using Unipro UGENE v1.25. All amino acid sequences are derived from the NCBI database with accession numbers shown in the figure. Sequence with underlines indicates sign.

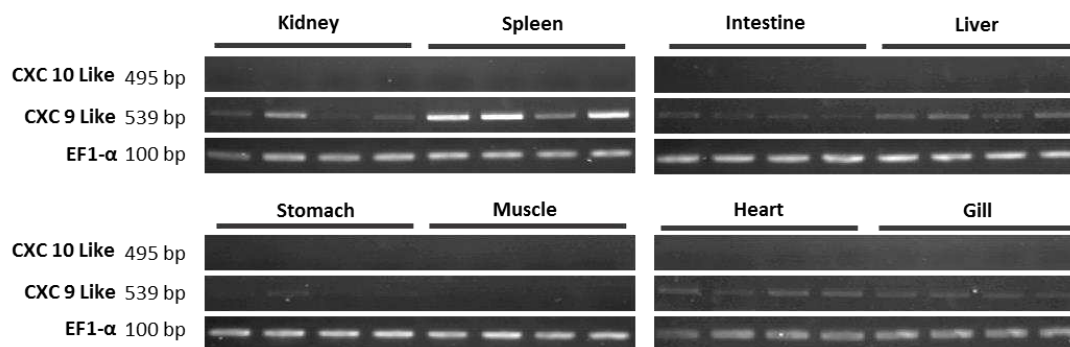


**Figure 3.** Neighbor-joining phylogenetic tree of CXC chemokines belongs to distinct species (bootstrap: 10000 replications). The numbers at the forks indicate the bootstrap value. Sequences used in the phylogenetic tree are derived from the NCBI database.

### 3.2. Expression analysis of JfCXCL9\_L and JfCXCL10\_L genes

#### 3.2.1. RT-PCR analysis of 0h tissue distribution

Japanese flounder kidney, spleen, intestine, liver, stomach, muscle, heart, and gill cDNA libraries from 4 untreated fish were used as 0h templates for RT-PCR assay to determine 0h tissue distribution. Internal control gene *JfEF1 $\alpha$*  was detected in all tissues. *JfCXCL9\_L* mRNA was detectable at 0h in most of the tissues. Very low brightness was observed in stomach tissues, and muscle tissues showed no band. We must mention that *JfCXCL9\_L* mRNA was the brightest in the spleen tissues, indicating that this gene's basal level is possibly related to the immune system. Generally, high basal expression of mRNA levels of a gene in the spleen suggests that the gene is actively transcribed and translated into a protein in the tissue. Given the RT-PCR results, we can assume that *JfCXCL9\_L* is related to the passive immune response as mRNA expression is relatively higher in stress axis organs such as the kidney, spleen, and thymus at no-pathogen exposure (Sayed et al., 2022). It is also mentioned that this gene is downregulated after exposure to a pathogen on carp (Pijanowski et al., 2019) and Atlantic salmon (Boison et al., 2019). *JfCXCL10\_L* was not detectable in all tissues at 0h by RT-PCR (Figure 4). Conversely to *JfCXCL9\_L*, undetected *JfCXCL10\_L* mRNAs at 0h suggest that it is part of an active immune response, as it is reported by Li et al (2022).

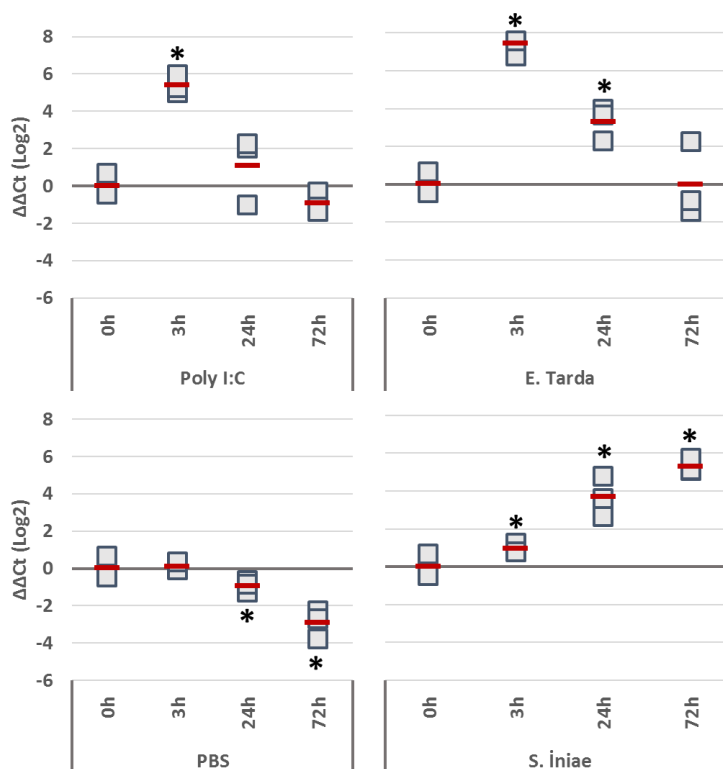


**Figure 1.** mRNA levels of jfCXCL9\_L, jfCXCL10\_L, and EF1 $\alpha$  genes in different untreated (0h) Japanese flounder tissues. Four individuals of fish were used for each tissue.

### 3.2.2. qRT-PCR analysis

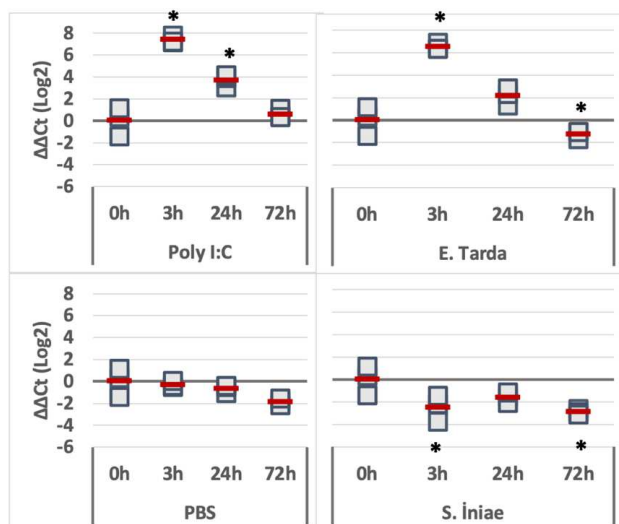
Spleen cDNAs of Japanese flounders were used to conduct qRT-PCR experiments. Interleukin-1 beta (*IL1-β*) mRNA levels were used to compare expression levels of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* mRNAs. mRNA expression levels of three genes at 0h, 3h, 24h, and 72h in the spleen samples were investigated after injection of PBS, Poly I:C, *E. tarda* FK (FKC<sub>ET</sub>), and *S. iniae* FK (FKC<sub>SI</sub>) treatments by qRT-PCR.

*IL1-β* is a cytokine that plays an important role in innate immune response in teleost. *IL1-β* is reported to be primarily secreted by monocytes/macrophages, and the immune response usually includes inflammation, phagocytosis, and the activation of other immune cells. It was reported that the *IL1-β* is upregulated in teleost monocytes/macrophages after Lipopolysaccharide (LPS) stimulation, mimicking gram-negative bacterial infections. Upregulation of *IL1-β* against gram-negative bacteria *E. tarda* and gram-positive *S. iniae* was the expected treatment outcome (Kondo et al., 2014). *IL1-β* upregulation after Poly I:C treatment is also reported in Japanese flounder (Zhou et al., 2014). This study examined *JfIL1-β* mRNA expression levels to determine if the innate immune response was activated in all treated groups. There was more than 5-fold upregulation after all treatments, and upregulation was rapid in Poly I:C and FKC<sub>ET</sub> treatment. However, FKC<sub>SI</sub> treatment has resulted in relatively slow upregulation (Figure 5). These results showed that our treatments were successfully performed in this study.



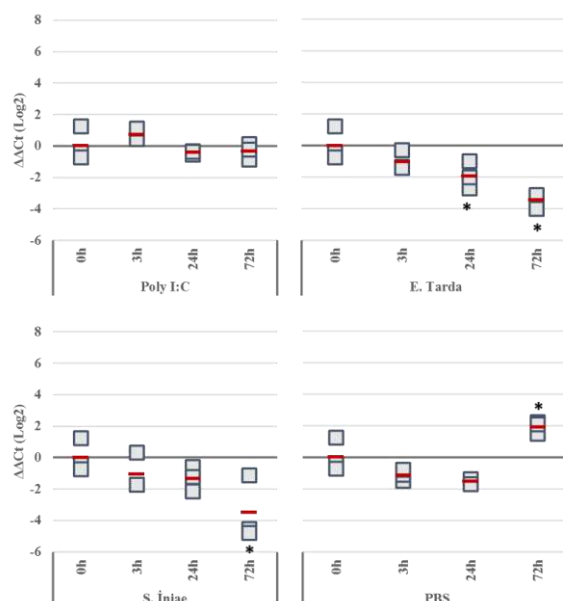
**Figure 5.** Quantitative RT-PCR results represent mRNA expression levels of *IL1 β* under different conditions. Lines on the treatment groups represent the average values of groups. Asterisk (\*) indicates statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) against 0h mRNA expression levels.

*JfCXCL10\_L* mRNA levels were similar to *IL1-β* expressions after Poly I:C and FKC<sub>ET</sub> stimulations. FKC<sub>SI</sub> stimulation has resulted in downregulated *JfCXCL10\_L* mRNA of the Japanese flounder. Zhu et al. (2021) reported various TLR (*PoTLR*) gene mRNA expression levels stimulated by FKC<sub>ET</sub>. It was shown that *PoTLR* expressions were dependent on tissue and time. *PoTLR1*, 5S, 5M, 14, 21, and 22 mRNA expression levels were significant in the spleen. Moreover, the *PoTLR22* mRNA expression pattern seems similar to our *JfIL1-β* and *JfCXCL10\_L* results. Apparently, the significance of upregulation against only Poly I:C and FKC<sub>ET</sub> reveals that *JfCXCL10\_L* is possibly included in the immune response to viral and gram-negative bacterial stimulations in Japanese Flounder.



**Figure 6.** Quantitative RT-PCR results represent mRNA expression levels of *JfCXCL10\_Like* under different conditions. Lines on the treatment groups represent the average values of groups. Asterisk (\*) indicates statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) against 0h mRNA expression levels.

*JfCXCL9\_L* mRNA expression levels were significant only against  $FKC_{ET}$  and  $FKC_{SI}$ . In both cases, *JfCXCL9\_L* mRNA was downregulated to some extent. They were also significantly low after 24h at  $FKC_{ET}$  and 72h at  $FKC_{SI}$ . However, we have found that at the time points of 3h and 24h, mRNA levels after PBS,  $FKC_{ET}$ , and  $FKC_{SI}$  groups showed slightly lower levels of mRNA than the Poly I:C treatment. All groups showed similar expression patterns at the 72h post-injection. However, *JfCXCL9\_L* was also detectable at one of three 0h cDNA libraries by RT-PCR. This gene was found to contribute to antimicrobial protection of the gut during infection by *Citrobacter rodentium* in mice (Reid-Yu et al., 2015). They demonstrated the role of CXCL9 in protecting gut mucosa was not dependent on an adaptive immune response or immunological receptor, CXCR3. These findings also explain the downregulation and 0h tissue distribution of *JfCXCL9\_L*. Downregulation of genes generally occurs after they finish their duty or after they bind to correlated receptors (CXCR3) (Fulkerson & Rothenberg, 2006). Another approach that can be made is the suppression of *JfCXCL9\_L* (Reid-Yu et al., 2015). In both cases, our results suggest that *JfCXCL9\_L* chemokine in Japanese flounder needs further studies for advanced characterization.



**Figure 7.** Quantitative RT-PCR results represent mRNA expression levels of *JfCXCL9\_Like* under different conditions. Lines on the treatment groups represent the average values of groups. Asterisk (\*) indicates statistically significant differences ( $p < 0,05$ ) against 0h mRNA expression levels.



## CONCLUSION

In conclusion, our study successfully cloned and sequenced the cDNA of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* genes in Japanese flounder. Furthermore, qRT-PCR experiments demonstrated that *JfCXCL10\_L* expression mirrored that of *IL1-β*, with upregulation after Poly I:C and FK<sub>CET</sub> treatments and downregulation after FK<sub>CSI</sub> treatment. This suggests a role for *JfCXCL10\_L* in the immune response to viral and gram-negative bacterial stimuli. *JfCXCL9\_L* mRNA levels were significant after FK<sub>CET</sub> and FK<sub>CSI</sub> treatments, showing downregulation to some extent. Notably, at specific time points, *JfCXCL9\_L* levels were lower compared to Poly I:C treatment. These findings shed light on the immune response mechanisms and potential functions of *JfCXCL9\_L* and *JfCXCL10\_L* in Japanese flounder.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors present their acknowledgment to the Japan Student Services Organization (JASSO) for supporting the Corresponding author, and the Tokyo University of Marine Science and Technology (TUMSAT) for their support of the research material.

## FUNDING

This study was supported by the Tokyo University of Marine Science and Technology (TUMSAT) and the Japan Student Services Organization (JASSO).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Planning the study: HK, EB; Literature: EB; Methodology: IH, HK, EB; Performing the experiments: EB; Data analysis: EB; Writing: EB; Supervision: IH, HK. All the authors approved the final draft.

## ETHICAL APPROVAL STATEMENTS

All animal experiments were conducted at the laboratories of TUMSAT (Tokyo, Japan, 2017) according to the guideline issued by the Ministry of the Environment, Japan, and the Tokyo University of Marine Science and Technology's Regulations on the Handling of Animal Experiments.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data available from the corresponding author upon a reasonable request

## REFERENCES

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Innate immunity. In Molecular Biology of the Cell, 4th edition.*, Garland Science, New York, NY, USA.
- Alexopoulou, L., Czopik Holt, A., Medzhitov, R., & Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Boison, S. A., Gjerde, B., Hillestad, B., & Moghadam, H. K. (2019). Genomic and Transcriptomic Analysis of Amoebic Gill Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in Genetics*, 10, 66. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00068>
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., & Borsatti, A. (1998). Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *Journal of Experimental Medicine*, 181(7), 129–134. <https://doi.org/10.1084/jem.187.1.129>
- Chen, J., Xu, Q., Wang, T., Collet, B., Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Xie, P., Nie, P., Secombes, C. J., & Zou, J. (2013). Phylogenetic analysis of vertebrate CXC chemokines reveals novel lineage



- specific groups in teleost fish, *Developmental & Comparative Immunology*, 41, 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.006>
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G., & Neote, K. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 2009–2021. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2009>
- Ding, Q., Lu, P., Xia, Y., Ding, S., Fan, Y., Li, X., Han, P., Liu, J., Tian, D., & Liu, M. (2016). CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Med.*, 5(11), 3246–3259. <https://doi.org/10.1002/cam4.934>
- Don, S., Ohtani, M., Hikima, J., Sung, T., Kondo, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2012). Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 3 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 37, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.12.004>
- Dumrongphol, Y., Hirota, T., Kondo, H., Aoki, T., & Hirono I. (2009). Identification of novel genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.014>
- Fulkerson, P. C., & Rothenberg M. E. (2006). Chemokines, CXC | CXCL9 (MIG). In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.) *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 398–402). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00471-3>
- Gillis, P. L., Mitchell, R. J., Schwalb, A. N., McNichols, K. A., Mackie, G. L., Wood, C. M., & Ackerman, J. D. (2008). Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: Assessing the effect of water hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species, *Aquatic Toxicology*, 88, 37–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.003>
- González-Stegmaier, R., Guzmán, F., Albericio, F., Villarroel-Espíndola, F., Romero, A., Mulero, V., & Mercado L. (2015). A synthetic peptide derived from the D1 domain of flagellin induced the expression of proinflammatory cytokines in fish macrophages, *Fish & Shellfish Immunology*, 47, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.016>
- Hirono, I., Kondo, H., Koyama, T., Arma, N. R., Hwang, J. Y., Nozaki, R., Midorikawa, N., & Aoki, T. (2007). Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NK-lysin, an antimicrobial peptide. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(5), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.003>
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *The Journal of Immunology*, 162, 3749–52. <https://doi.org/10.1038/nri2275>
- Hu, Y., Yoshikawa, T., Chung, S., Hirono, I., & Kondo, H., (2017). Identification of 2 novel type I IFN genes in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.054>
- Imai, S., Tani, T., Ishikawa, Y., Tako, Y., Takaku, Y., & Hisamatsu, S. (2020). Short-term metabolism of biologically incorporated <sup>125</sup>I ingested by olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Environmental Radioactivity*, 214–215, 106161. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106161>
- Jung, J. Y., Kim, S., Kim, K., Lee, B. J., Kim, K. W., & Han, H. S. (2020). Feed and Disease at Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Farms in Korea. *Fishes*, 5(3), 21. <https://doi.org/10.3390/fishes5030021>
- Kim, I. D. (2022). Ontogeny of the Respiratory Area in Relation to Body Mass with Reference to Resting Metabolism in the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846). *Fishes*, 7(1), 39. <https://doi.org/10.3390/fishes7010039>
- Kondo, H., Kawana, Y., Suzuki, Y., & Hirono, I. (2014). Comprehensive gene expression profiling in Japanese flounder kidney after injection with two different formalin-killed pathogenic bacteria. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 437–440. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.038>
- Kondo, H., Kikumoto, T., Yoshii, K., Murase, N., Yamada, H., Fukuda, Y., & Hirono, I. (2021). Effects of Peptidoglycan and Polyinosinic: Polycytidylic Acid on the Recombinant Subunit

- Vaccine Efficacy Against *Edwardsiella tarda* in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathology - J-Stage*, 56(3), 149-155. <https://doi.org/10.3147/jsfp.56.149>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology*, 30, 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Li, H., Sun, Y., & Sun, Li. (2022). A Teleost CXCL10 Is Both an Immunoregulator and an Antimicrobial. *Frontiers in Immunology*, 13, 917697. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.917697>
- Li, Y., Li, Y., Cao, X., Jin, X., Jin, T. (2017). Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cellular & Molecular Immunology*, 14, 80–89. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.50>
- Mahla, R. S., Reddy, M. C., Vijaya Raghava Prasad, D., & Kumar, H. (2013). Sweeten AMPs: Role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00248>
- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., & Proost, P. (2018). Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Frontiers in Immunology*, 8, 1970. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970>
- Müller, M., Carter, S., Hofer, M. J., & Campbell I. L. (2010). The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity - A tale of conflict and conundrum. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36, 368–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01089.x>
- Nakamura, K., Gonzales-Plasus, M. M., Ushigusa-Ito, T. Masuda, R., Kabeya, N., Kondo, H., Hirono, I., Satoh, S., & Haga, Y. (2021). Taurine synthesis via the cysteic acid pathway: effect of dietary cysteic acid on growth, body taurine content, and gene expression of taurine-synthesizing enzymes, growth hormone, and insulin-like growth factor 1 in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sciences*, 87, 353–363. <https://doi.org/10.1007/s12562-021-01500-1>
- Pietretti D., & Wiegertjes G. F. (2014). Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Developmental & Comparative Immunology*, 43, 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.010>
- Pijanowski, L., Verburg-van Kemenade, B. M. L., & Chadzinska, M. (2019). A role for CXC chemokines and their receptors in stress axis regulation of common carp. *General and Comparative Endocrinology*, 280, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.05.004>
- Reid-Yu, S. A., Tuinema, B. R., Small, C. N., Xing, L. & Coombes, B. K. (2015). CXCL9 Contributes to Antimicrobial Protection of the Gut during *Citrobacter rodentium* Infection Independent of Chemokine-Receptor Signaling. *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004648. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004648>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148, 125–139.
- Sanchez, C. C., Kobayashi, K., Coimbra, M. R. M., Fuji, K., Sakamoto, T., & Okamoto, N. (2008). Japanese flounder. In T. D. Kocher, C. Kole (Eds.), *Genome Mapping and Genomics in Animals, Volume 2 Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals* (pp. 135-148). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sayed, R. K. A., Zacccone, G., Capillo, G., Albano, M., & Mokhtar, D. M. (2022). Structural and Functional Aspects of the Spleen in Molly Fish *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846): Synergistic Interactions of Stem Cells, Neurons, and Immune Cells. *Biology*, 11(5), 779. <https://doi.org/10.3390/biology11050779>
- Seikai, T. (2002). Flounder culture and its challenges in Asia. *Reviews in Fisheries Science*, 10, 421–432.
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M., & Yamashita, Y. (2003). Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221, 255–263.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 1-7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

- Tensen, C. P., Flier, J., van der Raaij-Helmer, E. M. H., Sampat-Sardjoeopersad, S., van der Schors, R. C., Leurs, R., Scheper, R. J., Boorsma, D. M., Willemze, R. (1999). Human IP-9: a keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). *Journal of Investigative Dermatology*, 112(5), 716-722. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00581.x>
- Tietze, K., Dalpke, A., Morath, S., Mutters, R., Heeg, K., & Nonnenmacher, C. (2006). Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Periodontal Research*, 41, 447-454. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00890.x>
- Valdés, N., Cortés, M., Barraza, F., Reyes-López, F. E., & Imarai, M. (2022). CXCL9-11 chemokines and CXCR3 receptor in teleost fish species. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 3, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2022.100068>
- Yagi, M., & Oikawa, S. (2014). Ontogenetic phase shifts in metabolism in a flounder *Paralichthys olivaceus*. *Scientific Reports*, 4, 7135 <https://doi.org/10.1038/srep07135>
- Yamamoto, E. (1999). Studies on sex manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*, 173, 235-246.
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G., & Li, X. (2014). Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways, *Fish & Shellfish Immunology*, 41, 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.022>
- Zhang, J., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2017). Isolation and identification of a new strain of hirame rhabdovirus (HIRRV) from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in China. *Virology Journal*, 14, 73. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0742-4>
- Zhao, B., Diao, J., Li, L., Kondo, H., Li, L., & Hirono, I. (2021). Molecular characterization and expression analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) chemokine receptor CXCR2 in comparison with CXCR1. *Developmental & Comparative Immunology*, 120, 104037. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104037>
- Zhou, Z., Zhang, B., & Sun, Li. (2014). Poly(I:C) Induces Antiviral Immune Responses in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) That Require TLR3 and MDA5 and Is Negatively Regulated by Myd88. *PLoS ONE*, 9(11), e112918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112918>
-

## Optimization of Collagen Isolation from Carp (*Carasobarbus luteus*) Scales using Response Surface Methodology

### Sazan (*Carasobarbus luteus*) Pulundan Kolajen İzolasyonunun Yanıt Yüzey Yöntemiyle ile Optimizasyonu

Ümran Cansu<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Harran University, Vocational School of Organized Industrial Zone, Department of Food Processing, Şanlıurfa-TÜRKİYE

\*Corresponding Author: [umrancansu@harran.edu.tr](mailto:umrancansu@harran.edu.tr)

Received: 04.07.2023

Accepted: 10.10.2023

Published: 01.06.2024

**How to Cite:** Cansu, Ü. (2024). Optimization of collagen isolation from Carp (*Carasobarbus luteus*) scales using response surface methodology. *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 140-150. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1322432>

**Abstract:** The scale, which is separated during the mechanical processing of fish, can be used in many other different ways besides the production of collagen products. To obtain high-purity natural collagen, it is necessary to remove non-collagenous proteins and perform demineralization of fish scales. Therefore, the aim of this study is to achieve collagen isolation from common carp (*Carasobarbus luteus*) scales for the production of collagen products with higher efficiency and quality. The demineralization of the scales was optimized using response surface methodology. Experimentally, approximately 89.92±1.10% of the mineral was removed, which closely matched the value predicted by the model. The protein content of the fish scales was increased from 23.12% to 86.16% after the applied procedures. At the end of all the processes, 20.54% of the protein and 3.56% of hydroxyproline (Hyp) were lost. However, the Hyp concentration in the fish scale samples increased from 23.85 to 56.13 mg/g scale, and the Hyp/pro ratio increased from 4.49% to 6.51%. The effective removal of mineral matter, the increase in the amount of Hyp in fish scales, and the increase in the Hyp/pro ratio demonstrate that the applied procedures successfully separate non-collagenous components and achieve collagen isolation.

#### Keywords

- Fish scale
- Collagen isolation
- Optimization
- Hydroxyproline

**Özet:** Balıkların mekanik işlenmesi sırasında ayrılan pullar kolajen ürünleri üretiminin yanı sıra birçok farklı şekilde kullanılabilir. Yüksek saflıkta doğal kolajen elde etmek için, balık pullarının kolajen olmayan proteinlerden arındırılması ve demineralizasyonunu gerçekleştirmek gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı kolajen ürünlerinin üretimi için daha yüksek verim ve kalite için sazan balığı (*Carasobarbus luteus*) pullarında kolajen izolasyonunu sağlamaktır. Pulların demineralizasyonu yanıt yüzeyi metodolojisi ile optimize edilmiştir. Deneysel olarak mineralin yaklaşık 89.92±1.10'i uzaklaştırılmış ve bu, model tarafından tahmin edilen değerle oldukça tutarlı olmuştur. Balık puluna uygulanan işlemler sonucunda protein oranı %23.12'den %86.16'ya kadar çıkarılmıştır. Tüm işlemlerin sonunda proteinin %20.54'ü ve hidroksiprolinin %3.56'sı kaybedilmiştir. Ancak balık pul örneklerinde Hyp konsantrasyonu 23.85'ten 56.13 mg/g pula, Hyp/pro oranı ise %4.49'dan %6.51'e yükselmiştir. Mineral maddenin etkili bir şekilde uzaklaştırılması, balık pulundaki Hyp miktarı ve Hyp/pro oranının artması, uygulanan işlemlerin sonucunda kolajen olmayan bileşenlerin etkili bir şekilde ayrılmasının ve kolajen izolasyonunun sağlandığını göstermektedir.

#### Anahtar kelimeler

- Balık pulu
- Kolajen izolasyonu
- Optimizasyon
- Hidroksiprolin



## 1. INTRODUCTION

Collagen is an important animal-derived connective tissue protein, and its use is increasing in the fields of health, food, cosmetics, and biomaterial industries. The growing demand for collagen in various industries has led to a focus on alternative sources (Jaziri et al., 2022). Collagen isolation from fish processing by-products is considered one of these alternative sources. Approximately 30% of fish processing by-products consist of skin, scales, and bones, with fish scales accounting for about 5% of these by-products. These by-products are rich sources of collagen. Improper disposal of these by-products not only leads to serious environmental pollution but also primarily results in their use as animal feed or fertilizer (Yang et al., 2022). Therefore, it is necessary to optimize the utilization of these by-products, especially in the production of value-added products. In recent years, these fish by-products have gained increasing attention as potential sources of collagen and gelatin. Additionally, fish scales have emerged as bio-composites containing highly regular type I collagen (Fengxiang et al., 2011; Zhang et al., 2020).

Fish scales exhibit variations among species but generally consist of connective tissue proteins, various minerals, and trace amounts of fat. The protein composition of scales, including collagen, keratin, and mucin, ranges from 41% to 84%, while the remaining portion mostly consists of calcium phosphate compounds (hydroxyapatite and calcium carbonate). The amount of hydroxyapatite in fish scales ranges from 38% to 46% (Sankar et al., 2008; Wang & Regenstein, 2009). Fish scales form a highly organized three-dimensional structure primarily composed of type I collagen fibers and hydroxyapatite within the extracellular matrix. The scales consist of two distinct regions: an outer (bone) layer and an inner fibrous plate. The demineralization of scales, particularly the scales located in the outer layer, is a critical step in the production of collagen and its derivatives from fish scales (Fengxiang et al., 2011; Yang et al., 2022). The presence of  $\text{Ca}^{+2}$  ions in the spiral structures of collagen causes relaxation, leading to the breaking of intra- and intermolecular hydrogen bonds in collagen molecules. Moreover, the presence of minerals adversely affects the quality of gelatin, which is the thermal denaturation product of collagen (Feng et al., 2015). In addition, the demineralization pretreatment of fish scales plays a critical role in the isolation efficiency, purity, and quality of collagen products. In the demineralization process of collagen-rich materials like fish scales and bones, EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) and commonly used strong acids such as HCl (Hydrochloric acid) are employed. HCl acid reacts with  $\text{Ca}^{+2}$  ions in mineral substances, resulting in the formation of  $\text{CaCl}_2$ , which is a water-soluble compound. Therefore, HCl acid can be used to react with the calcium salts in scales, enabling their dissolution. However, it is known that strong acids can cause damage to certain protein components in the scales during the demineralization process (Wang & Regenstein, 2009; Cansu & Boran, 2015). To achieve the highest yield and quality in collagen production, it is essential not only to remove minerals but also to minimize collagen loss (Cansu & Boran, 2015).

The objective of this study is to design a procedure for the removal of mineral impurities, the most significant impurity in collagen isolation from fish scales and optimize the conditions to isolate the highest amount of collagen. To achieve this goal, a two-step approach was followed. Firstly, a standard method using 0.1 M NaOH treatment for one hour was employed to remove non-collagenous proteins from fish scales. In the second stage, the demineralization process of scales from the species (*C. luteus*) was optimized using the response surface methodology in HCl solution. A central composite design (CCD) was adopted to investigate the effects of various conditions on demineralization. Protein, hydroxyproline (Hyp), and mineral contents were monitored, and the losses incurred during the applied processes were.

## 2. MATERIAL and METHODS

### 2.1. Material

Carp (*Carasobarbus luteus*) scales were used for collagen isolation. The skin of carp was obtained from local markets in Şanlıurfa, Türkiye. The scales were separated from the fish skin and frozen at  $-22^{\circ}\text{C}$ . The frozen scales were then dried using a freeze-dryer (Armfield Limited-FT33, England) operating at a condenser temperature of  $-35$  to  $-44^{\circ}\text{C}$  and a vacuum pressure of 20 mbar for approximately 18 hours. The dried scales were stored in sealed plastic bags at  $-22^{\circ}\text{C}$ . All chemicals



used in the study were of analytical grade.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Biochemical composition of fish scales

The moisture, protein, fat, and mineral content of the fish scale samples were determined according to AOAC (2000) methods. The protein content of the scale samples was calculated by determining the total nitrogen values using the Kjeldahl method (AOAC method 984.13) and converting them to protein content using a conversion factor of 5.7. The moisture content was determined by drying the scales in an oven (Nüve, NF500, Türkiye) at 105°C until a constant weight was achieved (AOAC method 927.05). The mineral content was determined in both dried scale samples and solutions in a muffle furnace at approximately 550°C for 16 hours (AOAC method 942.05). The fat content of the scales was determined using the solvent extraction method (Soxhlet) with n-hexane as the solvent (AOAC, 2000).

### 2.2.2. Removal of non-collagenous proteins in fish scales

To remove non-collagenous proteins and impurities from fish scales, the scale samples were treated with 0.1 M NaOH at a ratio of 1:25 (w/v) of scales to solution at room temperature (24°C) for 1 hour. The scale samples in the alkaline solution were gently agitated at 15-minute intervals. After the treatment, 25 mL of the alkaline solution containing the dissolved proteins (Pro), hydroxyproline (Hyp), and mineral content was collected and stored at -22°C. For neutralization of the fish scales, the scale samples were washed three times with tap water (1:5, w/v) from the alkaline solution and then drained. To remove excess moisture from the scales, they were frozen at -22°C for 16 hours and subsequently freeze-dried (Boran & Regenstein, 2009).

### 2.2.3. Demineralization Optimization of Fish Scales

Dependent variables and their levels determined for the removal of mineral matter, which is the component with the second-highest proportion in fish scales, are given in Table 1. The dependent variables for the removal of mineral matter in scale samples, namely HCl acid and treatment duration, were selected based on similar studies in the literature and preliminary trial results. The aim of the mineral separation process was to remove the targeted component while minimizing damage to collagen and/or protein and isolating collagen. Accordingly, the dependent variables were defined as the maximum removal of mineral matter and the minimum protein loss. The response surface methodology was employed to determine the conditions that result in the highest removal of mineral matter and the lowest protein loss. For the optimization of mineral matter removal, a central composite design with 2 factors, 3 levels, 2 center points, and 2 replications, requiring a total of 20 experiments, was adopted.

**Table 1.** Dependent variables and their levels selected for collagen isolation from fish scales.

Dependent Variables	Levels		
	-1	0	1
HCl acid concentration (M)	0.1	0.15	0.2
Treatment duration (min) (min)	60	90	120

The dried scale samples obtained after the removal of non-collagenous proteins were used for mineral separation optimization. 10 g of the purified scale samples were transferred to covered erlenmeyer flasks, and HCl acid solution (1/20, w/v) prepared at different concentrations as specified in the experimental design was added to the flasks. The prepared samples were placed in a shaking incubator (Lab-Line, USA) at 25°C and 150 rpm for varying durations as specified in the experimental design. At the end of the process, the volumes of the filtered solutions were measured using a graduated cylinder, and 25 mL of each solution was taken and stored at -22°C until further analysis to determine the protein, Hyp, and removed mineral content. The scale samples from which the solution was removed were washed three times with tap water, left overnight at -22°C, and then dried by freeze-drying.

### 2.2.4. Determination of protein and hydroxyproline content

The protein content (protein loss) in the solutions obtained after both the removal of non-collagen proteins and each trial of demineralization optimization was determined using the Biuret method, as

described by Gornall et al (1949). The protein content of the prepared samples was calculated based on the absorbance values measured at 540 nm after appropriate dilutions were made (Gornall et al., 1949).

The hydroxyproline (Hyp) content was determined in the solutions obtained after the removal of non-collagen proteins and at the optimal mineral separation point, as well as in the dried scale samples obtained at each stage. The method described by Woessner (1961) with some modifications was used to determine the Hyp content in both the solutions and dried scale samples. For the solutions, 2 mL was taken, and for the dried scales, 1 g was taken and hydrolyzed using 5 mL of 6N HCl acid in Pyrex tubes at 130°C in an oven (Nüve, NF500, Turkey). After hydrolysis, appropriate dilutions were made, and the absorbance of the samples was measured at 547 nm using a spectrophotometer (UV-Mini 1240 UV-VIS, Shimadzu, Kyoto, Japan). The Hyp values were calculated based on the absorbance readings (Woessner, 1961).

### 2.2.5. Calculation of protein, hydroxyproline, and mineral substance losses

Protein, Hyp, and mineral losses were calculated throughout the process of collagen isolation from fish scales. The changes in protein and Hyp content were tracked in both the solutions and the extracted samples. The amounts of Hyp and protein transferred to the solutions were determined and compared with the initial amounts present in the samples, resulting in the calculation of percentage losses. The Hyp/pro (%) ratios in the extracted samples were also calculated using equation 1.

$$\text{Hyp/pro (\%)} = \frac{\text{Hydroxyproline (mg/ g scale)}}{\text{Protein amount (mg/ g scale)}} * 100 \quad (1)$$

These calculations allow for the assessment of protein, Hyp, and mineral losses during the collagen isolation process and provide valuable information on the efficiency of the procedure. During the mineral separation stage, the mineral content of the scale samples was monitored, along with the extracts, to verify the removal of mineral substances. This monitoring aimed to confirm that the extracted minerals were effectively removed and that the desired level of separation was achieved (Wang & Regenstein, 2009).

### 2.3. Statistical analyzes

The analyses conducted in the study were performed with a minimum of 3 replications, and the results were presented along with standard deviation rates. The differences between the means of the analysis results were determined using variance analysis (ANOVA) within a 95% confidence interval. JMP 8.0 statistical software (SAS, USA) was used for optimization design, data analysis, regression models, regression terms, and surface graph plotting using the response surface method.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

### 3.1. Optimization of the demineralization process

The experimental results obtained during the mineral separation stage were analyzed using JMP 8.0 software to obtain regression models for each dependent variable. The predicted results based on these regression models, along with the obtained experimental data, are presented in Table 2. The response surface graphs for the experimental results are shown in Figure 1.

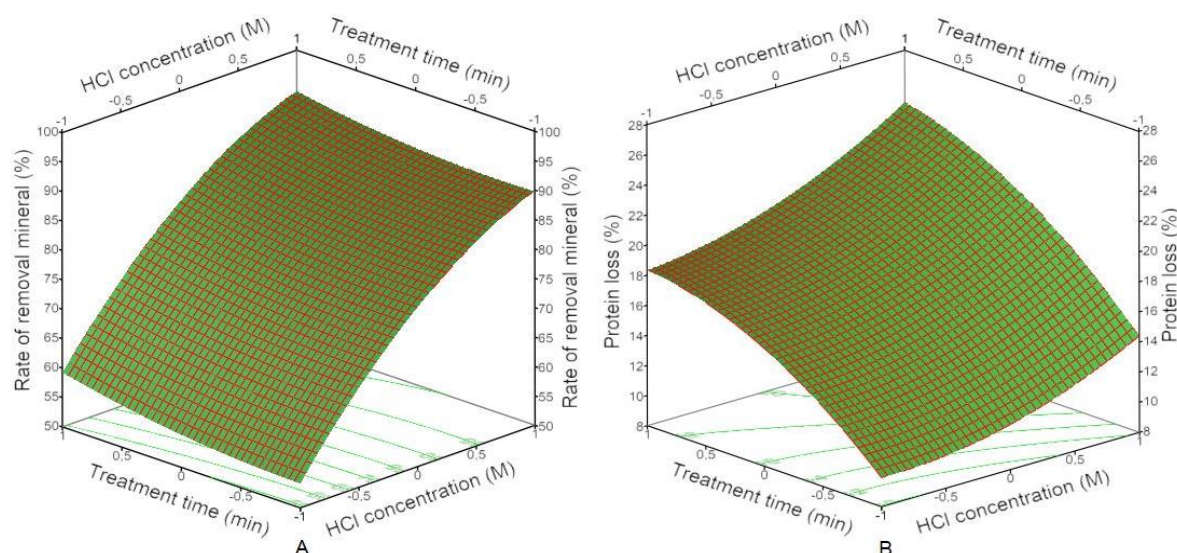
With an increase in HCl concentration, the amount of dissolved mineral substance also increased, independent of the treatment time, and the highest mineral separation was observed at 0.2 M HCl concentration (Table 2, Figure 1). In a study conducted using the scales of mirror carp (*Cyprinus carpio haematopterus*), it was determined that an increase in HCl concentration led to an increase in the removed minerals. However, it was found that there was no statistically significant increase in removed minerals after 1M HCl concentration (Feng et al., 2015). The effect of treatment time, which is the dependent variable, on mineral separation was relatively limited compared to HCl concentration. It was observed that the mineral substance slightly increased with an increased treatment time at a constant HCl concentration, but this increase was not as influential as the HCl concentration variable (Figure 1). In a demineralization study conducted on carp scales, it was found that more than 90% of the existing minerals on the scales were removed when the HCl concentration was as high as 0.1 M (Wang & Regenstein, 2009). The study conducted by Skierka et al. (2007) highlighted that the impact

of treatment time was limited in the demineralization of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fish spine bones using HCl. This suggests that the acid solution quickly encounters the mineral layer due to its location on the outer surface of the fish scales, as also noted by Feng et al. (2015).

**Table 2.** Response surface design for collagen isolation from fish scales, experimental and predicted responses.

Trial	HCl Concentration (M)	Treatment Duration (min)	Mineral Removal (%)		Protein Loss (%)	
			Experimental	Estimated	Experimental	Estimated
1	-1	-1	54.63	54.13	10.07	9.93
2	-1	1	58.37	59.27	19.26	18.37
3	1	-1	91.50	89.87	14.79	14.42
4	1	1	93.36	93.16	23.99	24.58
5	-1	0	56.80	55.55	15.38	15.82
6	1	0	88.50	90.37	22.23	21.17
7	0	-1	77.18	77.07	11.22	10.99
8	0	1	81.02	81.29	20.19	20.29
9	0	0	72.66	78.03	17.68	17.31
10	0	0	83.40	78.03	17.08	17.31
11	-1	-1	53.12	54.13	10.56	9.93
12	-1	1	59.14	59.27	18.00	18.37
13	1	-1	90.03	89.87	13.28	14.42
14	1	1	94.25	93.16	24.16	24.58
15	-1	0	55.84	55.55	14.97	15.82
16	1	0	89.14	90.37	21.90	21.17
17	0	-1	75.68	77.07	10.76	10.99
18	0	1	81.28	81.29	20.86	20.29
19	0	0	75.98	78.03	17.03	17.31
20	0	0	81.65	78.03	16.99	17.31

With the increase in HCl concentration and extension of treatment duration, the protein loss in the scales has also increased, and the highest protein loss was observed to be approximately 24% (Figure 1). In a study conducted by Wang & Regenstein (2009), it was stated that increasing HCl concentration during demineralization with HCl in carp fish scales resulted in an increase in protein loss (Wang & Regenstein, 2009). Since minimizing protein loss and maximizing mineral removal are the desired outcomes in the separation of minerals from fish scales, using a higher concentration of HCl solution and prolonging the treatment duration may seem more effective in removing minerals; however, it also leads to higher protein loss. Therefore, a relatively short duration and high concentration of HCl solution appear to be preferable for the mineral separation process.



**Figure 1.** Surface plots of mineral removal (A) and protein loss (B) in collagen isolation.

The surface plots (Figure 1) for mineral removal and protein loss in collagen isolation show the relationship between HCl acid concentration (M) and treatment duration (min) on the x and y axes, respectively. The z-axis represents the corresponding values for mineral removal (%) and protein loss (%). These plots help visualize how different combinations of acid concentration and treatment duration affect the efficiency of mineral removal and the extent of protein loss during the collagen isolation process.

The statistical data for the model of mineral separation optimization from fish scales is presented in Table 3. The statistical results indicating the model's fit include determination coefficient ( $R^2$ ) and adjusted determination coefficient ( $R^2_{adj}$ ), which range between 0.97 and 0.98. Additionally, the mean square error (RMSE) and the high significance level of the  $p$ -value have been identified. The statistical results regarding the effect of HCl acid concentration as an independent variable on the rate of mineral removal and protein loss reveal that HCl concentration has a significant impact on both mineral removal ( $p < 0.001$ ) and protein loss ( $p < 0.001$ ). The effect of treatment duration on mineral removal ( $p < 0.01$ ) and protein loss ( $p < 0.001$ ) has also been determined.

**Table 3.** Model coefficients and analysis of variance (ANOVA) results for collagen isolation from fish scales.

Model Coefficients	Mineral Removal (%)	Protein Loss (%)
$\beta_0$	78.03	17.31
<b>Linear</b>		
$\beta_1$ (HCl acid concentration)	17.41***	2.67***
$\beta_2$ (Treatment duration)	2.11**	4.65***
<b>Intercept</b>		
$B_{12}$ (HCl acid concentration $\times$ Treatment duration)	-0.46	0.43
<b>Quadratic</b>		
$\beta_{11}$ (HCl acid concentration) <sup>2</sup>	-5.07***	1.19**
$\beta_{22}$ (Treatment duration) <sup>2</sup>	-	-1.67***
$R^2$	0.9770	0.9819
$R^2_{adj}$	0.9688	0.9755
RMSE	2.5303	0.6914
$p$ -value	<0.001***	<0.001***
Desirability	0.88	

**Model:** Mineral removal (%) =  $78.03 + 17.41 \times \beta_1 + 2.11 \times \beta_2 - 5.07 \times \beta_{11}$

Protein loss (%) =  $17.31 + 2.67 \times \beta_1 + 4.65 \times \beta_2 + 1.19 \times \beta_{11} - 1.67 \times \beta_{22}$

Significance levels: \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

The conditions for achieving the highest mineral removal and the lowest protein loss were determined during the optimization of the demineralization process. According to the statistical results obtained from the experimental data during the demineralization stage, the optimal conditions were determined to be an HCl concentration of 0.2 M and a treatment duration of 60 minutes. The desirability value for these conditions was found to be 0.88. Under these specified conditions, the estimated mineral removal rate was found to be  $89.86\% \pm 3.42$ , and the estimated protein loss rate was  $14.41\% \pm 0.94$ .

### 3.2. Hydroxyproline, protein losses and removal mineral rate

The mineral substance ratio, protein, and Hyp losses monitored throughout all the processes applied to fish scales are provided in Table 4. The experimental results of the expelled mineral substance and protein loss rates were determined as  $89.92 \pm 1.10\%$  and  $13.32 \pm 0.30\%$ , respectively (Table 4). After mineral substance optimization, no statistically significant difference was found between the predicted values of the model and the experimental data.

The results of the scale samples obtained after the alkaline treatment and optimal mineral separation process have shown that minerals were effectively removed. In the alkaline treatment applied for the removal of non-collagen proteins and other impurities, a trace amount of mineral substance was removed, resulting in a loss of  $7.22 \pm 0.42\%$  protein and  $1.16 \pm 0.10\%$  collagen. During the optimal mineral separation stage, there was a protein loss of  $13.32 \pm 0.30\%$  and a Hyp loss of  $2.40 \pm 0.07\%$ . Duan et al. (2004) reported that a 0.075 M EDTA solution removed approximately 68% of the minerals in carp scales. Treatment of carp scales with HCl acid ( $>0.1$  M) resulted in the removal of 90% of the minerals, with protein and Hyp losses reported to be around 2% and 5.3%, respectively (Wang & Regenstein, 2009). However, Feng et al. (2015) found that carp scales needed to be soaked in 1M HCl acid for at least 90 minutes to remove over 90% of the minerals.

**Table 4.** Hyp, protein and mineral losses during collagen isolation.

Örnek	Removal mineral (%)	Protein loss (%)	Hyp loss (%)
After alkaline treatment	$0.15 \pm 0.00$	$7.22 \pm 0.42$	$1.16 \pm 0.10$
After optimal HCl treatment	$89.92 \pm 1.10$	$13.32 \pm 0.30$	$2.40 \pm 0.07$

### 3.3. Biochemical composition change and collagen isolation

In the production of collagen products, impurities such as minerals and fats in the raw material can hinder the diffusion of the target protein. As a result, the extraction yield of protein decreases, and the high concentration of impurities adversely affects the quality of the final product (Duan et al., 2004; Cansu & Boran, 2022). Fish scales consist of a hard surface layer composed mainly of calcium-based salts and a fibrous inner layer predominantly made of collagen. Therefore, in the production (extraction) of collagen products, a demineralization step is performed to expose the collagen fibers and facilitate solubility (Pati et al., 2010).

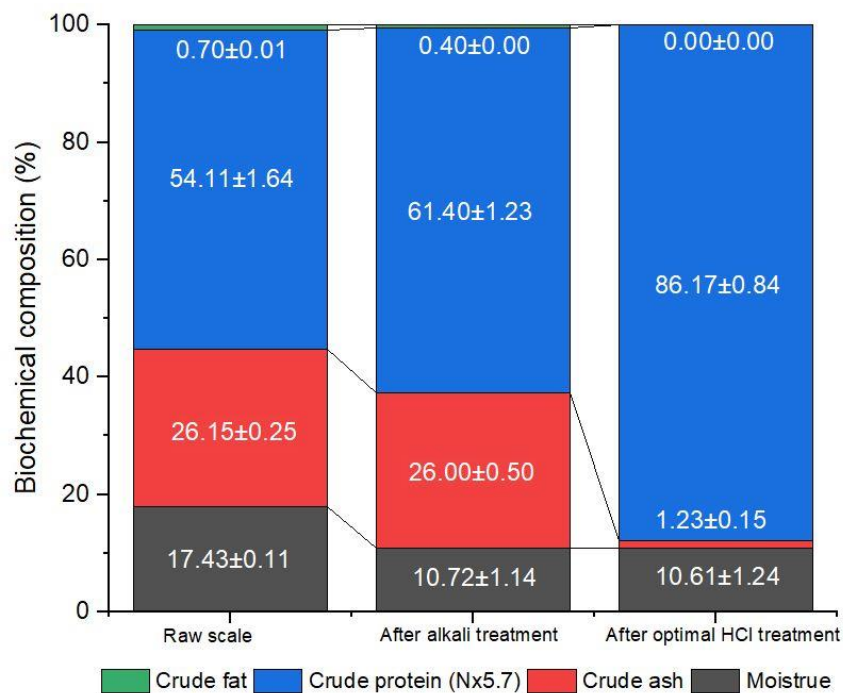
The images and biochemical composition of dried fish scale samples obtained after alkaline treatment and optimal mineral separation are presented in Figures 2 and 3, respectively. It was observed that the protein concentration in fish scales increased from 54% to 86% after all the applied processes. Additionally, the mineral content was successfully reduced from 26% to 1.2%. This indicates the effective removal of the most significant impurity, minerals, from fish scales (Pati et al., 2010). Furthermore, the alkaline treatment and demineralization processes applied to the untreated scale samples resulted in a cleaner appearance and improved processability of fish scales (Figure 2).





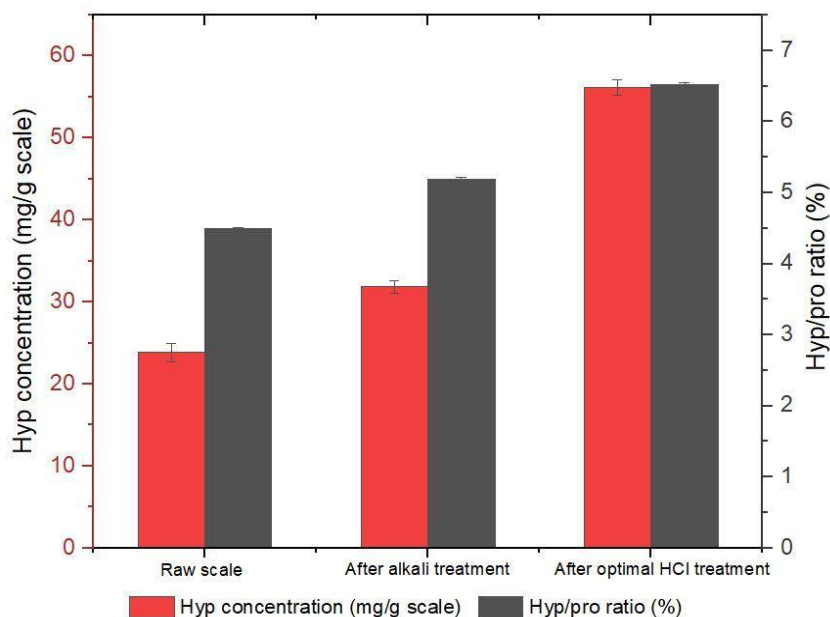
Raw scale                      After alkali treatment                      After optimal HCl treatment

**Figure 2.** Morphological change of fish scales during collagen isolation.



**Figure 3.** Biochemical composition change during collagen isolation.

During the processes applied to the fish scales, the change in Hyp concentration and the Hyp/pro ratio, calculated using protein and Hyp concentrations, were provided (Figure 4). Hydroxyproline (Hyp) is a unique imino acid in collagen and is used for estimating collagen concentration in animal-derived materials (Fratzl, 2008; Tümerkan et al., 2019). Despite the losses in both protein and Hyp during the processes applied to fish scales, Hyp concentration gradually increased. It was determined that the Hyp concentration in fish scales successfully increased from 23.85 to 56.12 mg/g scale through the performed processes. Additionally, the Hyp/pro ratio, which is an indicator of collagen within the total protein after the removal of non-collagen proteins and minerals from the scale samples, increased from 4.49% to 6.51%. These increases in Hyp concentration and Hyp/pro ratio indicate the successful isolation of collagen.



**Figure 4.** Hyp content and Hyp/pro ratio change during collagen isolation.

## 5. CONCLUSION

This study focused on the isolation of collagen from fish scales, which are considered as by-products of fish processing. The aim was to increase the protein content and remove impurities from the fish scales before collagen and its products' production. The conditions for removing mineral substances, which are the second most abundant component in fish scales, were optimized. The mineral separation process of the scales subjected to alkali treatment using a standard method was predicted and optimized using response surface methodology (RSM) by experimental variables of HCl acid concentration (M) and treatment time (minutes). The high correlation of the model demonstrated that the linear model could be used to optimize the demineralization of carp scales. Under the conditions of alkali treatment and optimal mineral separation, it resulted in a 90.07% mineral removal along with 20.55% protein and 3.56% Hyp loss. The total protein in the scale was successfully increased to 86%, and the amount of Hyp in the total protein was raised to 56.12 mg/g scale. This indicates that collagen in fish scales was effectively isolated. Further studies are needed to determine the quality and functional properties of the isolated collagen.

## FUNDING

No financial support was received for the present study.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

This article was written by a single author.

## ETHICAL STATEMENTS

There are no ethical issues with the publication of this manuscript.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings of the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.


## REFERENCES

- Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. M. R., Motta, A., & Fauzi, M. B. (2022). A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: From biosynthesis to bioscaffold. *Biomedicines*, 10(9), 2307. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092307>
- Association of Official American Chemists International (AOAC). (2000). *Official methods of analysis*, 17th Ed., William, H. (ed) Washington, DC.
- Boran, G., & Regenstein, J. M. (2009). Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *Journal of Food Science*, 74(8), E432-E441. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01328.x>
- Cansu, Ü., & Boran, G. (2015). Optimization of a multi-step procedure for isolation of chicken bone collagen. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(4), 431. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.4.431>
- Cansu, Ü., & Boran, G. (2022). Kinetic evaluation of gelatin extraction from chicken skin and the effect of some extraction parameters. *Journal of Food Process Engineering*, 45(4), e13995. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13995>
- Duan, R., Ying, L., & Zhang, Y. (2004). Monitoring the decalcifying process of fish scale by titration. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Sciences Edition)*, 13, 54-6.
- Feng, X., Wenxue, Z., Yuanyuan, Q., & Huaibin, K. (2015). Optimization of demineralization on *Cyprinus carpio haematopterus* scale by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1684-1690. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1164-y>
- Fengxiang, Z., Anning, W., Zhihua, L., Shengwen, H., & Lijun, S. (2011). Preparation and characterisation of collagen from freshwater fish scales. *Food and Nutrition Sciences*, 2(8), 818-823. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.28112>
- Fratzl, P. (2008). Collagen: structure and mechanics, an introduction. In *Collagen: structure and mechanics* (pp. 1-13). Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9>
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751-766. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57021-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6)
- Jaziri, A. A., Shapawi, R., Mokhtar, R. A. M., Noordin, W. N. M., & Huda, N. (2022). Biochemical and microstructural properties of lizardfish (*Saurida tumbil*) scale collagen extracted with various organic acids. *Gels*, 8(5), 266. <https://doi.org/10.3390/gels8050266>
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101(10), 3737-3742. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133>
- Sankar, S., Sekar, S., Mohan, R., Rani, S., Sundaraseelan, J., & Sastry, T. P. (2008). Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(1), 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.08.003>
- Skierka, E., Sadowska, M., & Karwowska, A. (2007). Optimization of condition for demineralization Baltic cod (*Gadus morhua*) backbone. *Food Chemistry*, 105(1), 215-218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.001>
- Tümerkan, E. T. A., Cansu, Ü., Boran, G., Mac Regenstein, J., & Özoğul, F. (2019). Physiochemical and functional properties of gelatin obtained from tuna, frog and chicken skins. *Food Chemistry*, 287, 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.088>
- Wang, Y., & Regenstein, J. M. (2009). Effect of EDTA, HCl, and citric acid on Ca salt removal from Asian (silver) carp scales prior to gelatin extraction. *Journal of Food Science*, 74(6), C426-C431. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01202.x>
- Woessner Jr, J. F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93(2),

- 440-447. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90291-0)
- Yang, H., Wang, H., Huang, M., Cao, G., Tao, F., Shen, Q., ... & Yang, H. (2022). Repurposing fish waste into gelatin as a potential alternative for mammalian sources: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 942-963. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12920>
- Zhang, X., Xu, S., Shen, L., & Li, G. (2020). Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. *Journal of Leather Science and Engineering*, 2, 1-29. <https://doi.org/10.1186/s42825-020-00033-0>
-

## Paraziter Balık Zoonozları

### Parasite Zoonoses Associated with Fish

Ahmet Erdem Dönmez<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Mersin-TÜRKİYE

\*Sorumlu Yazar: [edonmez@mersin.edu.tr](mailto:edonmez@mersin.edu.tr)

Geliş: 07.06.2023

Kabul: 18.09.2023

Yayın: 01.06.2024

**Alıntılama:** Dönmez, A. E. (2024). Paraziter Balık Zoonozları. *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 151-167. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1310942>

**Özet:** Zoonoz hastalıklar hayvanlardan insanlara geçen hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıklar bakteriyel, viral, fungal ve paraziter etkenlerden kaynaklanmakta ve genellikle omurgalı hayvanlardan insanlara geçmektedir. Günümüzde insanlarda görülen hastalıkların yarısından fazlasının zoonotik enfeksiyon ve enfestasyonlar olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle de çok fazla can kaybına ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Zoonoz hastalıklar arasında balık ve kabuklu deniz ürünlerinden kaynaklananlar, dünya genelinde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan birçok ülkede ve çok fazla sayıda insanı risk altına sokması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Kırmızı et tüketiminin kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi potansiyel hastalık durumları ile ilişkilendirilmesi nedeniyle ve dünya nüfusunun artışıyla birlikte su ürünlerine olan talep de artmaya başlamıştır. Bu durumun sonucu olarak da su ürünleri sektörü hem üretim hem de tüketimde devamlı olarak büyüme göstermiştir. Fakat özellikle son yıllarda çiğ veya az pişmiş balık içeren gıdalar da dahil olmak üzere küresel su ürünleri tüketiminin düzenli bir şekilde artması bu zoonozlar arasında su ürünleri kaynaklı paraziter zoonoz hastalık risklerinin de artmasına neden olmaktadır. Bugüne kadar insanlarda su ürünleri ile ilişkili protozoon, trematoda, nematoda ve cestoda'lar dahil olmak üzere çok fazla parazit türü bildirilmiştir. Küresel iklim değişikliğine bağlı olarak bu tür çeşitliliğinin sayısının daha da artması beklenmektedir. Ayrıca bu parazitler arasında *Giardia*, *Toxoplasma*, *Clinostomum* ve *Anisakis* gibi olanlarının küresel bir dağılıma sahip olduğu da tespit edilmiştir. Paraziter hastalıkların halk sağlığı açısından önemi, diğer hastalık etkenlerine kıyasla daha hafife alındığından, su ürünleri kaynaklı paraziter zoonoz etkeninin biyolojileri, bulaşma yolları, yol açtıkları hastalıklar ve kontrolleri konusunda önemli eksiklikler bulunmaktadır. Bu derleme, paraziter balık zoonozlarına dair genel bir değerlendirme sunmayı amaçlamaktadır.

#### Anahtar kelimeler

- Balık
- Enfeksiyon
- Enfestasyon
- Parazit
- Zoonoz

**Abstract:** Zoonotic diseases are defined as diseases transmitted from animals to humans. These diseases are caused by bacterial, viral, fungal, and parasitic agents and generally are transmitted from vertebrate animals to humans. It is reported that more than half of the diseases seen in humans today are zoonotic infections. Therefore these diseases cause a large number of human lives to be lost and large economic losses. Among the zoonotic diseases, those originating from fish and shellfish are considered to be an important public health problem in both developed and developing countries around the world, as they put a large number of people at risk. The demand for seafood has started to increase due to the fact that red meat consumption is associated with potential disease conditions such as cancer and cardiovascular diseases, and the increase in the world population. As a result of these situations, the aquaculture sector has grown continuously in both production and consumption. However, especially in recent years, the steady increase in global consumption of fishery products, including foods containing raw or undercooked fish, causes an increase in the risks of parasitic zoonotic diseases originating from fisheries among these zoonoses. To date, many species of parasites have been reported in humans, including aquaculture associated

#### Keywords

- Fish
- Infection
- Infestation
- Parasite
- Zoonosis





with protozoon, trematoda, nematode and cestode. Due to global climate change, the species diversity is expected to increase even more. It has also been determined that among these parasites, Giardia, Toxoplasma, Clinostomum and Anisakis have a global distribution. Since the importance of parasitic diseases in terms of public health is underestimated compared to other disease agents, the knowledge about biology of the parasitic zoonoses agents originating from fisheries, their transmission routes, the diseases they cause and how they can be controlled is insufficient. This review aims to provide a general overview of parasitic fish zoonoses.

## 1.GİRİŞ

Farklı hastalıkların ortaya çıkmasında ve bulaşmasında hayvanlar ve çevre önemli rollerü stlenmektedir. İnsanları etkileyen bulaşıcı hastalıkların çoğunun hayvan kökenli olduğu tespit edilmiştir. Zoonotik hastalık, omurgalı hayvanlardan insanlara veya insanlardan omurgalı hayvanlara doğal olarak bulaşabilen hastalık veya enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. “Yeni ortaya çıkan hastalıklar için Asya Pasifik stratejisi: 2010” raporunda insan enfeksiyonlarının yaklaşık %60'ının zoonotik olduğu ve bu patojenler arasında %70'ten fazlasının yaban hayatı türlerinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Rahman vd., 2020). Küresel olarak, her yıl zoonoz hastalıklar nedeniyle yaklaşık bir milyar hastalık vakasının ve milyonlarca sayıda ölümün meydana geldiği tahmin edilmektedir. Son otuz yılda 30'dan fazla yeni insan patojeni tespit edilmiş ve bunların %75'inin kaynağının hayvanlar olduğu açıklanmıştır (WHO, 2014). Hayvanlarda bulunan patojenler doğrudan veya bir vektör aracılığıyla insanlara bulaşabilmektedir (Zhang vd., 2022). İnsan popülasyonundaki artış ve sosyoekonomik gelişmeler, popülasyonların yeni ekolojik bölgelere göç etmesine, hayvancılık uygulamaları kaynaklı yeni hastalıkların ortaya çıkmasına ve toplam hastalık yüküne etki edebilecek değişikliklere neden olmaktadır (Macpherson, 2005).

Söz konusu zoonoz hastalıklar arasında paraziter zoonotik hastalıklara da yaygın olarak rastlanmaktadır. Paraziter zoonozların çoğu, insanlarda küresel ölçekte önemli bir hastalık potansiyeline sahip olmasına ve hayvancılık endüstrileri üzerinde önemli düzeyde ekonomik etkilere neden olmasına rağmen yeteri kadar ilgi gösterilmemiş hastalıklar olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda hastalık kaynağı olarak bildirilen 1399 patojen tür içerisinde yer alan paraziter ajanların, 60 adetinin protozoon ve 286 adetinin ise helmint türü olduğu tespit edilmiştir (Woolhouse&Gaunt, 2007). Ayrıca tanı yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak paraziter zoonozlar ile karşılaşma oranının daha da artacağı belirtilmekte ve bazı yeni sendromların da parazitik zoonozlara dahil edilebileceği belirtilmektedir (Torgerson&Macpherson, 2011).

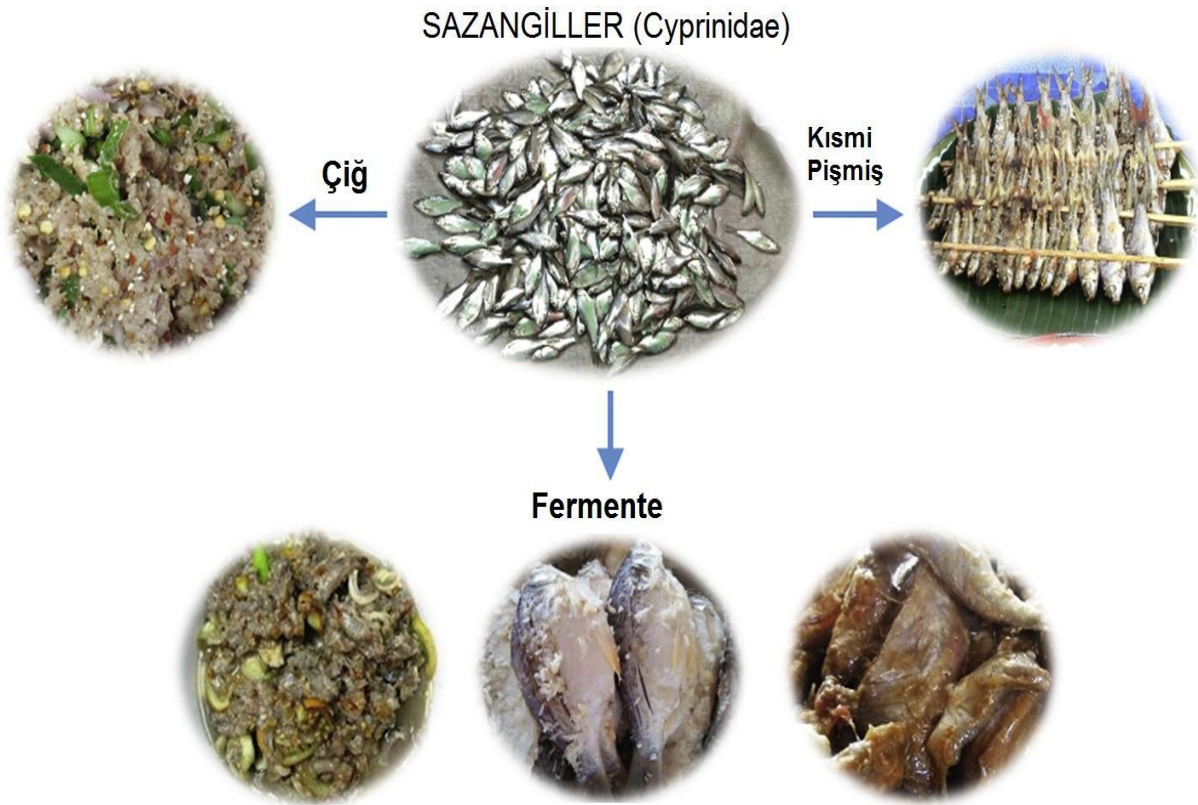
Özellikle, hijyen koşullarına uyulmaması, vektörel bolluk ve hayvan rezervuarları bu tür bulaşmalarda artışlara neden olmaktadır. İklim değişikliği, göç, çevresel değişiklikler, ilaç direnci ve ekonomik faktörler gibi etkenler de sorununun şiddetinin artmasına yol açmaktadır. Daha sağlıklı beslenme alışkanlığı ve çiğ / egzotik balık yemekleri tercihi gibi unsurlar su ürünleri tüketiminde artışa ve bu ürünlerden kaynaklanan hastalık vakalarının görülme sıklığının da yükselmesine neden olmaktadır (Shamsi vd., 2018). Ayrıca yeni parazit türlerinin ve yeni enfeksiyon odaklarının tespitiyle bağlantılı olarak yeni zoonozların ortaya çıktığı da belirtilmektedir (Thompson&Conlan, 2011).

Dünya genelinde balık ve su kaynaklı zoonotik hastalıklar, su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde ve balıkçılıkta da önemli sorunlara neden olmuştur. Artan nüfus ve gelişen küresel su ürünleri ve balık ticareti ile birlikte, çevresel kontaminasyon ve insanlarda balık ve su kaynaklı zoonoz gelişimi riski de artmaktadır. Balık zoonozlarının insidansı; farklı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, balık yemeklerinin yaygın olarak yenildiği ülkelerde çiğ balık tüketimindeki artış, suşi, sashimi ve ceviche gibi çiğ veya minimum düzeyde işlenmiş balıkla hazırlanan yemeklerinin tüketiminin yaygınlaşması, balık ve balık ürünlerinin uluslararası pazarının büyümesi ile su ürünleri yetiştiriciliğinin çok hızlı bir gelişim göstermesi gibi nedenlerden dolayı önemli ölçüde artmıştır (Lima dosSantos&Howgate, 2011). Bu derleme, paraziter balık zoonoz ajanlarına odaklanmaktadır.

### 1.1.Balık Parazitleri ve Paraziter Zoonozları

Parazitler, muhtemelen parazitizmin ilk olarak ortaya çıktığı ortam olan su ekosistemlerinde olağanüstü düzeyde çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilikte; cestodlar, monogeneanlar, trematodlar ve miksozoanlar en bilinen parazitler arasında yer almaktadır (Adlard vd., 2015). Sucul ortamlarda

yaşayan parazitler genellikle konakçılarından daha küçük boyutlarda olmakta ve yaşam evrelerine bağlı olarak belirli bir süre boyunca konakçılarda yaşamaktadırlar. Balıklar, parazitlerin ara konakçısı veya son konakçısı olabilirken, diğer sucul (örneğin deniz memelileri) veya karasal hayvanlar (kuşlar, köpekler) nihai veya kesin konakçı olabilmektedir (Quiazon, 2015). Bununla birlikte, bu parazitlerin bir kısmı, su ürünleri yetiştiriciliği ve gelişmiş ulaşım ve dağıtım sistemleri yoluyla diğer canlı türlerinde de ortaya çıkabilmektedir. Sanayileşmiş ülkelerde özellikle seyahat ve göçler neticesinde suyla taşınabilen son derece dirençli protozoon kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra egzotik hastalıkların da görülebildiği belirtilmektedir (Dorny vd., 2009). Balıklarda tespit edilen bazı parazitlerin (anisakid nematodları, diphyllbothriidean tenyaları, intestinal heterophyid ve opisthorchid karaciğer parazitleri) tüm dünyada en önemli gıda kaynaklı parazitler arasında olduğu kabul edilmektedir (Cong&Elsheikha, 2021). Zoonoz balık parazitleri arasında yüksek insidansları nedeniyle Opisthorchiidae ve Heterophyidae (Trematodea Sınıfı, Digenea alt sınıfı), Anisakidae ve Gnathostomidae (Phylum Nematoda) ve Diphyllbothridae (Cestoda Sınıfı) grubu helmint aileleri ön plana çıkmaktadır. İnsanlar balık kaynaklı parazitleri enfekte çiğ, az pişmiş veya uygun koşullarda korunmamış balıkları tüketerek almaktadır (Lima dosSantos&Howgate, 2011) (Şekil 1). İnsanlarda balık kaynaklı zoonotik enfeksiyon ve enfestasyonlar, kontamine yenilebilir dokuların veya ürünlerin sindirim yoluyla alınmasından veya daha az ölçüde kontamine üretim ile fiziksel temastan kaynaklanabilmektedir. Küresel olarak, balıklardan, yengeçlerden, kerevitlerden, salyangozlardan ve çift kabuklulardan elde edilen 50'den fazla helmint parazit türünün insan enfestasyonları ürettiği tespit edilmiştir ve bunlardan bazıları ciddi sağlık sorunları oluşturabilmektedir (Bardhan, 2022).



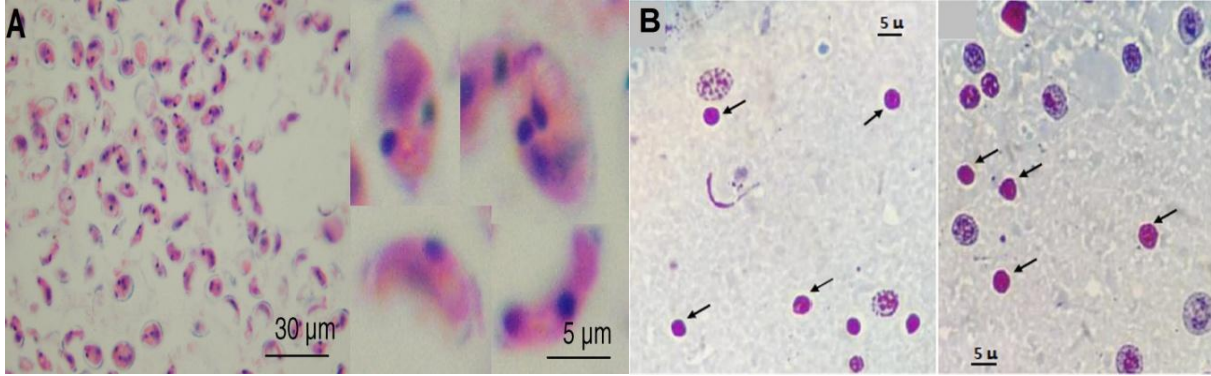
**Şekil 1.** Sazangiller (Cyprinidae) aracılığıyla oluşan zoonotik trematod enfestasyonların bulaşma kaynakları (Saijuntha vd., 2021).

### 1.2.Zoonotik Protozoonlar

Zoonotik protozoonlar olan *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* ve *Toxoplasma gondii* su ortamlarında ve çoğunlukla da kabuklu deniz hayvanlarında bulunmaktadır. Ayrıca bu protozoonlara balık ve diğer sucul canlılarda da rastlanabilmektedir (Moratal vd., 2020). *Giardia*'lar ayrıca çeşitli

omurgalı konakçıları da enfekte eden kamçılı prozoon parazitlerdir (Caccio&Ryan, 2008)(Şekil 2.A). İnsanlarda ve hayvanlarda görülen ishallerin en yaygın nedenlerinden biri olduğu kabul edilmektedir. Deniz ortamlarındaki yaygınlığı, genetik çeşitliliği ve sucul hayvanların bu parazitlerin insanlara bulaşmasında oynadığı rol hakkında çok az şey bilinmektedir. *Giardia duodenalis* A ve B alt gruplarının yunuslar, foklar ve köpekbalıklarının dışkılarından izole edildiği bildirilmiştir (Yang vd., 2010).

*Cryptosporidium* spp. insanlar için balık kaynaklı zoonotik risk olarak da kabul edilmektedir. Dünya genelinde tatlı su, deniz ve akvaryum balıklarında farklı *Cryptosporidium* türleri tanımlanmıştır. 23 tatlı su ve 24 deniz balığı türünde *Cryptosporidium* türlerinin rapor edildiği bildirilmiştir. *C.huwi* ve *C.abrahamseni* ile türün sıçan genotipi sadece tatlı su balık türlerinden izole edilmiştir. Deniz balıklarında ise *C.scophthalmi* ve balıklara özgü olmayan *C.scrofarum* ve *C.xiao* türleri tespit edilmiştir. Ayrıca, yine balıklara özgü *C. molnari* ve *C. bollandi* türleri hem tatlı su hem de deniz balıklarında bildirilmişlerdir. Mevcut sınırlı sayıda araştırmaya dayanan güncel verilere göre, *C.molnari* ve *C.parvum*'un en sık bildirilen türler olduğu ifade edilmektedir. (Golomazou vd., 2021). Parazitin ookistleriyle kontamine olmuş çiğ veya az pişmiş balık etinin tüketilmesi ve balık dışkısı ile dökülen ookistlerle kontamine suyun tüketilmesi yoluyla bulaşma gerçekleşebilmektedir (Robertson vd., 2019)(Şekil 2.B). İshal, kusma, mide bulantısı, iştahsızlık ve kramplar, cryptosporidiosis'in yaygın olarak görülen semptomları arasında yer almaktadır. Ayrıca bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve çocuklarda kronik ve yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir (Ryan vd., 2016; Ryan vd., 2018).



Şekil 2. A. Giardia trofozoid ve kistleri (Yang vd., 2010) B. *Cryptosporidium molnari* ookistleri (Shaapan vd., 2023).

*Toxoplasma gondii*, insanlar, çiftlik hayvanları ve deniz memelileri dahil olmak üzere hemen hemen tüm homioi term hayvanlardan izole edilmiş bir prozoon türüdür. İnsanlarda oluşan enfeksiyon genellikle asemptomatik olup hafif grip benzeri semptomlar gösterebilmektedir. Bununla birlikte toksoplazmoz, bağışıklığı baskılanmış kişilerde yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir (Zhang vd., 2014). Suda yaşayan canlılarda karşılaşılan *T.gondii*'nin kaynağının da karasal ortamlar olduğu düşünülmektedir. Balıklar, *T.gondii* için asıl biyolojik konakçılar olarak kabul edilmemekle beraber, tatlı su akıntıları (kanalizasyon deşarjları, toprak taşkınları gibi) yoluyla deniz ortamına karışan ve böylece mekanik taşıyıcı olarak hareket eden ookistler ile enfeste olabildikleri tespit edilmiştir (Marino vd., 2019). Nehir ağızları ve denizel ortamlar *T.gondii* ookistlerini taşıyan kanalizasyon ve tatlı su akışlarıyla kirlendiğinde özellikle bu ookistler kabuklular tarafından biriktirilebilmektedir. Mikropolimerlerin, bakteriyel biyofilm, algler ve diğer mikroorganizmalarla birleşmesi ile oluşan deniz makroagregatlarında ookistlerin balıklara geçişinde önemli rol oynamakta ayrıca balıkların kendileri de ookistlerin mekanik taşıyıcıları olarak hareket ederek bunları göçleri sırasında yayabilmektedir. Bu durum, çiğ veya az pişmiş kontamine balıkların tüketilmesiyle insanlara *T.gondii* bulaşması anlamına gelmektedir (Moratal vd., 2020).

Bağırsak protozoon paraziti olan *Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu amipli dizanterinin de dünya genelinde her yıl 500 milyon insanı etkilediği ve 55.000'den fazla insanın da ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Özellikle yetersiz sanitasyon ve hijyene sahip yoksul ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Entamoeba, Tayland ve Vietnam gibi Güneydoğu Asya ülkelerinde son zamanlarda

görülen salgınlar nedeniyle balık kaynaklı parazitik zoonoz olarak sınıflandırılmıştır. İnsanlara esas olarak kontamine yiyecek ve su (kistler ve trofozoit taşıyan) ile bulaşsa da, kanalizasyon veya atık suyun karıştığı yetiştirme ortamlarından temin edilmiş balıkların çiğ olarak tüketilmesi ve geleneksel pişirme tekniklerinin uygulanması salgınların ana kaynağı olabilmektedir. Semptomlar dizanteri, kanlı ishal, kusma, karın ağrısının eşlik ettiği dehidratasyonu da içermektedir (Bardhan, 2022).

*Balantidium* cinsi de, yumuşakçalar, eklembacaklılar, balıklar, amfibiler, sürüngenler, kuşlar ve insanlar dahil memeliler gibi çok çeşitli omurgasız ve omurgalı konakçıların sindirim sistemlerinde varlığı bildirilen çok sayıda türe sahip bir protozoon parazittir. Etken bağırsakta bulunmakta ve balıklarda kommensal veya endosimbiont olarak kabul edilmektedir. *Balantidium coli*, insanları, insan olmayan primatları ve domuzları enfekte eden bir tür olup asemptomatik veya ishalle seyredebilmektedir. Tatlı su balıklarında tespit edilmiş 13 türün sekizi Çin'de tanımlanmış ve özellikle *Balantidium ctenopharyngodoni* ve *B.polyvacuolum* türleri ile daha sık karşılaşmıştır. Deniz balıkları arasındada özellikle cerrah balıklarında (*Prionurus punctatus*) daha yaygın olarak bildirilen *Balantidium prionurium* ile farklı dört tür daha tespit edilmiştir (Li vd., 2014; Hajipour vd., 2022).

*Trypanosoma* spp. yalnızca suda yaşayan organizmaları değil insanları da enfekte edebilen parazitik bir protozoonudur. Zoonoz hastalık oluşturdukları kabul edildiğinden, bu parazitin sucul canlılardan izole edilmesi önem düzeyinin artmasına neden olmuştur (Mahasri vd., 2019). Farklı balık türlerinden *Trypanosoma mukasai*, *T.carassii*, *T.punctati*, *T.saulii*, *T.tengarii* türlerinin izolasyonları yapılmıştır (Shavanas, 1999; Gupta vd., 2015; Mahasri vd., 2019; Williams vd., 2022). Tripanozomun yaşam döngüsü, sülüklerin sindirim sisteminde sferomastigot olarak başlamakta ve sülüklerin hortumuna göç ederek epimastigot formuna dönüşmektedir. Daha sonra sülük balıklara tutunduğunda bu form balıkta metatrypanosoma formuna dönüşmektedir (Mahasri vd., 2019). Zoonotik bir parazit olarak kabul edilmekle birlikte balıklardan izole edilen türlerin yol açtığı bir insan enfeksiyonuna dair kayda rastlanmamıştır.

### 1.3. Zoonotik Trematodlar

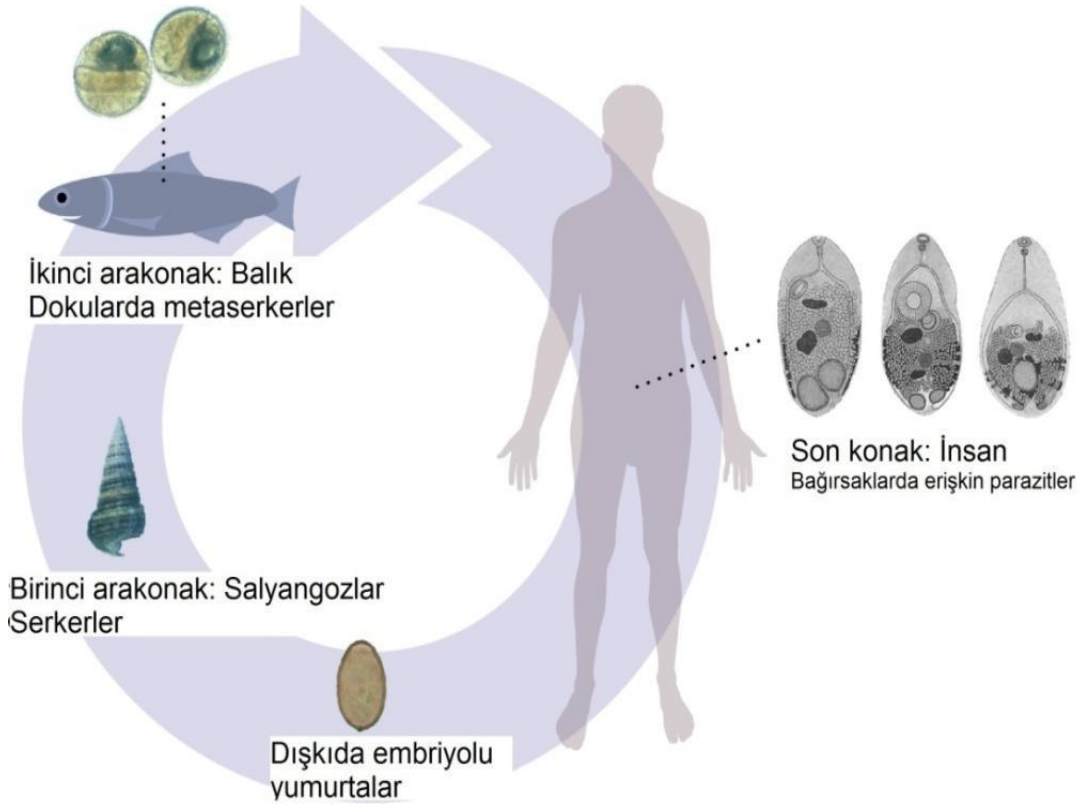
Trematod, Yunanca "deliklerle delinmiş" anlamına gelen trematos kelimesinden gelmektedir. Trematoda, Platyhelminthes filumunun bir sınıfıdır. Enfektif evreleri metaserker (metacercariae) olarak adlandırılan parazitik yassı kurtların çoğunluğunu temsil etmektedir. Karaciğer ve bağırsak kurtları olarak da bilinen türler balık kaynaklı zoonozlarla ilişkili en yaygın trematodlardır (Bardhan, 2022). Balık kaynaklı trematodlarla enfekte olan insan sayısının dünya çapında 18 milyonu aştığı tahmin edilmektedir. Üstelik gelişmiş ülkelerdekiler de dahil olmak üzere risk altındaki insan sayısının yarım milyarı aştığı düşünülmektedir. Balık, kabuklu veya yumuşakçaların tüketimi yoluyla insanlara bulaştığı kaydedilen 33 digenik trematod türünün sadece birkaçı ciddi tehdit oluşturmaktadır. *Chlonorchis sinensis*, *Clinostomum complanatum*, *Heterophyes heterophyes*, *Metagonimus yokogawai*, *Metorchis conjunctus*, *Nanophyetes salminicola*, *Opisthorchis viverrini* ve *Paragonimus* spp. halk sağlığı açısından trematodlar arasında en önemli türler olarak kabul edilmektedir (Chai vd., 2005; Ljubojevic vd., 2015; Bardhan, 2022).

İnsanları enfekte eden balık kaynaklı heterofid (Heterophyidae) trematodların 13 cinsi ve 29 türünün olduğu belirtilmektedir (Chai&Jung, 2017). Heterophyidae familyasına ait olan trematodlar, dünya genelinde dağılım gösterebilen, insanlar dahil olmak üzere, kuş ve diğer memelilerde de bulunan ince bağırsak parazitleridir. Bu familya balık kaynaklı zoonotik trematodlar arasında insanlarda bildirilen en fazla sayıda türe sahiptir. Heterofidlerle enfekte olan insan sayısı ile ilgili kesin bir veri olmamasına rağmen, özellikle Asya'da milyonlarca ifade edilen sayılara ulaştığı belirtilmektedir (Lopes vd., 2020). Heterophyidae ailesinde bulunan trematodlar yaygın olarak Mugilidae (kefaller) ailesindeki balıkları ikinci ara konak olarak kullanmaktadırlar. Ülkemizde parazitin metaserkerine ise Ege denizinde yakalanan has kefalde (*Mugil cephalus*) kas dokusunda rastlandığı belirtilmektedir (Tareen, 1981). Heterophyidae ailesinin en bilinen üyeleri *Heterophyes heterophyes* ve *Metagonimus yokogawai*'dir. İnsanlar çiğ, marine edilmiş veya az pişirilmiş balıkları yiyerek enfekte olmaktadır. Bu digenik trematodlar ince bağırsaklarda iltihaplanma, ülserasyon ve nekroza neden olabilmektedir. Ayrıca, safra kesesi genişlemesinin yanı sıra kolanjit, hepatomegali, periportal sistemin fibrozu, tıkanma sarılığı, kolesistit ve kolelitiazis dahil olmak üzere ağır ve uzun süren enfestasyonlara da yol açabilmektedir (Ljubojevic, 2015). Bunların tümü, ara konak (salyangozlar, balıklar) ile kesin konak (insan, köpek, kedi) kullanmakta ve benzer yaşam döngüleri



göstermektedirler (Mahdy vd., 2021)(Şekil 3). Heterophyidae ailesi üyeleri olan *Pygidiopsis macrostomum* ve *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Digenea: Heterophyidae) türleri de ara konak olarak Lepistes türü balıkları ve kesin konak olarak sırasıyla balık yiyen memeli veya kuşları kullanmaktadır. Her iki türün metaserkerleri tarafından doğal olarak parazitlenen *Poecilia vivipara* türü balıklarda hiçbir dış parazitizm belirtisi görülmemektedir. Bu trematodların temsilcileri farklı coğrafi bölgelerde varlığı tespit edilmiş olsa da morfolojik ve moleküler verilere dayalı tanımlamaları ile yaygınlık ve yoğunluklarının ayrıntılarına dair yeterli bilgi bulunmamaktadır (Borges vd., 2017). *Ascocotyle longa* ise kuzey ve güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Ortadoğu'da geniş bir dağılıma sahip, sucul kuşların ve memelilerin bağırsak paraziti olup balık kaynaklı enfestasyonların etkeni olarak tanımlanmıştır. İnsanlar, *A.longa* metaserkerleri taşıyan çiğ veya az pişmiş tatlı su balıklarını yiyerek enfekte olmaktadır (Rebello vd., 2020). Bu tür ülkemizde de Kızılırmak Deltasında Samsun ili sınırları içerisinde yer alan tatlısu göllerinden yakalanan kefal (*Liza aurata*, *Mugil cephalus*) türlerinden de izole edilmiştir (Özer ve Kırca, 2013; 2015). Az sayıda da olsa bu aileden *Centrocestus formosanus* türünün neden olduğu zoonotik vakalar da bildirilmiştir. Bu duruma ilişkin Tayvan'da deneysel, Çin'de ve Vietnam'da da doğal enfestasyon kayıtları bulunmaktadır (Chai vd., 2013). Ayrıca bu türün ülkemizde de ithal edilen farklı akvaryum balığı türlerinden (*Xiphophorus maculatus*, *Carassius auratus auratus*, *Pterophyllum scalare*, *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus helleri*) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Yıldız, 2005; Şahin Taner & Yavuzcan Yıldız, 2018).

Echinostomatidae familyasına dahil yaklaşık 15 trematod türünün de insanları enfekte ettiğine dair kayıtlar bulunmaktadır. Başlıcalarının *Echinostoma hortense* ve *Echinochasmus japonicus* olduğu balık kaynaklı 11 adet *Echinostoma* türünün olduğu belirtilmektedir. İnsanlarda tespit edilen *Echinostoma* enfestasyonlarının çoğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinde gözlemlenmiştir. Ülkemizde tatlı su balıklarında Echinostomatidae metaserkerlerinin varlığına dair kayıt bulunmamaktadır (Pekmezci vd., 2017). Hastalık genellikle hafif semptomlar göstermekle birlikte *E.hortense* enfestasyonunda mide veya duodenumda ülserasyonlar ve kanamalar da oluşabilmektedir (Chai vd., 2005).



Şekil 3. Balık kaynaklı zoonotik heterofid trematodların ortak yaşam döngüsü (Chai&Jung, 2017).



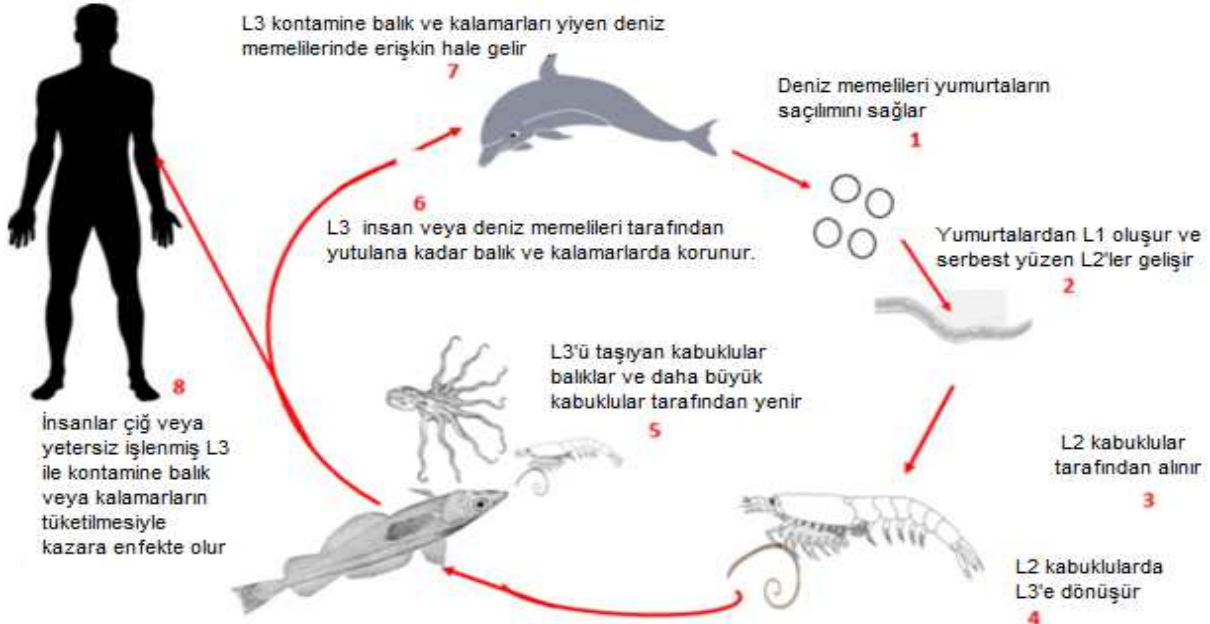
*Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814)'da Clinostomidae familyasından bir digenik trematoddur. *C.complanatum* metaserkeri ile enfekte, çiğ veya az pişmiş tatlı su balıklarının tüketiminden sonra bulaşan ve nadir rastlanan bir hastalık olan Halzoun sendromundan sorumlu bir zoonotik parazittir. Kazara oluşan insan enfestasyonlarında, *C.complanatum* boğazın mukoza zarına yapışmakta ve genellikle akut farenjit ve larenjite neden olmaktadır. *Clinostomum* sp.'nin neden olduğu alışılmadık bir göz enfestasyonu vakası da bildirmiştir. Birinci ara konak tatlı su gastropodları, ikinci arakonak ise balık ve amfibi türleridir. İlk ara konakçıda mirasidyum (miracidia) yumurtalardan çıkar ve sporokist, redi (rediae) ve ardından kısa çatallı serker (brevifurcate cercariae) gelişmeden önce birkaç kez eşeysiz üremeye maruz kalır. Serbest yüzen serkerler balıkların derisine nüfuz eder ve burada nihai konakçılar olan balık yiyen kuşlar için bulaşıcı olan metaserkerlere dönüşürler (Menconi vd., 2020;Hajipour vd., 2022).

Opisthorchiidae familyası ise ağırlıklı olarak memeli ve kuş konakçılarının safra kanalı, safra kesesi ve karaciğerini enfeste eden çok sayıda opisthorchiid trematodlardan oluşmaktadır. Bu familyaya ait trematodlar arasında özellikle *Clonorchis* ve *Opisthorchis* cinslerinin insanları enfeste ettiği bildirilmiştir. Bu cinslere ait *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini* ve *Metorchis conjunctus* türleri en kapsamlı incelenen türler olmuştur. Ülkemizde Ulubat (Apolyont) ve Manyas göllerinden yakalanan kızılöz balıklarında (*Rutilus rutilus*) *O.felinus*'un metaserkerlerine rastlandığı bildirilmiştir (Geldiay& Balık, 1974). Avrupa ve Asya'da tahminen 45 milyon insanın bu karaciğer parazitleriyle enfeste olduğu tahmin edilmektedir. Bu vakaların 35 milyonunun başta Çin'de olmak üzere *C.sinensis* ile 10 milyonunun Güneydoğu Asya'da *O.viverrini* ile ve 1,2 milyonunun ise Doğu Avrupa ve Rusya'da *O.felinus* ile oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu karaciğer trematodlarının safra kanalı kanseri veya kolanjiokarsinoma neden oldukları da belirlenmiştir (Chai vd., 2005;Saijuntha vd., 2021)

#### 1.4. Zoonotik Nematodlar

Anisakidosis, Anisakidae familyasının üyeleri tarafından indüklenen zoonotik bir parazitozudur. Anisakidler; *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* ve *Contracaecum* cinslerini içermektedir. Her ne kadar *Hysterothylacium* spp. Artık Raphidascarididae familyasına dahil edilmiş olsa da (Deardorf ve Overstreet 1981; Nadler ve ark. 2005), geçmişte Anisakidae familyasının üyesi olarak kabul edildiklerinden literatürde genellikle Anisakidosis etkeni olarak tanımlanmaktadırlar (Shamsi&Barton, 2023). Karmaşık bir yaşam döngüsüne sahip olan bu nematodların nihai konakçıları deniz memelileridir. İnsanlar tesadüfi konakçı, farklı kabuklu ve balık türleri ise ara veya paratenik konak görevi görmektedirler. İnsan anisakiasis'i, bu parazitin enfektif aşaması (üçüncü aşama larva / L3) ile kontamine olmuş deniz ürünlerinin özellikle de balıkların tüketilmesiyle ortaya çıkmaktadır (Şekil 4). Günümüzde *Anisakis simplex* ve *Anisakis pegreffii*'nin neden olduğu alerjik reaksiyonların eşlik ettiği mide bağırsak enfestasyonları vakalarında artışların olduğu bildirilmektedir (Aibinu vd., 2019). Anisakiasis'in en yüksek prevalansı Kuzey Asya ve Batı Avrupa'da (Hollanda, Almanya, Fransa ve İspanya) gösterdiği belirtilmektedir. Sırbistan'da 2000-2013 yılları arasında ithal edilen deniz balıklarında arasında ringa (*Clupea harengus*) ve uskumru (*Scomber scombrus*) türlerinde *Anisakis* spp.'nin saptandığı ifade edilmektedir. Ülkemizde de farklı bölgelerde ve türlerde zoonotik Anisakis türlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ege ve Marmara kıyılarında, *Scomber japonicus* (Akmirza,1997); *Trachurus mediterraneus* (Akmirza, 1998); *Mullus surmuletus* (Akmirza, 2000); *Diplodus annularis*, *Pagellus erythrinus*, *Oblada melanura*, *B.boops* (Akmirza, 2001); *Sardina pilchardus*, *Merlangius merlangius* ve *Trachurus trachurus* (Oğuz vd., 2000), *Conger conger* (Akmirza, 2012) *Scomber scombrus* (Keser, 2007;Becerklisoy vd., 2020) türlerinde *A.simplex* izole edilmiştir. Yine Erzurum ilinde satışa sunulan *Trachurus trachurus* türünde *A.simplex* ve *A.pegreffii* türlerinin izolasyonunun sağlandığı bildirilmiştir (Utuk vd., 2012). Pekmezci vd., 2014 Türkiye denizlerinden örnekledikleri 31 farklı türden 1145 bireyde 168 Anisakid larvası belirlemişlerdir. Bu larvalardan 163'ünün *Anisakis pegreffii*, 2'sinin *Anisakis simplex*, 3'ünün ise hibrid tür olduğunu göstermişlerdir. Çanakkale kıyılarından yakalanan *Scomber japonicus*, *Engraulis encrasicolus* ve *Boops boops* türlerinde de *Anisakis pegreffii* türünün izolasyonu yapılmıştır (Aldık vd., 2023).Yine ülkemizde ithal edilerek satışı yapılmakta olan dondurulmuş Atlantik uskumrusu (*Scomber scombrus*) ve füme Atlantik somonu (*Salmo salar*) örneklerinin incelendiği bir araştırmada %99 oranında *A.simplex*, %1 oranında ise *A.pegreffii* türü larvalarının izole edildiği bildirilmiştir (Pekmezci vd.,

2023). Çiğ, yeterince pişirilmemiş, az tuzlanmış veya tütsülenmiş somon, ringa, morina ve uskumru tüketimi sonrasında *Anisakis simplex* ile enfestasyon gelişirken, *Pseudoterranova decipiens*'in genellikle morina, pisi balığı veya diğer yassı balıklardan bulaştığı tespit edilmiştir. *A. simplex* larvaları, insanlarda mide veya bağırsak mukozasına yerleşerekapselere veya eozinofilikgranülomaya neden olabilmektedir. Ayrıca bu parazitlerin periton boşluğuna geçerek diğer organlara da yerleşebildiği belirlenmiştir. Nematodların bir kısmı ise dokuya invaze olamayıp dışkı ile veya mide içeriği aracılığıyla yemek borusundan giriş yapabilmektedir. *P. decipiens* larvaları, gıdıklanma hissinin meydana geldiği ve hastanın larvaları öksürerek / kusarak çıkarabildiği "boğazda karıncalanma sendromuna (tingling throat syndrome)" neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra, *Contraecaecum osculatum* türünün de yaygınlığı daha düşük olmakla birlikte insanlarda hastalığa neden olduğu bildirilmektedir. Japonya, İran, Papua Yeni Gine, Kanada, Bangladeş gibi ülkelerdeki çeşitli tatlı su balıklarında varlığı bildirilen *Eustrongylides spp.*'nin ise insanlarda gastrit ve bağırsak travmalarına neden olabildiği bildirilmiştir (Ljubojevic vd., 2015). Türkiye'de İznik gölünde 2008-2009 ve Eğirdir gölünde de 2013-2018 yıllarında, farklı balık türlerinde *Eustrongylides exinus* türünün varlığı belirlenmiştir. İznik gölünde örneklenen 271 balık bireyinde türün yaygınlık oranı % 6.64 olarak tespit edilmiştir. Eğirdir gölünde ise 2013 yılındaki araştırmada 34 adet Sudak (*Sander lucioperca*)'ın tümünde parazit belirlenmiş, 2018 yılındaki çalışmada ise 613 bireyin 34'ünde parazitin larvalarına rastlanmıştır. Genellikle balıkların karın boşluğu ve iç organlarda lokalize oldukları gözlenmekle birlikte, kaslarda da yerleşebildikleri tespit edilmiştir (Çolak, 2013;Metin vd., 2014;Özmen vd., 2021).



**Şekil 4.** Anisakid yaşam döngüsü (L3 larvaları gastrik, intestinal veya ektopik yerleşim gösterebilmektedir) (Aibinu vd., 2019).

*Pseudoterranova*, Anisakidae familyasından bir parazitik nematod cinsidir. Bu cins için balıklar, ikinci konak veya paratenik konaktır. Çiğ veya az pişmiş enfekte balıkların tüketimi yoluyla insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Kısmen pişmiş balıkların tüketilmesi sonrasında *P. decipiens*, *P. cattani* ve *P. azarasi* türleri ile ortaya çıkmış insan enfestasyonu vakaları bildirilmiştir. Ülkemizdeki yapılan çalışmalarda *Pseudoterranova spp.*'nin Doğu Akdeniz'de mutur (*Phocoena phocoena*) ve çizgili yunus (*Stenellacoeruleo alba*)'un midesinden izole edildiği bildirilmiştir (Danyer vd., 2010; Aytemiz vd., 2012). Ayrıca Edremit Körfezi'nde yakalanan balık türlerinde *A. simplex*, *H. aduncum* ve *P. decipiens*'in izole edildiği de belirtilmektedir. Bu izolasyonun *P. decipiens* türü için *Boops boops* türünde Türkiye Deniz'lerinden ilk kayıt olduğu ifade edilmiştir (Kuran vd., 2021). *Contraecaecum*

spp. Anisakidae ailesinden bir başka zoonotik nematod cinsidir. Yaşam döngülerinde *Contraecum* spp. son konak olarak deniz memelilerini ve balık yiyen kuşları, ara konak olarak ise kabukluları ve farklı balık türlerini enfeste etmektedir. İnsanlarda *Contraecum* spp., *Anisakis* spp.'de olduğu gibi üçüncü dönem larvalara ev sahipliği yapan çiğ veya az pişmiş balıkların tüketilmesiyle bulaşmaktadır. Türkiye'den *Alburnus alburnus*, *Barbus lacerta*, *B.plebejusescherichi*, *Carassius auratus*, *C.carassius*, *Capoeta tinca*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Rutilus rutilus* ve *Vimba vimba* türü balıklarda *Contraecum* spp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. (Koyun & Altunel, 2007; Selver vd., 2009; Koyun vd., 2015). *Contraecum*'un larva formu ise ilk kez 2016 yılında Marmara Gölünden yakalanan *Carassius gibelio* türünde tespit edilmiştir (Demir & Karakişi, 2016). Burdur ili Karataş gölünde yine aynı balık türünde *Contraecum rudolphii* larvalarının izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolasyon ile Türkiye'de konakçı bir tatlı su balığında *C.rudolphii*'nin tanımlandığı ilk vaka olduğu ifade edilmektedir (İnnal vd., 2020). Semptomları arasında karın ağrısı ve şişkinliği, kanlı ve mukuslu ishal, mide bulantısı ve hafif ateş sayılabilmektedir. Döküntü ve kaşıntı gibi alerjik reaksiyonlar ve bazen anafilaksi de oluşabilmektedir. Raphidascares cinsi parazitler de Raphidascaresidae familyasına dahil olup Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da farklı balık türlerinde görülmektedir. Zoonotik önemi hakkında bazı değerlendirmeler bulunmakla birlikte erginleri balıklarda bağırsak paraziti olduğundan, insanlarda enfestasyona yol açıp açmadığı konusu şüpheli olarak da değerlendirilmektedir *Hysterothylacium*'da Raphidascaresidae familyasındaki parazitik yuvarlak kurtların bir cinsidir. Genel olarak, bunlar da insanlar için çok tehlikeli olarak kabul edilmemekle birlikte *Hysterothylacium kajikiae* ve *Hysterothylacium aduncum* türlerinin zoonotik olarak değerlendirildiği kayıtlar bulunmaktadır (Ghadam vd., 2018, Shamsi vd., 2020, Hajipour vd., 2022). Ülkemiz sularında *H.aduncum* türünün varlığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Karadeniz'de *M.merlangius* (Doğanay, 1994; İsmen ve Bingel, 1999); Marmara Denizi *M.merluccius*, *Gobius niger*, *S.scombrus* ve *Scyllorhinus canicula* (Oğuz, 1995; Keser vd., 2007; Özkan vd., 2010; Beceriklisoy vd., 2020; Torcu Koç & Erdoğan, 2021); Kuzeydoğu Akdeniz'de *Diplodus vulgaris* ve *Sparus aurata* (Kalay vd., 2009), Çanakkale Boğazı'nda *Sardinella aurata*, *S.japonicus* ve *T.trachurus* (Şahin ve Sağlam, 2016); Karadeniz'de ise *Merlangius merlangus exinus* (Pekmezci, 2019) türleri izolasyonun yapıldığı balık türleri olarak belirtilmiştir.

Gnatostomiyaz, *Gnathostoma* cinsinin göç eden nematod larvalarının neden olduğu sistemik bir enfestasyondur. Ara ve kesin konakçı olarak çok farklı hayvanları içeren bir zoonozdur ve ana risk faktörü çiğ balık tüketimidir (Hale vd., 2003). Gıda kaynaklı bir zoonoz olan insan gnatostomiyazı, *Gnathostoma* spp.'nin üçüncü evre larvalarından (L3) kaynaklanmaktadır. Hastalığın en sık görülen klinik belirti ve semptomları gezici kutanöz şişlikler ve eozinofilidir. Şiddetli vakalarda karaciğer, gözler, sinirler, omurilik ve beyin gibi organ ve dokulara yerleşme sonrası körlük, sinir ağrısı, felç, koma ve hatta ölümler bile görülebilmektedir. Bugüne kadar dünya genelinde özellikle Japonya ve Çin'de endemik bölgeler, Tayland ve Güneydoğu Asya'nın diğer bölgeleri ile Meksika, Kolombiya ve Peru'ya kadar yaklaşık 5000 insanda gnatostomiyaz vakası rapor edilmiştir. Bu nedenle, insan gnatostomiazisi, etkileri artmakta olan küresel bir zoonoz olarak kabul edilmektedir. Dünya genelindeki dağılımı nedeniyle de gnatostomiyaz'ın eradikasyonunun zor olduğu belirtilmektedir (Liu vd., 2020). *Gnathostomas pinigerum* türü uzun zamandır insanlarda enfestasyona neden olan tek tür olarak kabul edilmekteyken yakın zamanda diğer bir tür olan *Gnathostoma binucleatum*'un da enfestasyon etkeni olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Japonya'da *Gnathostoma hispidum*, *Gnathostoma doloresi* ve *Gnathostoma nipponicum* türlerinin neden olduğu küçük salgınlar ve / veya sporadik vakalar da bildirilmiştir. Enfestasyonların görüldüğü hastaların çoğunlukla yerel bölgelerden gelen göçmenler olduğu tespit edilmişken turistik amaçlarlayere bölgelere seyahatler sırasında da bu enfestasyonların geliştiği gözlenmiştir. Gnatostomiyaz artık seyahat tıbbında önemli bir hastalık olarak kabul görmektedir (Nawa&Nakamura-Uchiyama, 2004). Gnatostomiyaz'ın insanlarda eozinofilik pannikülit adı verilen ve eozinofilik selülit ile karakterize bir hastalığa neden olduğu da bildirilmektedir. Ülkemizde Kayseri Erciyes Üniversitesi hastanesinde yatan 50 yaşında bir erkek hastada bu olguya rastlanmış ancak kaynağın Gnatostomiyaz olup olmadığına dair net bir tanımlama yapılamamıştır (Aktaş vd., 2010, İnci vd., 2018)

Trichinelloidae familyasına ait 250'den fazla *Capillaria* türünün omurgalıları enfekte ettiği bilinmektedir. Bunlardan balık kaynaklı zoonotik bir parazit olan *Capillaria philippinensis* tıbbi

açından da önem taşımaktadır. İlk insan enfestasyon vakasının 1963 yılında Filipinler'de tespit edildiği bildirilmiştir. Çiğ veya az pişmiş balıkların yenilmesi sonucu bağırsaklarda enfestasyona neden olduğu bildirilmiştir. *Eustrongylides* spp. ise Diotrophymatoidea ailesinden birinci ve ikinci ara konaklar olarak oligoketleri ve balıkları, son konak olarak kuşları, paratenik konak olarak ise diğer balıklar ve sürüngenleri kullanan ve karmaşık bir yaşam döngüsüne sahip bir tatlı su balığı nematodu olarak kabul edilmektedir. Bu parazitin larva aşamalarını içeren çiğ veya az pişmiş tatlı su balıklarını tüketen insanlarda, gastrit ve bağırsak delinmesi ile seyredilebilen östrongilidozu geliştirebilmektedir (Hajipour vd., 2022). Ülkemizde farklı bölgelerde örneklenen tatlı su balıklarında *Eustrongylides excisus* türünün izolasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Aydoğdu vd., 2011; Çolak, 2013; Metin vd., 2014; Yardımcı vd., 2018; Özmen vd., 2021).

### 1.5. Zoonotik Cestoda

Balık parazitlerinin bir başka yaygın grubu da cestod (tenya)'lardır. Trematodlardan farklı olarak oldukça büyük olup 20 m uzunluğa kadar büyüyebilmektedirler (Ziarati, 2022). Cestoda kaynaklı insan enfestasyonlarının çoğunun kaynağının zoonotik olduğu düşünülmekte ve bu parazitlerin insanlarda kazara enfestasyonlara neden oldukları tahmin edilmektedir (Waeschenbach vd., 2017). Diphyllobothriidea takımının farklı cinsleri "balık tenyaları"nın neden olduğu diphyllobothriosis, dünya çapında yaklaşık 20 milyon insan enfestasyonundan sorumlu olan balık kaynaklı önemli bir paraziter zoonozdur. İnsan diphyllobothriosis'inin en yaygın ajanlarından biri, daha önce *Diphyllobothrium latum* adıyla bilinen *Dibothriocephalus latus*'tur (Cestoda: Diphyllobothriidea). Son filogenetik çalışmalar Diphyllobothriidea takımındaki polifiletik cins *Diphyllobothrium*'u ikiye ayırmıştır. Bunlar; *Diphyllobothrium* ile *D.latus*'uda kapsayan ve yedi türden oluşan *Dibothriocephalus*'tur. Bu tenyanın karmaşık yaşam döngüsü, iki ara konak (kabuklular ve balıklar) ve bir kesin konak (insanlar dahil balık yiyen memeliler) içermektedir. İnsanların, enfektif larval aşama olan pleroserkoidleri (plerocercoid) içeren çiğ veya az pişmiş balık filetolarının tüketilmesi sonrasında enfekte olduğu düşünülmektedir. Diphyllobothriosis, tuzlanmış veya marine edilmiş balık filetosu tüketimi gibi alışkanlıklar ile de ilişkilendirilmiştir (Radacovska vd., 2019). *Diphyllobothriidae* familyasının özellikle *Diphyllobothrium* türleri ile sparganum adı verilen larvaları insanlarda sparganoza neden olabilen *Spirometra* türlerinin halk sağlığı üzerindeki etkileri bilinmektedir. Bununla birlikte, bu tenya türlerinin büyük çoğunluğu, doğal yaşamda, özellikle deniz ve kara memelilerinde yetişkin bireyler olarak parazitlenmektedirler. Boyut olarak bilinen en büyük tenyalar arasında olup ispermeçet balinasından alınan bazı örneklerin uzunluğu 30 m'ye kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (Scholz&Kuchta, 2016). Ülkemizde Karadeniz'de kalkan balığında (*Scophthalmus rhombus*) *Diphyllobothrium* spp. pleroserkoidi ile karşılaştığı bildirilmiştir (Merdivenci, 1983). İnsanların yalnızca *D.latus* ve muhtemelen *D.nihonkaiensis* için başlıca kesin konakçılar olduğu düşünülmektedir. *D.latus*, insanlarda diğer konakçılara kıyasla daha hızlı bir büyüme yeteneğine sahiptir (Waeschenbach vd., 2017). Pleroserkoidler, kesin konakçı (insan veya etobur memeli) tarafından tüketilene kadar diğer paratenik konakçılara (*Perca fluviatilis*, *Lota lota*, *Esox* sp. gibi) aktarılabilir. *D.latus*'un üreme potansiyeli çok yüksek olduğu için (günde 1 milyon yumurtaya kadar), sporadik insan vakaları bile bir balık popülasyonunda yüksek bir plerocercoid larva prevalansına yol açabilmektedir (Scholz vd., 2019). *D.latus* yumurtalarının dış etkenlere karşı direnci düşüktür ve uygun bir su kütlesine hızla ulaşmadıkça yumurtadan çıkamamaktadır (Tsukamoto vd., 2019).

*Ligula intestinalis* de tipik olarak sazangillerde yaygın olarak bildirilmesine rağmen, Catostomidae ve Galaxiidae gibi diğer balık aileleri dahil olmak üzere çeşitli konakçılarda yerleşim gösteren bir türdür (Bouzid vd., 2008). Üç konaklı üyelere sahip olan Pseudophilidae familyasından bir cestod türü olup dünyada doğal türler ve çiftlik balıklarında bulunabilmektedir. Ülkemizde bu türün varlığına dair çok sayıda kayıt bulunmaktadır (İnnal vd., 2007; Özbek & Öztürk, 2010; Demirtaş, 2011; Arslan vd., 2015, Önalın vd., 2022). *L.intestinalis* balıklarda zoonotik parazitler ile ilgili çalışmalarda adı sıklıkla anılan bir etken olmakla birlikte gerçekten gıda kaynaklı bir parazit olup olmadığı şüphelidir. Romanyada erkek bir hastada bulunan iki sıra dışı diphyllobothriid plerocercoidi *Ligula intestinalis* olarak tanımlanmıştır. Ancak sonradan bu vakada plerocercoidlerin yani larva evrelerin değerlendirildiği ve bu tespitin de tür açısından kesin bir tanımlama olamayacağı değerlendirilmesi yapılmıştır. İnsan ligulozis enfestasyonuna ilişkin az sayıda rapor bulunduğundan, parazitin

insanlardaki patojenitesini ve insana bulaşmasında balık ve tatlı su kaynaklarının olası rolünü değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Scholz&Kuchta, 2016, Ahmadiara, 2017).

## **2.SONUÇ**

Balıklar, omurgalılar arasında yaşam ortamları nedeniyle en yüksek parazitik enfeksiyon ve enfestasyon oranlarına sahip canlılardır. Çiğ balık yemeklerinin artan popülaritesine bağlı olarak gıda kaynaklı parazitler hastalıkların önlenmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Zoonotik parazitlerin rutin teşhisi ve izlenmesine yönelik sistemler ve araçların yanı sıra yapılacak etkili düzenlemeler, tüketicilere hastalık bulaşma riskini azaltabilecek temel halk sağlığı faaliyetleri olarak görülmektedir. Balık kaynaklı tüm parazitler zoonozlar açısından en önemli risk faktörü, çiğ veya az pişmiş balık tüketimidir. Ulaşım, teknoloji ve gıda işlemedeki gelişmeler, parazitik enfeksiyon ve enfestasyonların yayılma olasılığını artırmaktadır. Su ortamında konakçı, patojen ve çevre arasındaki etkileşimlerin karmaşık doğası nedeniyle zoonotik balık parazitlerinin kontrolü çok yönlü bir mücadeleyi gerektirmektedir. Balık kaynaklı zoonozların kontrolüne yönelik en önemli konu, tam hijyen ve insanlar (tüketiciler/üreticiler/işleyiciler) arasında sağlanması gereken sürekli farkındalıktır. Uygun eğitim, öz hijyenin benimsenmesi, uygun şekilde pişirme, içme ve banyo için temiz su kullanımı, dünya genelinde balık kaynaklı hastalıkların kontrolünde en önemli hususlardır. Kültür, ticaret ve işleme faaliyetleri de önemli faktörler arasında sayılabilmektedir.

Avrupa Birliği (AB), balık ürünlerinin piyasaya arz edilmeden önce görünür parazitlerin tespit edilmesi amacıyla görsel muayenelere tabi tutulmasını önermektedir. Ayrıca tatlı suların kaynaklanan parazit enfeksiyon ve enfestasyonunu önlemek için balıkların yakalandığı yüzey sularının çevresel kontrolü ile ilk ara konakçıların (salyangozlar gibi) kontrolü veya ortadan kaldırılması gibi çeşitli kontrol önlemleri de öneriler arasındadır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), parazitleri ortadan kaldırmak için en etkili yöntemlerin dondurma, ısıtma ile tuz uygulamaları ile depolama süresi kombinasyonu veya sıcak tütsüleme olduğunu belirtmektedir. Öte yandan, salamura ve soğuk tütsülemenin balıklardaki parazit tehlikesini azaltabildiği ancak ortadan kaldıramadığı belirtilmektedir. Çiğ veya az pişmiş balık tüketiminden kaçınma önerisi hala en iyi koruyucu prosedür olarak kabul görmektedir. Özellikle bu zoonotik parazitler ve diğer patojenler nedeniyle balık tüketim biçimleri insan sağlığına yönelik tehlikelerden kaçınılacak şekilde değiştirilmelidir. Sağlık eğitimi, balık kaynaklı zoonotik enfeksiyon ve enfestasyonlarla mücadelede kilit bir rol oynamaktadır. Ayrıca ulusal ve uluslararası balık/su parazitologları ağının kurulması ve balık kaynaklı parazit zoonozları ve bunların dağılımı için bir sürveyans sisteminin oluşturulması da kontrol amacıyla etkili yöntemler olacaktır.

## **FİNANS**

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finans desteği alınmamıştır.

## **ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Yazar, bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan eder.

## **ETİK ONAY BEYANI**

Bu çalışma derleme çalışması olduğu için Yerel Etik Kurul Onayı alınmamıştır.

## **VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI**

Bu çalışmada yeni veri oluşturulmadığı veya analiz edilmediği için veri paylaşımı bu makale için geçerli değildir.

## **KAYNAKLAR**



- Adlard, R.D, Miller, T.L, Smit, N.J. (2015). The butterfly effect: parasitediversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. *Trends in Parasitology*, 31(4), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.001>
- Ahmadiara, E. (2017). Is *Ligula intestinalis* really a probable threat for public health? *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4, 36.
- Aibinu, I.E., Smooker, P.M., & Lopata, A.L. (2019). Anisakis Nematodes in Fish and Shellfish- from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 384-393.
- Akmirza, A., (1997). Samples from parasites of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1786. *Ege Journal of Fisheries and Water Products*, 14 (1-2): 173-181.
- Akmirza, A., (1998). The Parasite fauna of horse mackerel. III. *National Symposium of Aquatic Products*, 333-344, Erzurum
- Akmirza, A., (2000). Metazoan parasites of red mullet (*Mullus surmuletus*) caught near Gökçeada. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 26(1): 129-140.
- Akmirza, A., (2001). Metazoan parasites of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) from the vicinity of Gökçeada. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 26(1): 129-140.
- Akmirza, A., (2012). Metazoan Parasite Fauna of Conger Eel (*Conger conger* L.) Near Gökçeada, Northeastern Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(5): 845-848. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.6624>
- Aktaş, E., Taşlıdere, N. & Canöz, Ö. 2010. Dapson tedavisine tam yanıt alınan eozinofilik pannikülit; olgu sunumu. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 4, 94-96. <https://doi.org/10.5152/tdd.2010.16>
- Aldık, R., Çakır, F., & Tonguç Yayıntaş, Ö. (2023). Çanakkale (Türkiye) balık pazarından alınan üç ekonomik balık türünden izole edilen nematodların moleküler incelenmesi *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(2), 90-95. <https://doi.org/10.12714/egejfas.40.2.01>
- Arslan, M.Ö., Yılmaz, M., & Taşçı, G.T. (2015). Infections of *Ligula intestinalis* on Freshwater Fish in Kars Plateau of North-Eastern Anatolia, Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39, 218-21. <https://doi.org/10.5152/tpd.2015.4168>
- Aydoğdu, A., Emre, Y., Emre, N., & Altunel, F.N. (2011). The occurrence of helminth parasites (Nemathelminthes) in some freshwater fish from streams discharging into Antalya Bay in Antalya, Turkey: two new host records from Antalya. *Turkish Journal of Zoology*, 35(6), 859-864. <https://doi.org/10.3906/zoo-0912-16>
- Bardhan, A.(2022). Fish borne parasites proficient in zoonotic diseases: a mini review. *Insights in Veterinary Science*, 6, 005-012. <https://doi.org/10.29328/journal.ivs.1001035>
- Beceriklisoy, Ö.G., Aşti, C., Gönenç, B. (2020). Anisakis spp. infection in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*, Linnaeus 1758) from the Sea of Marmara. *Veteriner Hekimler Dernegi Dergisi*, 91(1): 80-85. <https://doi.org/10.33188/vetheder.599455>
- Borges, J.N., Costa, V.S., Mantovani, C., Barros, E., Santos, E.G.N., Mafra, C.L., & Santos, C.P. (2017). Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. *Journal of Fish Diseases*, 40, 191-203.
- Bouزيد, W., Lek, S., Mace, M., Ben Hassine, B., Etienne, R., Legal, L., & Loot, G. (2008). Genetic diversity of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidea) based on analysis of inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 46(4), 289-392. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00471.x>
- Caccio, S.M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>
- Chai, J.Y., Darwin Murrell, K., & Lymbery, A.J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *International Journal for Parasitology*, 35, 1233-1254. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.013>
- Chai, J.Y., Sohn, W.M., Yong, T.S., Eom, K.S., Min, D.Y., Lee, M.Y., Lim, H., Insiengmay, B., Phommasack B. & Rim H.J. (2013). *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infections source in Lao Pdr. *The Journal of Parasitology*, 99(3), 531- 536.
- Chai, J.Y., & Jung, B.K. (2017). Fish borne zoonotic heterophyid infections: An update. *Food and Waterborne Parasitology*, 8, 933-63. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.001>

- Cong, W., &Elsheikha, H.M. (2021). Biology, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, and Treatment of Selected Fish-borne Parasitic Zoonoses. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 94, 297-309.
- Çolak, S. (2013). The helminth community of the sands melt (*Atherina boyeri* Risso, 1810) from Lake Iznik, Turkey. *Journal of Helminthology*, 87, 129-34. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000770>
- Demir, S. &Karakışı, H. (2016). Metazoan parasite fauna of the Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) (Cyprinidae), from Marmara Lake, Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica*, 68(2), 265-268.
- Demirtaş, M. (2011). Terkos Gölü'nde Yaşayan Kadife Balıklarının (*Tinca tinca* L. 1758) Helminth Parazitlerinin Mevsimsel Dağılımı ve Etkileri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35, 159-63. <https://doi.org/10.5152/tpd.2011.40>
- Doğanay, A. (1994). *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi 1802) pattern in cods *Merlangius merlangus* which is caught from Black Sea. *Ankara Journal of Veterinary*, 41 (2): 208-217.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., &Gabriel, S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*, 163, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.026>
- Geldiay R, & Balık S. Türkiye Tatlı Su Balıklarında Rastlanılan Başlıca İç ve Dış Parazitler. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Seri No: 14*, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, 1974.
- Ghadam, M., Banaii, M., Mohammed, E. T., Suthar, J., &Shamsi, S. (2018). Morphological and molecular characterization of selected species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascaerididae) from marine fish in Iraqi waters. *Journal of Helminthology*, 92(1), 116-124. <https://doi.org/doi:10.1017/S0022149X17000128>
- Gupta, D., Gupta, N. &Gupta, A.(2015). *Trypanosoma tengari* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) A new haemoflagellate from the blood of *Mystus vittatus*. *Journal of Environmental Bio-Sciences*, 29(1), 93-98.
- Hajipour, N., Valizadeh, H., &Ketizis, J. (2022). A review on fish-borne zoonotic parasites in Iran. *Veterinary and Medicine Science*, 9(2), 748-777. <https://doi.org/10.1002/vms3.981>
- Hale, D.C., Blumberg, L., &Freen, J. (2003). Case Report: Gnathostomiasis in Two Travelers to Zambia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(6), 707-709.
- İnci A, Doğanay M, Özdamar A, Düzlü Ö & Yıldırım A. (2018). Overview of Zoonotic Diseases in Turkey: The One Health Concept and Future Threats. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 42, 39-80. <https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5701>
- İnnal, D., Keskin, N., &Erk'akan F. (2007). Distribution of *Ligula intestinalis* (L.) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7, 19-22.
- İnnal, D., Stavrescu-Bedivan, M., Öztürk, M.O., &Özmen, Ö. (2020). First record of *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 in *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) from Turkey. *Aquatic Sciences and Engineering*, 35 (1), 1-5. <https://doi.org/10.26650/ASE2019566509>
- İşmen, A., & Bingel, F. (1999). Nematode infection in the whiting *Merlangius merlangus euxinus* off Turkish coast of the Black Sea. *Fisheries Research*, 42, 183-189.
- Kalay, M., Dönmez, A.E., Koyuncu, C.E., Genç, E. & Şahin, G. (2009). Seasonal variation of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascaerididae) infestation in sparid fishes in the Northeast Mediterranean Sea. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 33(6): 517-523. <http://dx.doi.org/10.3906/vet-0703-12>
- Keser, R., Bray, R.A., Oğuz, M.C., Çelen, S., Erdoğan, S., Doğutürk, S., Akdoğan, G., & Martı, B. (2007). Helminth parasites of digestive tract of some teleost fish caught in the Dardanelles at Çanakkale, Turkey. *Helminthologia*, 44(4), 217-221. <https://doi.org/10.2478/s11687-007-0035-3>
- Koyun, M. & Altunel, F. N. (2007). Metazoan parasites of bleak (*Alburnus alburnus*), crucian carp (*Carassius carassius*) and golden carp (*Carassius auratus*) in Enne Dam Lake, Turkey. *International Journal of Zoological Research*, 1(2), 1-7.
- Koyun, M., Ulupınar, M. & Gül, A. (2015). Seasonal Distribution of Metazoan Parasites on Kura Barbell (*Barbus lacerta*) in Eastern Anatolia, Turkey. *Pakistan Journal Zoology*, 47(5), 1253-1261.

- Kuran. K., Koç. H. T., Erdoğan Z., & Oğuz. M. C., (2021). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809), *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) and *Pseodoterranova decipiens* (Krabbe 1878) (Nematoda; Anisakidae) parasites in some commercial fish species from Edremit Bay (Northern Aegean Sea). *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 64-76.
- Li, M., Ponce-Gordo, F., Norman Grim, J., Wang, C. & Nilsen, F. (2014). New insights into the molecular phylogeny of *Balantidium* (Ciliophora, Vetuliferida) based on the analysis of new sequences of species from fish hosts. *Parasitology Research*, 113(12), 4327-33. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4195-z>
- Limados Santos, C.A.M. & Howgate, P. (2011). Fish borne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture*, 318, 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.046>
- Liu, G.H., Sun, M.M., Elsheikha, H.M., Fu, Y.T., Sugiyama, H., Ando, K., Sohn, W.M., Zhu, X.Q., & Yao, C. (2020). Human gnathostomiasis: a neglected food-borne zoonosis. *Parasites & Vectors*, 13(1), 616. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04494-4>
- Ljubojevic, D., Novakov, N., Djordjevic, V., Radosavljevic, V., Pelica, M., & Cirkovic, M. (2015). Potential parasitic hazards for humans in fish meat. *Procedia Food Science*, 5, 172-175. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.049>
- Lopes, A.S., Pulido Murillo, E.A., Melo, A.L., & Pinto, H.A. (2020). *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) as a new fish borne zoonotic agent transmitted by *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) in Brazil: A morphological and molecular study. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104495. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104495>
- Macpherson C.N.L. (2005). Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35, 1319-1331.
- Mahasri, G., Koesdarto, S., Kismiyati, Sari, D.P.W., Santamurti, M.B., Kandi, I.W., Fitri, S.T.S., Amin, M. (2019). Prevalence and intensity of *Trypanosoma* sp. in wild swampeels (*Synbranchus bengalensis*) marketed in Surabaya, Indonesia. *Biodiversitas*, 20(11), 3262-3268. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201119>
- Mahdy, O.A., Abdel-Maogood, S.Z., Abdelsalam, M., Shaalan, M., Abdelrahman, H.A., & Salem, M.A. (2021). Epidemiological study of fish-borne zoonotic trematodes infecting Nile tilapia with first molecular characterization of two heterophyid flukes. *Aquaculture Research*, 52(9), 4475-4488. <https://doi.org/10.1111/are.15286>
- Marino, A.M.F., Giunta, R.P., Salvaggio, A., Castello, A., Alfonzetti, T., Barbagallo, A., Aparo, A., Scalzo, F., Reale, S., Buffolano, W., & Percipalle, M. (2019). *Toxoplasma gondii* in edible fishes captured in the Mediterranean basin. *Zoonoses Public Health*, 66 (7), 826-834. <https://doi.org/10.1111/zph.12630>
- Menconi, V., Manfrin, C., Pastorino, P., Mugetti, D., Cortinovis, L., Pizzul, E., Pallavicini, A., & Prearo, M. (2020). First Report of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Digenea) in European Perch (*Perca fluviatilis*) from an Italian Subalpine Lake: A Risk for Public Health. *International Journal of Environmental Research Public Health*, 17(4), 1389. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041389>
- Merdivenci A. (1983). Son 30 yıl (1952-1982) içinde Türkiye'de varlığını ilk kez bildirdiğimiz parazitler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 13, 23-38.
- Metin, S., Didinen, B.I., Boyacı, Y.Ö., Kubilay, A., Emre, N., Didinen, H., & Emre, Y. (2014). Occurrence of *Eustrongylides excisus* Jägerskiöld, 1909 Larvae (Nematoda: Dioctophymatidae) in Pike perch (*Sander lucioperca*, L.) in Lake Eğirdir. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 10(1): 20-24.
- Moratal, S., Auxiliadora Dea-Ayuela, M., Cardells, J., Marco-Hirs, N.M., Puigcercós, S., Lizana, V., & López-Ramon, J. (2020). Potential Risk of Three Zoonotic Protozoa (*Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Toxoplasma gondii*) Transmission from Fish Consumption. *Foods*, 9, 1913. <https://doi.org/10.3390/foods9121913>
- Nawa, Y., & Nakamura-Uchiyama, F. (2004). An Overview of Gnathostomiasis in The World. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(1).

- Oğuz, M.C. (1995). *Helminthsseen in someteleostfishes in coast of Mudanya* [Doktora tezi. Uludağ Üniversitesi]
- Oğuz, M. C., Güre, H., Özdemir, H., Öztürk, M. O. & Savaş, Y. (2000). Investigation of *Anisakis simplex* of some economically important teleost fishes in coast of Çanakkale. *Journal Turkish Parasitology*, 24(4), 431-434.
- Önalın, Ş, Atıcı, A.A, Sepil, A., & Şen, F. (2022). First Report of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) in *Barbus ercisianus* (Cypriniformes: Cyprinidae) from the Nemrut Crater Lake, Turkey. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 32(1), 11-20. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.1005928>
- Özbek, M & Öztürk, M.O. (2010). Investigations on *Ligula intestinalis* plerocercoid L., 1758 infection of some fishes from Dam Lake Kunduzlar (Kirka, Eskişehir). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34(2), 112-117.
- Özer, A. & Kırca, D.Y. (2013). Parasite fauna of Golden Grey Mullet *Liza aurata* (Risso, 1810) collected from Lower Kızılırmak Delta in Samsun, Turkey. *Helminthologia*, 50(4), 269-280. <https://doi.org/10.2478/s11687-013-0140-4>
- Özer, A. & Kırca, D.Y. (2015). Parasite fauna of the grey mullet *Mugil cephalus* L. 1758, and its relation ship with some ecological factors in Lower Kızılırmak Delta located by the Black Sea, Turkey. *Journal of Natural History*, 49(15-16), 933-956. <https://doi.org/10.1080/00222933.2014.979259>
- Özkan, Y., Aksakal, E. & Oguz, M. C. (2010). Determination of compared abundance, intensity, and prevalence of nematod larvae reported from mackerel (*Trachurus trachurus*, L. 1758). *Journal of Biological Sciences*, 1, 145-147.
- Özmen, Ö. Stavrescu-Bedivan, M.M., & İnnal, D. (2021). Histopathological aspects caused by nematod parasite *Eustrongylides excisus* observed in some fish species of Eğirdir Lake, Turkey. *AgroLife Scientific Journal*, 10(1), 172-178.
- Quiazon, K.M.A. (2015). Updates on Aquatic Parasites in Fisheries: Implications to Food Safety, Food Security and Environmental Protection. *Journal of CoastZone Management*, 18(1), 1000396. <https://doi.org/10.4172/2473-3350>
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E., Bölükbaş, C.S., Yardımcı, B., Gürler, A.T., Acıcı, M. & Umur, Ş. (2014). Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2), 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.005>
- Pekmezci, G.Z., Yardımcı, B. & Onuk, E.E. (2017). Kızılırmak-Yeşilirmak deltaları arasında kalan tatlı su kaynaklarında yakalanıp insan tüketimine sunulan farklı türdeki balıklarda ülkemiz açısından önemli olan balık kökenli zoonoz parazitlerin araştırılması: Enfeksiyon oranları, yoğunluk ve bolluklarının ortaya konulması. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 26 (1), 60-63.
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E. & Yardımcı, B. (2023). Ongoing Data from Presence of Zoonotic *Anisakis* Larvae in Imported Fish in Turkish Supermarkets: Frozen Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) and Smoked Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 8(2), 146-150. <https://doi.org/10.35229/jaes.1259143>
- Radacovska, A., Bazsalovicsova, E., Costa, I.B., Orosova, M., Gustinelli, A., & Kralova-Hromadova, I. (2019). Occurrence of *Dibothriocephalus latus* in European perch from Alpine lakes, an important focus of diphyllbothriosis in Europe. *Revue Suisse de Zoologie*, 126(2), 219-225.
- Rahman, T., Sobur, A., Islam, S., Ievy, S., Hossain, J., El Zowalaty, M.E., Rahman, T., & Ashour, H.M. (2020) Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, 8(9), 1405. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091405>
- Rebello, K.M, Borges, J.N., Teixeira, A., Perales, J. & Santos, J.P. (2020). Proteomic analysis of *Ascocotyle longa* (Trematoda: Heterophyidae) metacercariae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111311>
- Robertson, L.J, Graham Clark, C., Debenham, J.J., Dubey, J.P., Kvac, M., Li, J., Ponce-Gordo, F., Ryan, U., Schares, G., Su, C., & Tsaoasis, A. (2019). Are molecular tools clarifying or




- confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 13(9), 323-341. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.01.010>
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, V. (2016). *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535-547. <https://doi.org/10.1111/pim.12350>
- Ryan, U., Hijjawi, N., & Xiao, L. (2018). Food borne cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology*, 48(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.09.004>
- Saijuntha, W., Sithithaworn, P., Petney, T.N., Andrews, R.H. (2021). Food borne zoonotic parasites of the family Opisthorchiidae. *Research in Veterinary Science*, 135, 404-411. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.024>
- Scholz, T., & Kuchta, R. (2016). Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllobothrium* and relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites. *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 23-38. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.002>
- Scholz, T., Kuchta, R., & Brabec, J. (2019). Broad tapeworms (Diphyllobothriidae), parasites of wildlife and humans: Recent progress and future challenges. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 359-369. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.001>
- Selver, M., Aydogdu, A. & Cirak, V. Y. (2009). Helminth communities of the roach (*Rutilus rutilus*) from Kocadere stream in Bursa, Turkey: occurrence, intensity, seasonality and their infestations linked to host fish size. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, 29, 131-138.
- Shaapan, R.M., Abdel-Ghaffar, F.A., Varjabedian, K.G., & Saad-Alla, G.I. (2022). Prevalence and Molecular Epidemiology of *Cryptosporidium* Infection in *Clarias gariepinus* Fish in Egypt. *Acta Parasitologica*, 67(1), 437-445. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00483-4>
- Shamsi, S., Steller, E., & Chen, Y. (2018). New and known zoonotic nematode larvae with in selected fish species from Queensland waters in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 272, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.007>
- Shamsi, S., Poupá, A., Justine, J.L. (2020). Some adult and larval nematodes from fishes off New Caledonia. *Parasitology Research*, 119, 2473-2484. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06755-8>
- Shamsi, S., & Barton, D.P. (2023). A critical review of anisakidosis cases occurring globally. *Parasitology Research*, 122, 1733-1745. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07881-9>
- Shanavas, K.R. (1999). *Trypanosoma punctati* Hasan and Qasim, 1962 from *Channa punctatus* Bloch in Kerala, India, with Observations on its Vector-Phase Development and Transmission. *Archiv für Protistenkunde*, 140, 201-208.
- Şahin, A. G., & Sağlam, N. (2016). Investigation of nematodes in chub mackerel (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782), horse mackerel (*Trachurus trachurus* Linnaeus, 1758) and sardines (*Sardinella aurita* Valenciennes, 1847) caught in Çanakkale Region. *Yunus Research Bulletin*, 1, 47-55. <https://doi.org/10.17693/yunus.58953>
- Şahin Taner, G. & Yavuzcan Yıldız, H. (2018) Türkiye'ye ithal edilen iki tatlısu akvaryum balığı türünde saptanan digenetik *Centrocestus* Sp. metaserkeri (Trematoda: Heterophyidae): hastalık profili ve risk. *Aquatic Science and Engineering*, 33(3), 106-109. <https://doi.org/10.26650/ASE201816>
- Tareen I.U. (1981). Türkiye sularında insan paraziti *Heterophyes heterophyes* (Trematoda: Heterophyidae)'in muhtemel vektörü *Mugil cephalus*. *Türk Parazitoloji Dergisi*, 1(18).
- Thompson, R.C.A., & Conlan, J.V. (2011). Emerging issues and parasite zoonoses in the SE Asian and Australasian region. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.025>
- Torcu Koç, H. & Erdoğan, Z. (2021). Anisakis spp. (Nematoda: Anisakidae) case in the small spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) caught from the sea of Marmara (Turkey). *Balikesir Journal of Institute of Science and Technology*, 23(1), 65-71.
- Torgerson, P.R., & Macpherson, C.N.L. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 79-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.017>



- Tsukamoto, Y., Iriko, H., Matsuo, M., Shimono, Y., Miyazaki, J., Tanaka, H., Komatsu, T., Azuma, S., Oota, H., Yamashita, Y., Ohkouchi, M., Hashikura, Y., & Hirota, S. (2019). *Dibothriocephalus nihonkaiensis* infection identified by pathological and genetic analyses - a case report and a recent literature review of human diphyllbothriasis. *Human Pathology: Case Reports*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.hpcr.2019.200298>
- Urdeş, A.L., & Hangan, M. (2013). The Epidemiology of *Ligula intestinalis* (Phylum Platyhelminthes) within the Cyprinid Populations Inhabiting the Danubian Delta. *Animal Science and Biotechnologies*, 46 (1), 273-276.
- Utuk, A.E., Pişkin, F.Ç. & Balkaya, İ. (2012). Molecular Detection of *Anisakis pegreffii* in Horse Mackerels (*Trachurus trachurus*) Sold for Human Consumption in Erzurum Province of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2), 303-307.
- Waeschenbach, A., Brabec, J., Scholz, T., Littlewood, D.T.J., & Kuchta, R. (2017). The catholic taste of broad tapeworms – multiple routes to human infection. *International Journal for Parasitology*, 47(13), 831-843. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.004>
- WHO. (2014). Zoonotic disease: emerging public health threats in the region. <https://www.emro.who.int/fr/about-who/rc61/zoonotic-diseases>
- Williams, M., Hernandez-Jover, M., Shamsi, S. (2022). Parasites of zoonotic interest in selected edible freshwater fish imported to Australia. *Food and Waterborne Parasitology*, 26, e00138. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00138>
- Woolhouse, M., & Gaunt, E. (2007). Ecological Origins of Novel Human Pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 231-242. <https://doi.org/10.1080/10408410701647560>
- Yang, R., Reid, A., Lymbery, A., & Ryan, U. (2010). Identification of zoonotic Giardia genotypes in fish. *International Journal for Parasitology*, 40(7), 779-785. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.001>
- Yardımcı, R.E., Ürkü, Ç., & Yardımcı, C.H. (2018). Parasite Fauna of Fish in Büyükçekmece Dam Lake. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(2), 158-167.
- Yıldız, H.Y. (2005). Infection with metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in ornamental fish imported into Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25(5), 244-246.
- Zhang, M., Yang, Z., Wang, S., Tao, L.F., Xu, L.X., Yan, R.F., Song, X.K., & Li, X.R. (2014). Detection of *Toxoplasma gondii* in shellfish and fish in parts of China. *Veterinary Parasitology*, 200(1-2), 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.022>
- Zhang, E., Kim, M., Rueda, L., Rochman, C., Van Wormer, E., Moore, J., & Shapiro, K. (2022). Association of zoonotic protozoan parasites with microplastics in seawater and implications for human and wildlife health. *Scientific Reports*, 12(1), 6532. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10485-5>
- Ziarati, M., Zorriehzahra, M. J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., Bin Emran, T., Dhama, K., Chaicumpa, Wanpen. & Shokoofeh Shamsi. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 95-118. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2080298>
-

## Türkiye Denizlerinde Önerilen Açık Deniz Koruma Alanları

## Recommended Offshore Protected Areas in Turkish Seas

Ertan Karahanlı<sup>1\*</sup> <sup>1</sup>Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun-TÜRKİYE\*Sorumlu Yazar: [karahanliertan46mail.com](mailto:karahanliertan46mail.com)

Geliş: 21.08.2023

Kabul: 05.10.2023

Yayın: 01.06.2024

**Ahntılama:** Karahanlı, E. (2024). Türkiye denizlerinde önerilen açık deniz koruma alanları. *Acta Aquatica Turcica*, 20(2), 168-181. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1347579>

**Özet:** Bu derleme Türkiye denizlerinin biyolojik çeşitliliğini gelecek kuşaklara aktarılması gerektiğini göstermek, denizlerde koruma alanlarının gerekliliğini ortaya koymayı amaçlamıştır. Denizel çeşitliliği tehdit eden birçok etken vardır. İnsan baskısı, iklim değişikliğiyle bağlantılı olan etkiler, kıyı ve deniz alanları ile sıkı sıkıya bağlı olan toplulukları ve ekonomilerini etkilemektedir. Bazı ülkeler, bu etkileri azaltmak için çaba harcamış ve biyolojik çeşitliliğin korumasını sağlamak için Deniz ve Kıyı Koruma Alanları (DKKA) oluşturmuşlardır. Denizel zenginlikleri görmezden gelmek ve kısa vadeli çıkarlar için yok olmalarına izin vermek, bu konuda toplumu bilgilendirmeye yönelik adımlar atmamak, gelecek kuşaklara bırakabileceğimiz büyük bir ekonomik potansiyeli yok etmektir. Türkiye denizleri biyolojik çeşitlilik bakımından zengin olmasına karşın, bu zenginliğin kaydını oluşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Deniz alanlarının aşırı kullanımı neticesinde bu alanlar bozulmuş ve deniz ekosistemi yok olma tehdidi ile karşı karşıya bırakmıştır. Bu bozulma kıyı ve deniz alanlarının biyolojik çeşitliliğini ve verimliliğini yok ederek, bu alanlarda geri dönüşü mümkün olmayan zararlar bırakmaktadır. Bu olumsuz durumlardan deniz ekosistemini korumak için denizel biyolojik çeşitliliğin fazla olduğu yerlerde kontrollü alanlar oluşturulmalıdır. Türkiye üç tarafı denizlerle çevrili olmasına rağmen, Deniz Koruma Alanları (DKA) statüsüne sahip koruma alanı yoktur. Bu derlemede konuyla ilgili çalışmalar ve mevcut öneriler ele alınacaktır.

**Anahtar kelimeler**

- Biyolojik çeşitlilik
- Koruma alanı
- Ekoloji
- Deniz
- Türkiye suları

**Abstract:** This review aims to underscore the importance of protected areas in the seas and emphasize the need to safeguard the biological diversity of Turkish waters for future generations. Marine diversity faces numerous threats, including human activities and the impacts associated with climate change, which have repercussions for coastal and marine environments, as well as the societies and economies dependent on them. Several countries have taken steps to mitigate these threats by establishing Marine and Coastal Protected Areas (MCPAs) to ensure the conservation of biodiversity. Neglecting marine diversity and allowing it to vanish in favor of short-term interests, without educating the public on this issue, squanders a valuable economic potential that we could pass down to future generations. Although Turkish seas boast rich biodiversity, further studies are needed to comprehensively document this wealth. Excessive exploitation of marine areas has resulted in habitat degradation and poses a severe threat to the marine ecosystem's survival. This degradation jeopardizes the biodiversity and productivity of coastal and marine habitats, causing irreparable damage in these regions. To shield the marine ecosystem from these adverse conditions, it is imperative to establish protected zones in areas with high marine biodiversity. Surprisingly, despite being surrounded by seas on three sides, Turkey lacks designated protected areas with Marine Protected Area (MPA) status. In this review, we will delve into relevant studies and current recommendations on this subject.

**Keywords**

- Biodiversity
- Protected area
- Ecology
- Marine
- Turkish waters

**1. GİRİŞ**

510 milyon km<sup>2</sup> yüz ölçümüne sahip dünyanın, 361 milyon km<sup>2</sup>'si denizler ile kaplıdır. Geniş ve derin çukurları doldurmuş 1,33 milyar km<sup>3</sup> hacminde tuzlu bir su olan denize bütünüyle su küre denir. Okyanuslar ve denizler birçok boğaz aracılığıyla birleşmiş, büyük bir bütünlük teşkil etmektedir.



Ancak coğrafi mevkilerin özelliği ile denizaltı topografyasındaki değişiklikler bu geniş ve derin su kütlelerinin çok önemli farklar kazanmasına sebep olmuştur (İnandık, 1971). Dünya denizleri, canlılar için yaşam kaynağı ve iklim düzenleyicisidir. Ayrıca; yaşam için neredeyse tüm suyun bulunduğu yer, hayati öneme sahip kaynaktır. Denizler insanlığın varoluşundan beri gerek sosyal gerek ekonomik bağlamda vazgeçilmez bir kaynak olmuştur. Denizlerden gerçek anlamda amacına uygun ve etik bir şekilde yararlanan uluslar, tarihin her döneminde diğer uluslara göre daha gelişmiş medeniyetler olmuştur.

Deniz koruma alanları (DKA), denizel ekosistemleri ve bu ekosistemle ilişkili çevrenin korunmasını amaçlar ve bu alanlarda insan aktivitelerine bazı kısıtlamalar getirir. DKA sistemlerini oluşturmanın iki farklı yolu vardır: her biri sıkı bir şekilde korunan nispeten küçük bölgeler oluşturmak ya da içlerinde kesinlikle korunaklı alanlara sahip çoklu koruma alanı oluşturmaktır. Biyolojik çeşitliliği korumak amacıyla, her iki yaklaşımı da içeren deniz ekosistemlerini ve onunla ilişkili kara alanlarını kapsayan etkin bir ekosistem yönetimi oluşturulması gerekmektedir (Kelleher, 1999). Dünya okyanuslarının korunması; günümüzde doğaseverlerin ilgisini çekmektedir.

Denizel biyolojik çeşitliliğin değeri anlaşıldıkça, bu çeşitliliği içeren sistemler hızla bozulmaktadır. Bu sebeple kıyı alanlarının nasıl korunacağına dair yeni fikirler ve korunan alan ilkelerini içeren farklı birçok model ortaya çıkmıştır (Agardy, 1994).

Dünya çapında ilan edilen deniz koruma alanlarının sayısı katlanarak artmaktadır. Deniz koruma alanları çeşitli nedenlerle ilan edildiğinden, yönetim kurumlarının DKA'nın başarısını değerlendirmesine ve içindeki izleme ve araştırma faaliyetlerine rehberlik etmesine izin vermek için her bir DKA'nın özel hedeflerinin belirtilmesi gerekir (Edgar vd., 2007). Deniz Koruma Alanlarının dünya çapında uygulanmasıyla elde edilen deneyimler, gelinen noktada kayda değer faydalar sağladığını göstermiştir. Balıkçılığı ve diğer insan faaliyetlerini kısıtlayan DKA'lar, habitatı ve popülasyonu korumakta, balıkçılık verimini ve sürdürülebilirliğini arttırmaktadır (Balmford vd., 2003). Biyolojik çeşitliliği koruyarak ve sağlıklı balık stoklarını destekleyerek deniz ekolojisine fayda sağlanabileceği gibi korunaklı bölgenin doğayla iç içe olması ve benimsenmesi yoluyla sosyal ve denizlerimizin rekreasyonel kullanımının yanı sıra sürdürülebilir balıkçılığı, turizm faaliyetlerini destekleyerek birçok ekonomik yarar da sağlayabilmektedir. Ayrıca DKA'ların iklim değişikliği etkilerine karşı direncin güçlendirilmesine ve aynı zamanda okyanusun ve denizlerin ekosistem işleyişinin desteklenmesine de yardımcı olabileceği öngörülmektedir.

## 2. DENİZ KORUMA ALANI TANIMI VE AMACI

Dünya Doğayı Koruma Birliği (IUCN) ile ulusal ve uluslararası kurumlar/kuruluşlar tarafından yapılan ve uygun bulunan DKA tanımı: "alçak ve yüksek deniz seviyeleri arasında veya altındaki karasal alanı da kapsayan su ile birlikte, bitki, hayvan, tarihi ve kültürel yapıları ile ilişkili, yasa ve araçlarla kısmen veya tamamen sınırlandırılarak gözetilen alanlardır" (Kenchington & Kelleher, 1992).

Koruma bölgesinin/alanının IUCN 2008 yılında güncellenen tanımı ise, doğanın ve ilişkili ekosistem servisleri / hizmetlerin ve kültürel değerlerin uzun vadeli korunması amacıyla coğrafi sınırları bariz olan, tanınmış, adanmışlık içeren ve yasal ya da diğer etkin yöntemlerle yönetilen alanlardır (López Ornat, 2006).

Deniz Koruma Alanları, okyanus, deniz ve içerisinde yaşamını sürdüren sucül organizmaların birçok tehditle karşı karşıya kaldığında, bu etkilere karşı yaşamını devam ettirmeye çalışması nedeniyle oluşturulması gereken alanlardır. Denizel çeşitliliğe dönük tehditler sırasıyla; aşırı avlanma, deniz çöpleri, su kirliliği ve küresel iklim değişikliği gibi etmenler şeklinde sıralanabilir. Maruz kalınan olumsuz durumlara bağlı olarak tüm makro ve mikro fauna/flora ciddi şekilde etkilenmektedir.

Deniz koruma alanlarının temel amacı: kritik ekolojik sistemleri korumak, ekosistemlerin sürdürülebilirliğine yardımcı olmak, biyolojik çeşitliliği muhafaza etmektir. Günümüze kadar birçok DKA, yalnızca tehdit altındaki türlerin veya doğal konumların korunmasına odaklanmıştır. Bugün ise, denizel biyolojik çeşitliliğin etkin bir şekilde korunmasının, yalnızca belirli türler veya özel alanların değil, çeşitli denizel ve kıyısal habitatları kapsaması gerektiği görülmektedir. Ekosistem temelli bir yaklaşım benimseyen dünyanın ilk "uygun" Deniz Koruma Alanı 1935'te Fort Jefferson Ulusal Anıtı (Florida/ABD) olarak kabul edilmiştir. Fakat Deniz Koruma Alanlarının etkin gücü, Dünya Ulusal Parklar Kongresi ile ortaya konulmuştur. 1962 ve 1982'de deniz, kıyı ve tatlı su alanlarının tüm

dünyada korunan alanlar ağına ilave edilmesi önerisinde bulunulan bir toplantı yapılmıştır.

Dünya çapında denizel yönetimin temel çerçevesi olan 1982 Birleşmiş Milletler Deniz Hukuku Sözleşmesi, dünyadaki bütün ülkeleri denizi ve denizel çevreyi korumak ve sürdürülebilirliğini sağlamakla yükümlü kılmıştır. 1995'te dört ciltlik Deniz Koruma Alanlarını küresel olarak temsil eden bir ağ önerilmiştir (Kelleher vd., 1995); önerilen bu ağ, deniz koruma alanları aracılığıyla denizi ve çevresini korumaya yönelik ilk ve gerçek küresel amaçlı bir ağ olarak tarihe geçmiştir. Bu gelişmeyi takiben 2000 yılında deniz koruma alanları planlayıcıları ve yöneticileri için bir rehber yayınlanmıştır (Salm vd., 2000). Son zamanlarda, kayda değer çabalar sayesinde tüm dünyada deniz koruma alanları kurulmuştur. Buna paralel olarak, kıyılarımızın ve okyanuslarımızın çevresel ve ekonomik sürdürülebilirliğini sağlayarak gelecek nesillere aktarmak için daha fazlasının yapılması gerektiğine olan inanış artarak devam etmektedir. Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi, dünya çapındaki denizel alanların en az %10'unun 2030 yılına kadar etkin bir şekilde korunması için küresel bir hedef belirleyerek önceden yapılan çalışmaları daha da güçlendirmiştir. 2003 yılında, Beşinci Uluslararası Doğayı Koruma Birliği Dünya Parklar Kongresi'nin almış olduğu kararlar ve yaptığı tavsiyelerle konunun önemini vurgulamıştır. Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği'nin 2016 yılında içerisinde düzenlemiş olduğu Dünya Doğayı Koruma Kongresi'nde, 2030'a kadar denizlerin ve okyanusların minimum üçte birinin korunması gerektiğini belirtmiştir. Geçtiğimiz yaklaşık kırk yıl taban alınırca, denizel canlılarda yaklaşık olarak %22 oranında bir azalma olmuştur. Bu yaşanan olumsuz tablo karşısında Birleşmiş Milletler Genel Kurulu'nun 14 Mart 2008 tarihli ve 62/215 sayılı kararında, insanların doğa üzerindeki eylemlerinin, denizel çevre, biyolojik çeşitlilik ve diğer paydaşlar dahil olmak üzere savunmasız denizel çevreler ve biyotalara yönelik olumsuz etkileri olduğu tezi ortaya atılmıştır. Bilhassa okyanusların ve buna bağlı olarak açık deniz ve ekosistemlerin maruz kaldığı olumsuzlukların ilki küresel ısınmadır. Bunu iklim değişikliği ve denizel ekosistem üzerindeki etkileri takip etmektedir. Küresel ısınma ve iklim değişikliğinin dünyada bulunan bütün okyanuslar üzerindeki etkisi, buzul miktarındaki azalma, buna bağlı olarak deniz suyunun aşırı yükselmesi, deniz suyu sıcaklığındaki değişimler, kıyı bölgelerdeki kıyasal erozyon, sucul ortamlardaki asitlik değişimi, denizel canlıların dağılımındaki değişimler gibi etkiler sıralanabilir.

Denizler ve okyanuslar açısından karşılaşılan başka bir sıkıntı da denizel ortamlarda yüzen ya da deniz zemininde biriken plastik ve türevi maddelerin oluşturduğu kirlenmedir. Plastik ve türevi maddelerin kullanım alanlarının geniş olması ve aşırı kullanımı denizlerde aşırı derecede kirlenmeye neden olmaktadır. Yerel ve bölgesel nitelikteki denizel hukuk sözleşmelerinde plastik ve türevlerinin sebep olduğu denizel ortamlardaki kirlenmeye yönelik tedbirler ve hükümler yer almaktadır. Plastik ve türevlerinin deniz yaşamı ve ekolojisinde oluşturduğu tehditler ve olumsuzluklar bilinmesine rağmen, bu konuda etkin bir mücadele verilemediği belirtilmektedir. Ayrıca deniz kirliliği noktasında önemli olan başka bir tehdit ise denizel çöpler ve bu çöplerin deniz dibinde veya çevresinde oluşturduğu birikim ve kirliliktir. Deniz çöpleri, kıyı ya da denizel ortama bırakılmış, atılmış herhangi kalıcı, üretilmiş veya işlenmiş katı atık maddelerdir (UNEP, 2005; Galgani vd., 2010). Bu olumsuz durumu düzeltmek için atılan en önemli adım, Avrupa Parlamentosu'nun Deniz Çevresi Politikaları kapsamında yayınladığı Deniz Stratejisi Çerçeve Direktifi (2008/56/EC)'dir. Bu yönergeye göre Avrupa Birliği'ne üye ülkelerin denizel ortamlarda 2020 yılına kadar "İyi Çevre Durumu" sağlamaları ve sürdürülebilirliğinin sağlanması için öngörülen tehdiye karşı gereken tedbirleri almaları gerekmektedir.

Koruma altına alınması gereken alanların ilki açık denizlerdir. Açık denizler herhangi bir devletin mutlak egemenliğinde olmayan denize sınırı olsun ya da olmasın tüm çevre ülkelerinin kullanımında olan denizel bölgelerdir. Birleşmiş Milletler Deniz Hukuku Antlaşması'nın 86. Maddesindeki açıklamada açık denizlere yönelik uygulama ve düzenlemelerin usul ve esasları belirlenmiştir. Bu kapsamda bir devletin iç sularına, karasularına ve münhasır ekonomik bölgesine ve bir takımada devletin takımadaya sularına ait olmayan bütün deniz alanlarında açık denizlere ilişkin düzenlemeler uygulanacaktır. Denizlerin ve deniz çevresinin koruma altına alınması kapsamında BM bünyesinde uygulamaya konulan ülkeleri dünya ekosisteminin sağlık ve bütünlüğüne teşvik eden 1972 tarihli Stockholm Konferansı bu amaçla yapılan ve gerçekleştirilen eylem planı ve bir dönüm noktasıdır (MBS, 2023). Akabinde, 1976 yılı itibarıyla BM çevre programı kapsamında bölgesel çapta deniz alanlarının koruma altına alınması amacıyla deniz programlarının başlatılması söz konusudur. 1975 yılı itibarıyla ise Akdeniz Eylem Planı gibi birçok gelişme olmuştur.

Deniz Koruma Alanları denizel ortamlar için birçok fayda sağlar. Bunlar;

- Denizel biyolojik çeşitliliği ve denizel ekosistemleri korur ve muhafaza eder,
- Kritik bölgelerdeki üreme ve beslenme alanlarını koruyarak balık popülasyonlarındaki azalmayı tersine çevirmek ve nesillerin devamını sağlar,
- Deniz turizmi için seçilen ve önemli olarak görülen alanların ve bölgelerin profilini yükseltir ve buna bağlı olarak yerel ekonomi seçeneklerini genişleterek bölge halkına maddi kazanç sağlar,
- Eğitim, öğretim, miras ve kültür için fırsatlar sağlar,
- Deniz ekosisteminin uzun vadeli araştırmalarda referans siteleri olarak seçilerek bilimsel araştırmalar için zemin hazırlar,

Biyolojik çeşitlilik penceresinden bakıldığında ise şu faydaları içerir:

- Ekosistemin yapısını işlevini ve bütünlüğünü korumak veya geri kazandırmak,
- Önemli türleri veya nesli tükenmekte olan türleri korumak ve Deniz Koruma Alanı içinde ve dışında balık stoklarını yenilemek,
- Denizel habitatları ve alanları balıkçılık ve diğer insan faaliyetlerinin zararlarından korumak,
- Zarar gören bölgelerdeki Denizel canlıların genetiğini ve popülasyon büyüklüğünü, yaş yapısını ve topluluk kompozisyonunu geri kazandırmak,
- Ekosistemin yenilenmesine yönelik ekosistem tabanlı proje sahiplerine katkıda bulunmak ve ekosistem direncini artırmak,
- Aşırı avlanma yoluyla zarara uğrayan türler için bu etkilerin azaltılmasına yardımcı olacak gücü sağlamak,
- Deniz türlerinin yumurta ve larvalarının diğer alanlara dağıtılabileceği üreme bölgelerini koruyarak yerel türlerin sürdürülebilirliğini sağlamak şeklinde birçok faydası sıralanabilir.

DKA, bilimsel temelli titiz bir yaklaşımla uygulandığında etkili olur, ancak tüm biyolojik çeşitliliği korumak için sadece yönetim yaklaşımı olarak kabul edilmemesi gerekmektedir. Deniz koruma alanları okyanus ve denizlerin biyolojik çeşitliliğini korumak için en iyi araçtır; ancak kirlilik, kara kaynaklı kirleticiler ve iklim değişikliği gibi dış stres faktörlerine karşı savunmasız kalmaktadırlar. Bu nedenle DKA, daha geniş korunaklı alan ve deniz kıyısı boyunca diğer geniş ekosistem tabanlı yönetim yaklaşımlarıyla birlikte düşünülmesi gerekmektedir.

Herhangi bir korunaklı alandan elde edilen faydaların tam kombinasyonu, koruma seviyelerine, yönetimin etkinliğine, koruma altındaki alanın büyüklüğüne ve korumanın uygulandığı sürenin uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir.

DKA'nın balık ve omurgasız popülasyonlarının bolluğu, biyokütlesi ve çeşitliliğinin artmasına sebep olabileceğine dair önemli kanıtlar vardır.

Deniz koruma alanları için yapılan güncel araştırmaya göre; etkili korunan alanların 2 kat daha fazla balık türüne, 5 kat daha fazla balık biyokütlesine ve 14 kat daha fazla köpekbalığı biyokütlesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Edgar vd., 2009). DKA'nın yaşam döngüsü: ekolojik, sosyal ve ekonomik hususları kapsayan bütünsel bir yaklaşım gerekmektedir.

## **2.1. Deniz Koruma Alanı Oluşum Aşamaları ve Ayırt Edici Özellikleri**

### **2.1.1. Hazırlık aşaması**

DKA'nın belirlenmesi, oluşturulması ve ilanını içeren hususları kapsamaktadır. Güçlü paydaş katılımı ile doğal kaynaklar ve sosyo-ekonomik koşullar hakkında mevcut durum bildirimini aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

### **2.1.2. Öncü aşama**

DKA'nın aktif hale geldiği aşamadır. Deniz koruma alanları paydaşlarıyla güçlü bağlar kurulmuş, yönetim ve kontrol faaliyetleri oluşturulmuş, farklılıklar izlenmeye başlanmıştır.

### **2.1.3. Kendine yeterlik aşaması**

DKA'nın amaçlarına ulaştığını, sosyal, kültürel ve ekonomik kazanımların bütün taraflar arasında paylaşıldığını ortaya koyarak DKA'nın başarısının garantilendiği aşamadır.

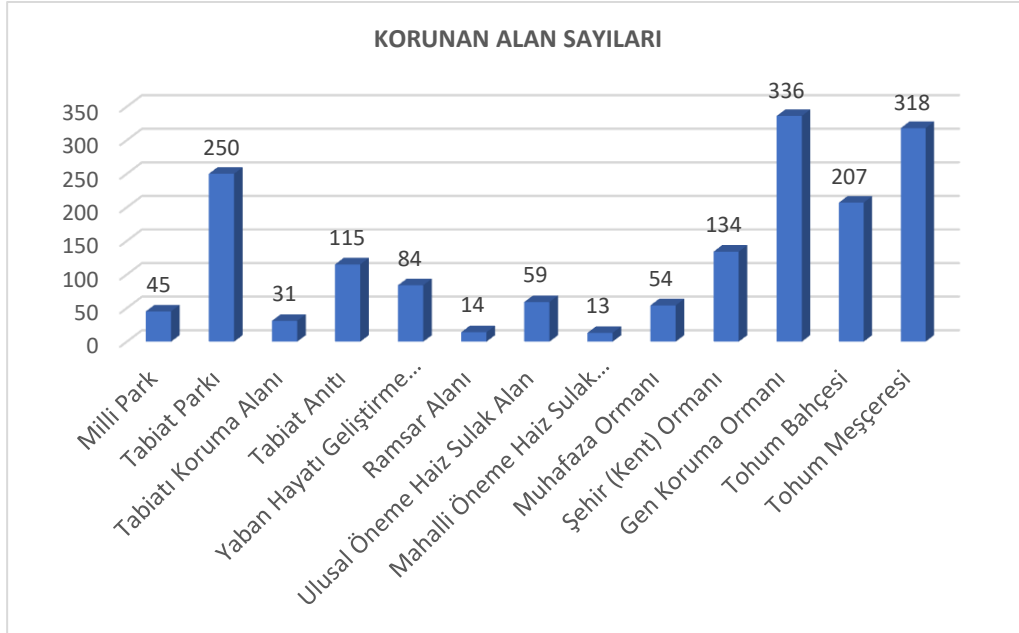
Korunacak hassas alanların ayırt edici özellikleri şu şekilde sıralanabilir: Ulusal veya uluslararası ölçekte sıra dışı ekosistemlere ve biyolojik çeşitlilik anlamında değerli alanlara ve nadir bulunan türlere ev sahipliği yaparlar. Bu alanlar Jeolojik, jeomorfolojik özellikler bakımından korunmaktadır. İnsan etkisi olmadan oluşmuştur ve insan etkileri sonucu bozulma, tahrip olma tehdidi altındadır. Ekolojik açıdan yerel türlerin büyük kısmını bünyesinde barındırır. Alanın belirlenmiş koruma



amaçlarına yardımcı olacak arazi yapıları ile çevrilidir.

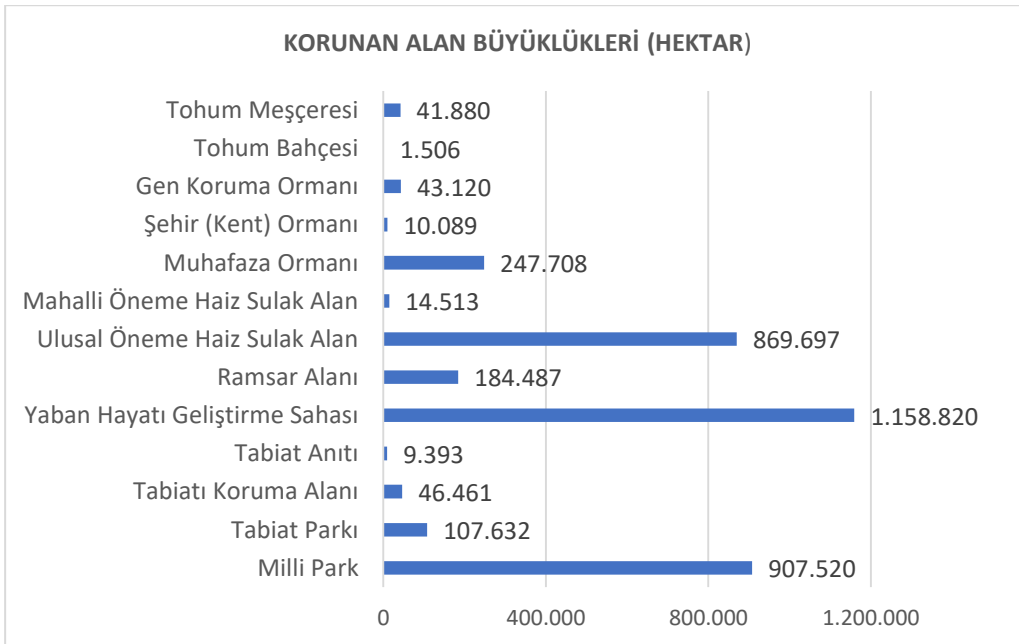
### 3. GENEL KORUMA ALANLARI VE İSTATİSTİK VERİLER

Şekil 1’de görüldüğü gibi sulak alan ve Ramsar alanı dışında denizlerle ilgili daha kapsamlı bir korunma alanı mevcut değildir. Türkiye denizlerinin biyolojik çeşitliliğini göz önüne alındığında bu zenginliği korumak ve yaşatmak için DKA ilan edilmesi ve bu alanların sürdürülebilirliğini sağlamak için ortaklaşa çalışmalar yapılması gerekmektedir



Şekil 1. Türkiye’deki korunan alan sayıları (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023).

Şekil 2’de Korunan alan büyüklüklerine baktığımızda korunan alanlar içinde açık deniz koruma alanı mevcut değildir. Deniz koruma alanı ilan edilmesi; balıkçılığa, turizme dolayısıyla ülke ekonomisine ciddi katkı sağlayacaktır. Deniz koruma alanlarının gerekliliği konusunda çok fazla çalışma yapılarak bu değer denizlerimize kazandırılması gerekmektedir.



Şekil 2. Türkiye’deki korunan alan büyüklükleri (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023).

## 4. TÜRKİYE’NİN RAMSAR VE ÖZEL ÇEVRE KORUMA ALANLARI

### 4.1. Ramsar Alanları

Sulak Alan Sözleşmesi Hazar Denizi güneyinde bulunan Ramsar kentinde, 2 Şubat 1971 tarihinde imzalanan devletlerarası bir anlaşmadır. Bundan dolayı, son günlerde bu anlaşmanın adı genellikle “Sulak Alanlar Anlaşması” diye anılmasına rağmen, ismi “Ramsar Antlaşması” olarak günümüze kadar gelmiştir. Türkiye 1994 tarihinde Ramsar Sözleşmesi’ni kabul etmiş, Ramsar alanı olarak belirlediği alanlara sahip çıkacağını ve koruyacağını, alanların yönetimsel planlarını hazırlayacağını ve sürdürülebilirliğini sağlayacağını garanti altına almıştır ve kabul etmiştir. Ramsar Sözleşmesi’ne göre Türkiye’de 1327 alanın 135’i uluslararası öneme sahip sulak alan olarak kabul edilmiştir. 76 bölgeden 56’sı su kuşları türleri, 4’ü su ürünleri ve balık, 16’sı su kuşları ve balık bakımından uluslararası değere sahiptir.

Türkiye’de 135 adet ulusal öneme sahip sulak alandan 12’si Ramsar Alanı ölçütlerine göre Ramsar sulak alanı olarak ilan edilmiş ve 198 sulak alan uluslararası öneme sahip sulak alan olarak onaylanmıştır (Peyzax, 2023). Ramsar ölçütlerine göre kabul edilip onaylanan alanlar aşağıda verilmiştir.

**Tablo 1.** Türkiye’deki Ramsar alanları (Peyzax, 2023).

Ramsar Alanları	Bulunduğu Yer	İlan Edildiği Yıl
Göksu Deltası	Mersin	1994
Burdur Gölü	Burdur	1994
Seyfe Gölü	Kırşehir	1994
Manyas Gölü	Balıkesir	1994
Sultan Sazlığı	Kayseri	1994
Kızılırmak Deltası	Samsun	1998
Akyatan Lagünü	Adana	1998
Uluabat Gölü	Bursa	1998
Gediz Deltası	İzmir	1998
Meke Gölü	Konya	2005
Yumurtalık Lagünleri	Adana	2005
Kızören Obruğu	Konya	2006
Nemrut Kalderası	Bitlis	2003
Kuyucuk Gölü	Kars	2009

Türkiye’de Sulak Alanların maruz kaldığı sorunlar; tarım veya yerleşim maksatlı kurutma, sanayi, tarım, hayvancılık ve yerleşim kökenli kirlilik, sulara yabancı balık türlerinin bırakılması, aşırı avcılık, sucul canlıların yaşam alanlarının bozulması olarak sıralanabilir (WWF, 2023). Bu sorunları kritik bölgelerde deniz koruma alanı ilan ederek çözüme kavuşturmak gerekmektedir.

### 4.2. Özel Çevre Koruma Alanları

Amacı, uluslararası işbirliği olan Akdeniz’de biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik, 1976 yılında Barselona’da hazırlanan Akdeniz’in ve denizel çevresinin kirlenmesini önlemek için imzalanan bir sözleşmedir. Sözleşmenin protokollerinden olan Akdeniz’de Özel Koruma Alanlarına İlişkin Protokol kapsamında özel çevre koruma alanları ilanı başlatılmıştır (CSB, 2023). Akdeniz’in Kirliliğe Karşı Korunması Sözleşmesi’nin yürürlüğe girmesinin ardından, 1989 yılında yürürlüğe alınan Özel Çevre Koruma Bölgeleri; tümüyle Milli Park statüsüyle benzer görevleri yürüten fakat planlama yetkisi de verilen bir deniz koruma şekli haline gelmiştir. Türkiye’nin doğal ve kültürel varlıklarının korunmasında çok önemli görevler yürüten kuruluş, 2011 yılında yeniden düzenlenerek Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Tabiat Varlıklarını Koruma Genel Müdürlüğü çatısı altına alınmıştır (Turkcev, 2023).

Ülkemizin ilk özel çevre koruma bölgesi olan Gökova Türkiye’nin eşsiz körfezlerinden en önemlisi ve kum köpekbalığının Akdeniz’deki tek üreme bölgesidir. Günümüzde Özel Çevre Koruma Bölgesi ilan etmek, bölgede yapılan incelemeler ve değerlendirmeler ve alakalı Bakanlıklardan görüş alınarak Çevre ve Şehircilik Bakanlığı’nın teklifi üzerine Bakanlar Kurulu kararıyla gerçekleştirilmektedir.

Değerlendirmelerde, koruma alanların seçimi ve kurulması için hazırlanan ölçütlere başvurulmaktadır. Bu uluslararası ölçütler genellikle uluslararası kabul görmüş, ancak matematiksel formüle dayanmayan bilimsel gözlem ve araştırmalar sonucunda elde edilen veriler ile ilgili uzmanlar tarafından yorumlanan ölçütlerdir (UDAP, 2023). Bu ölçütler ışığında Türkiye’de ilan edilen özel çevre koruma bölgelerine aşağıdaki tabloda yer verilmiştir.

**Tablo 2.** Türkiye’de bulunan özel çevre koruma bölgeleri (UDAP, 2023).

Özel Çevre Koruma Bölgeleri	Bulunduğu Yer	İlan Edildiği Yıl
Gökova	Muğla	1988
Köyceğiz-Dalyan	Muğla	1988
Fethiye-Göcek	Muğla	1988
Patara	Muğla-Antalya	1990
Kaş-Kekova	Antalya	1990
Göksu Deltası	Mersin	1990
Belek	Antalya	1990
Foça	İzmir	1990
Datça-Bozburun	Muğla	1990
Pamukkale	Denizli	1990
Gölbaşı	Ankara	1990
Ihlara	Aksaray	1990
Tuz Gölü	Ankara-Konya Aksaray	2000
Uzungöl	Trabzon	2004
Saroz Körfezi	Çanakkale-Edirne	2010

Tablo 1’de yer alan alanların dışında biyolojik çeşitlilik bakımından çok önemli alanların olup olmadığı yönünde araştırmalar yapılması gereklidir. Bu alanlar tespit edilerek Özel Çevre Koruma Bölgesi statüsüne kavuşturulması gerekmektedir. Dahası bu özel çevre koruma alanlarından denizle kıyısı olanların koruma bölgesi açık denize doğru genişletilmesi gereklidir.

## 5. TÜRKİYE’DE ÖNERİLEN KORUMA ALANLARI VE YÜRÜRLÜKTE OLAN İLGİLİ KANUNLAR

Türkiye denizlerinde koruma alanlarına yönelik çalışmalar 1950’li yıllara denk gelse de yasa, kurum ve hükümet düzenlemeleri daha çok 1980’lerden sonra gerçekleşmiştir (Kaboğlu vd., 2015). İlgili kanunlar şu şekildedir; Limanlar Kanunu (1923), Orman Kanunu (1956), Su Ürünleri Kanunu (1971), Turizm Teşvik Kanunu (1982), Kültür ve Tabiat Varlıklarını Koruma Kanunu (1983), Çevre Kanunu (1983), Milli Parklar Kanunu (1983), Boğaziçi Hukuku (1983), İskân Kanunu (1985), Özel Çevre Koruma Bölgesi Kuruluşu (1989), Kıyı kanunu (1990)’dur.

### 5.1. Karadeniz İçin Önerilen Açık Deniz Koruma Alanları

Karadeniz, Marmara Denizi ve Akdeniz’de henüz açık deniz koruma alanları mevcut değildir; ancak koruma alanı olarak öneriler mevcuttur (Öztürk vd., 2013).

#### 5.1.1. İğneada Bölgesi

Mezgit (*Merlangius merlangus*), keserbaş barbut (*Mullus barbatus*) ve kalkan (*Scophthalmus maeotica*) gibi balık türleri İğneada açıklarında büyük ölçekli balıkçılığın hedef türleridir (Keskin, 2012). Bölgedeki sığ sular bu ticari türlerin yanı sıra trol balıkçılığıyla yakalanan palamut (*Sarda sarda*) yavruları tarafından da beslenme alanı olarak kullanılmaktadır. Buradaki kıyı deniz biyoçeşitliliği, kaya balığı (*Mesogobius batrachocephalus*) ve deniziğnesi (*Syngnathus tenuirostris*) gibi nadir türler bakımından zengindir (Keskin, 2010; 2012). Bu bölge ayrıca kalkan (*S. maeotica*)’nın üreme ve beslenme alanıdır. Bu türün popülasyonu, aşırı avlanma ve yasak avcılık sebebiyle Karadeniz’de tehdit altındadır (Öztürk vd., 2013). Bu bölgede mersin balığı ve kalkan, aşırı avcılık baskısı sebebiyle nesli tehdit altında olan türler arasındadır. Ayrıca İğneada bölgesinde yapılan bentoz çalışmalarında; bu bölgenin denizel biyolojik çeşitlilik bakımından çok zengin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada yumuşak substrat üzerinde toplanan materyalin analizlerinde yedi taksonun 154 türüne (Turbellaria, Nemertea, Nematoda, Oligochaeta, Polychaeta, Crustacea, Phoronida, Mollusca, Hemichordata) ait toplam 45959 birey tespit edilmiştir (Kurt vd., 2017). İğneada bölgesi, İvan ve Peter Adaları gibi hali hazırda kurulmuş bulunan Bulgar DKA’larına yakın olduğu için iki DKA arasında

bağlantı kurulması gerektiği ve ayrıca bu bölge için ortak eylem başlatılması gerektiği belirtilmektedir (Öztürk vd., 2013).

### 5.1.2. Şile-Kefken

Eşsiz bir deniz koridoru olan İstanbul Boğazı'na yakınlığı nedeniyle Karadeniz'in deniz ekolojisi ve kıyı biyolojik çeşitliliği için hayati öneme sahiptir. Bu tür geçiş yolları ve merkez alanları (beslenme, üreme ve kışlama alanları) birbirine tamamlayarak ekosistem yapısını, işlevini ve bağlantısını koruyarak ve sucul hayvanların ilişkili denizler arasında yaşadığı çekirdek alanların basamak görevi görebileceği öngörülmektedir (Pickaver, 2002). Bu bölgede deniz kuşları da dahil olmak üzere birçok göçmen tür görülmektedir (Nankinov, 2001). Ayrıca bu bölge, sapan köpek balığı (*Alopias vulpinus*), mahmuzlu camgöz (*Squalus acanthias*), denizati (*Hippocampus guttulatus*) ve Avrupa mersin morinası (*Huso huso*) habitatıdır.

### 5.1.3. Cide-Doğanyurt

Akdeniz foku (*Monachus monachus*)' nun bulunduğu Cide ve Doğanyurt arası deniz koruma alanı olarak önerilmiştir (Berkes vd., 1979). Karadeniz'in Türkiye kıyılarında özellikle de Cide-Doğanyurt kıyılarında minimum 15 foku yaşadığı belirtilmiştir (Öztürk, 1994).

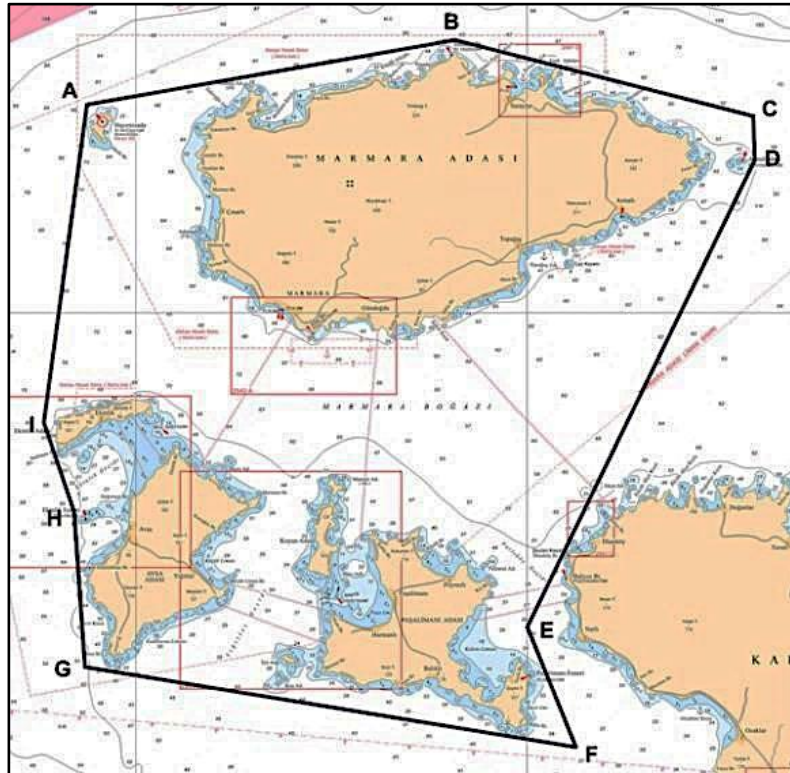
### 5.1.4. Kızılırmak – Yeşilirmak Nehirleri Deltaları

Daha çok Kızılırmak deltasında, Mersin balığı türleri *Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus* yaşamakta, Karadeniz'in güney kıyılarında nadiren de olsa mersin morinası *Huso huso* görülmektedir (Ustaoglu vd., 2011). Delta 1998 senesinde Ramsar alanı olarak kabul edilmiştir. Daha sonra Orman ve Su İşleri Bakanlığı (2012)'nin Yeşilirmak Deltası'nın sulak alan özelliğinden dolayı koruma alanı olarak ilan edilmesi yönünde değerlendirmeleri mevcuttur.

### 5.1.5. Trabzon Mezgit Resifi

Trabzon mezgit resifleri, tüm deniz yaşamı için, özellikle bentik türler için önemli habitatlardır. Mezgit Resifinin denizin ortasında 80-90 m derinlikte olduğu belirtilmiştir (Demirel, 1993). Resif Trabzon'a 30 mil uzakta ve 2 km uzunluğundadır. Tespit edilen başlıca balık türleri; kalkan, mezgit, kefal ve barbundur.

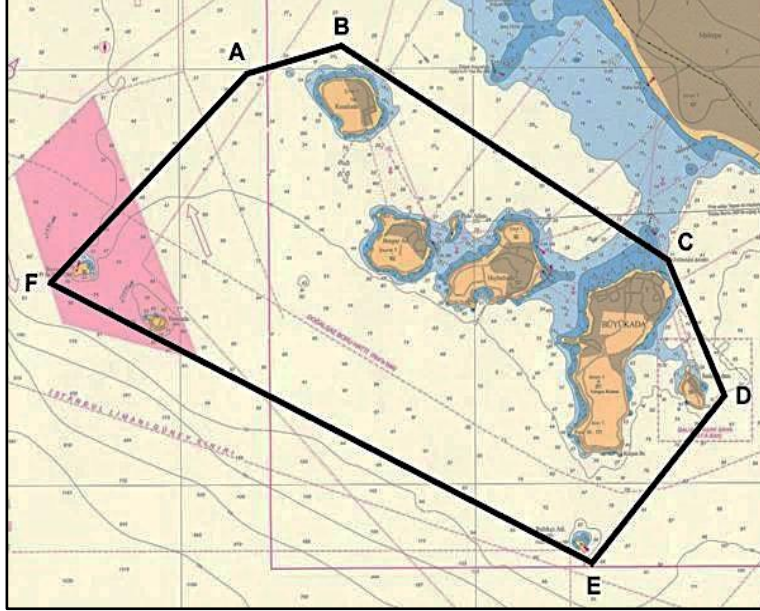
## 5.2. Marmara Deniz'i İçin Önerilen Deniz Koruma Alanları



Şekil 3. Marmara Adaları'nda önerilen koruma alan sınırı (A- Hayırsız Ada kuzeybatısı, B- Saraylar, Marmara/Balıkesir, C, D- Marmara Adası doğusu, E- Tuzla'nın Kuzeybatısı, Tuzla'nın güneydoğusu, G- Avşa Adası'nın Güneybatısı, H- Etkinlik Adası güneyi, I- Etkinlik Adası'nın batısı, Tüдав, 2023).

Koruma alanı olarak önerilen bölge Marmara Adaları, İstanbul Adaları ve çevrelerini içine almaktadır. Marmara Adaları'nda: Marmara Adası, Avşa Adası, Koyun Adası, Paşa limanı Adası ve çevresi yer almaktadır. İstanbul Adalarında: Burgaz Adası, Kınalıada, Büyükkada, Sedef Adası, Heybeliada ve çevresi yer almaktadır.

Şekil 3'te görülen bölge Marmara Adası, Avşa Adası, Paşa limanı Adası, Koyun Adasını içine alan bölge koruma alanı olarak önerilmektedir. Bu bölgeler yoğun nüfusun etkisinde olan bölgelerdir. Önerilen bu alanlarda deniz kirliliği ve trafiği etkili olmakta ve denize bırakılan sanayi sularıyla da bölge canlıları risk altındadır.



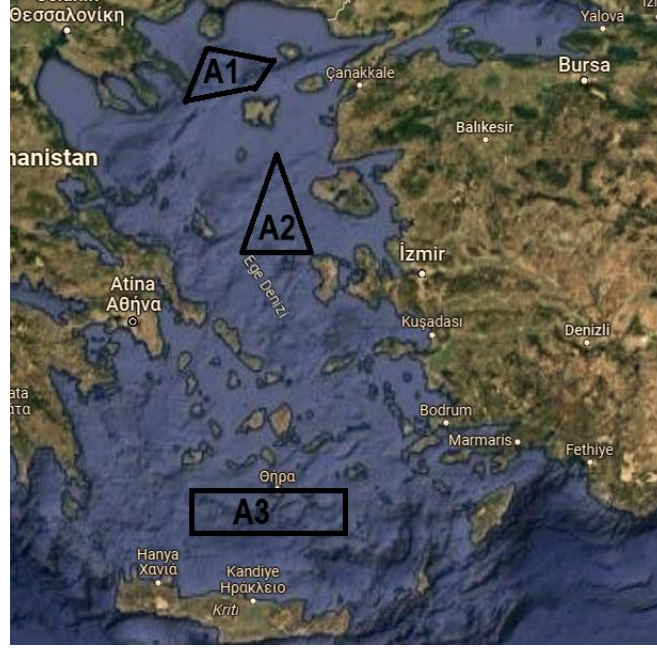
**Şekil 4.** İstanbul Adaları'nda önerilen koruma alanları (A- Burgazada'nın kuzeybatısı, B- Burgazada'nın kuzeyi, C- Büyükkada'nın kuzeydoğusu, D- Sedef Adası'nın doğusu, E- Tavşan Adası'nın güneyi, F- Sivri Ada Adası, Tüдав, 2023).

Şekil 4'te görülen Burgaz Adası, Kınalıada, Büyükkada, Sedef Adası, Heybeliada ve çevresini içine alan bölge koruma alanı olarak önerilmektedir.

### 5.3. Akdeniz İçin Açık Deniz Koruma Alanı Önerileri

Türkiye, 1988'den beri, Akdeniz ve Ege kıyıları boyunca deniz koruma alanı ilan etmeye başlamıştır. Bugün ülkemizde değişik statülerde koruma altında olan ve farklı bakanlıklar tarafından yönetilen yaklaşık 32 deniz ve kıyı koruma alanı mevcuttur. Bununla birlikte Tabiat Varlıkları Koruma Genel Müdürlüğü tarafından yönetilen toplamda 18 Özel Çevre Koruma Bölgesinin 12'si, yaklaşık 17,575 km<sup>2</sup> deniz ve kıyı alanını kapsamaktadır. Türkiye karasularının yaklaşık %4'ü yasal koruma bölgesi statüsüne sahip olmasına rağmen Açık Deniz Koruma Alanı mevcut değildir.

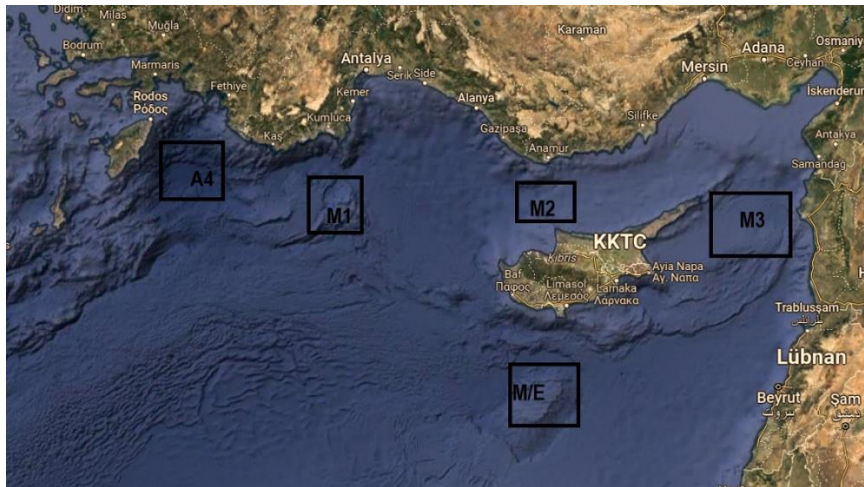




**Şekil 5.** Ege Denizindeki Açık Deniz koruma alanları önerileri (A1- Gökçeada'nın batısı, A2- İzmir Karaburun'un kuzeybatısı, A3- Girit ve Rodos arasındaki bölge - Tüдав, 2023'ten düzenlenmiştir).

Akdeniz'deki deniz koruma alanlarının hemen hemen tamamı küçük boyutlu ve deniz kıyısına yakın bölgelerde bulunmaktadır. Bugüne kadar, açık denizlerde çok az sayıda deniz koruma alanı ve balıkçılığa yasak olan korunaklı alan belirlenmiştir. Fakat bu alanların hepsinde tam olarak yasal düzenleme uygulanmamaktadır. Yasalarla sınırları ve koruma şekli belirlenen ve denetlenen DKA'ların çoğaltılması ve bu alanların ölçeklendirilmesi gerektiği belirtilmektedir (Gomei vd., 2019; FAO/GFCM, 2019).

Şekil 5'te gösterilen ve Ege Denizi'nde bulunan banklar açık deniz koruma alanları olarak seçilmesi gereken en önemli alanlardır. Ayrıca Güney Ege'de yer alan bölgeyi içine alan bölge de koruma alanı olarak seçilmesi gereken bir alandır. Bu bölgeler birçok türün geçiş yol üzerindedir. Birçok balık türü bu bölgelerden beslenme ve üreme alanı olarak faydalanmaktadır. Ege Denizi; Akdeniz ve Marmara Denizi arasında bulunur ve iki deniz arasındaki insan kaynaklı baskılardan oldukça etkilenmektedir. Yunanistan ile ortak eylem planlanarak bu bölgede ve en önemlisi Kuzey Ege'de korunaklı alan tespit edilmesi ve bu bölgenin koruma altına alınması için harekete geçilmesi gerekmektedir.



**Şekil 6.** Doğu Akdeniz'deki koruma alanı önerileri (A4- Rodos Sırtı ve Çukuru, M1- Fenike Denizaltı Dağları, M2- Akdeniz Yamacı, M3- Turgut Reis Sırtı, M/E- Akdeniz Denizaltı Dağları - Tüдав, 2023'ten düzenlenmiştir).

Şekil 6'da gösterilen Doğu Akdeniz'de A4- Rodos Sırtı ve Çukuru, M1- Fenike Denizaltı Dağları, M2- Akdeniz Yamacı, M3- Turgut Reis Sırtı, M/E- Akdeniz Denizaltı Dağları artan petrol kirliliği, gemi kaynaklı kirlenme sorunu, düzensiz ve plansız kaçak avcılık baskısı gibi konularla ön plana çıkmaktadır. Doğu Akdeniz'de biyolojik çeşitlilik, biyolojik üretim ender bulunan türler, banklar ve bentik sistemler gibi özel ekosistemler, nesli tehlikede olan türler ile nadir ekosistemler bulunmaktadır. Akdeniz, 17.000'den fazla deniz türüne (dünyanın bilinen deniz türlerinin %4 ila 18'i) ev sahipliği yapmaktadır. Bu Türlerin %20-30' u endemiktir. Akdeniz'de 1233 adet Deniz Koruma Alanı ve alan tabanlı diğer etkili koruma önlemleri bulunmaktadır. Bu önlemlerin kapsadığı alan Akdeniz'in %8,9'unun üzerindedir. Ancak sadece %10'unda geçerli yönetim planlarını uygulamaktadır. Akdeniz deniz yüzeyinin yalnızca %0,04'ü yasaklı ya da avlanma yasağı uygulanan denizel alanla kaplıdır. Bu devasa denizde 1000'den fazla yerli olmayan deniz türü tespit edilmiştir.

Korallijen ekosistemler (iklim direnci ve balıkçılığın sürdürülmesi için çok önemlidir) yaklaşık 2760 km<sup>2</sup>'lik bir alanı kaplar. Bu ekosistem yanlış av araçları kullanımı, tekne demirleme, istilacı türler, kirlilik ve iklim değişikliği sebebiyle tehdit altındadır.

#### 5.4. Doğu Akdeniz için Önerilen Deniz Koruma Alanı



Şekil 7. Önerilen Samandağ Deniz Mahallesi - Yayladağı Keldağ mevki (Türán vd., 2014'ten düzenlenmiştir).

Şekil 7'de yer alan Samandağ ve Yayladağı arasını kapsayan bölgedir. Bölgede Akdeniz foku, *Monachus monachus* (Hermann, 1779) yaşamını sürdürmektedir. Bölge Akdeniz'e endemik olan bu türe yaşam alanı oluşturmaktadır. Bu türün nesli azalma tehdidi altında olduğundan IUCN ve Barcelona Sözleşmesi gereği korunması sağlanmıştır (Türán vd., 2014).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Her bir deniz alanının kendine has özelliklerinin bulunması, burada yaşayan endemik denizel canlıların bulunması ve bu deniz canlılarına ve de alanlarına yönelik tehditlerin farklı olması nedeniyle etkili bir korumanın sağlanabilmesi zordur. Tüm deniz alanlarına uygulanabilecek ortak bir koruma planı oluşturmak ve bu plana uygulanabilecek bir çözüm yöntemi bulunmamaktadır. Her deniz ve denizel alanın özelliklerinin dikkate alınması bu kapsamda plan ve strateji uygulanması hedeflenen deniz alanının korunmasının derecesini ve kapsamını belirleyecektir.

Bu derlemede önerilen alanlar hem balıkçılık açısından hem de nadir türlerin bölgede bulunması açısından çok kıymetlidir. Bu bölgedeki balıkçılık ve turizm faaliyetlerinin ülke ve bölge ekonomisine katkısı çok fazladır. Akdeniz biyolojik çeşitlilik bakımından çok zengindir. Ülkemizin diğer denizlerini biyolojik çeşitlilik ve ekolojik olarak olumlu şekilde etkilemektedir.

Ülkemizin de taraf olduğu denizel biyolojik çeşitlilik ve sürdürülebilirlik ile ilgili birçok sözleşme vardır. Gelecek kuşaklara temiz su deniz ürünleri, temiz kıyısız bölge bırakmak için herkes elini taşın

altına koymalıdır. Kıyusal ve açık deniz koruma alanları ilan ederek: hem sürdürülebilir balıkçılık ve su ürünleri sağlanmış olur hem de kıyusal ve denizel kirlenme önlenmiş olur. Deniz koruma alanları ve sürdürülebilir balıkçılık ile ilgili bilimsel çalışmalar yapmak ve bu alanda çalışmak ve araştırmalar yapmak isteyen öğrenci ve akademisyenlere daha fazla destek verilmelidir.

Olumsuz baskı, aşırı avcılık ve deniz kirliliği üzerine hem ilgili Bakanlıklar hem de birey olarak üzerimize düşen görevleri yapmalıyız. Deniz koruma alanları önemi üzerinde daha fazla durmamız gerekmektedir. Denizlerin sağlıklı yönetilmesi ve sürdürülebilir su ürünleri ve balıkçılık konusunda toplum olarak bizlerin görevi olmalıdır. Açık deniz ve kıyı yönetimi ile ilgili daha belirgin ve faydalı adımlar atılmalı ve en kısa zamanda bu adımları atmak ve denetlemek adına Deniz Bakanlığı kurulmalı ve bakanlık olarak denizel biyolojik çeşitlilik ve sürdürülebilir balıkçılık üzerine yapılması gerekli her türlü adımları atmalıdır.

Ülkemizin üç tarafı denizlerle çevrili yarımada olması, Asya ve Avrupa arasında köprü durumunda ve önemli boğazlara sahip olması gibi politik öneme sahip olmasına rağmen bu değerlere sahip çıkılmamaktadır. Ayrıca sahip olduğumuz bu denizlerden birçok balıkçılık faaliyeti yapılmaktadır. Ancak bu faaliyetlerin ülke ekonomisine olan katkısına rağmen su ürünlerinin önemi hala tam anlamıyla kavranmamıştır. Mevcut durumda denizlerimiz için özel deniz koruma alanlarının ve açık deniz koruma alanları (DKA) oluşturmak ve ilan etmek ve bu sayede sürdürülebilir bir biyolojik çeşitlilik sağlanması mutlaka gereklidir. Bu konuda ülkelerin çoğu nasıl bir yol izleyeceğini bilememektedir. Ancak uluslararası işbirliği ile ortak planlamalar yapılarak bir yol haritası çizilmeli ve potansiyel deniz koruma alanları tespit edilmesi gerekmektedir. DKA ilan edilirken o bölgenin biyolojik çeşitliliğinin mutlaka bilinmesi gereklidir. Bölgedeki yerli ve yabancı türler, nesli tükenmekte ya da tehdit altında olan canlıların olup olmadığı, bölgenin balık potansiyeli ve kirlilik baskısının bilinmesi gerekmektedir.

Daha bilinçli politika oluşturmak, deniz koruma alanlarının olumlu, olumsuz sosyal etkileri ve farklılıkları daha iyi belgelemek ve açıklamak için daha fazla bilimsel araştırma yapmak gereklidir. Denizlerimizle ilgili yapılan bilimsel çalışmalarla Deniz Koruma Alanlarının balıkçılar ve diğer paydaşlar bakımından olumlu ve olumsuz etkileri yakından incelenebilir (Mascia vd., 2009). Deniz koruma alanları balıkçılık ve diğer su ürünleri ile geçimini sağlayan gruplar arasında yanlış (gelir elde etmelerine engel olunması gibi) algılanabilir. Bu koruma sistemi, paydaşlarla açık bir şekilde paylaşılmalı ve bu sistem alanında uzman kişilerce doğru bir şekilde aktarılmalıdır. Dünyadaki birçok ülke kendi sınırları içinde Açık Deniz Koruma Alanları ilan etmiştir ve bilimsel çalışmalarını günümüzde aktif bir şekilde devam ettirmektedir.

Küresel türler ve habitat çeşitliliği, biyolojik çeşitlilik kaybını durdurmaya yönelik uluslararası çabalara rağmen, hiçbir azalma belirtisi olmadan, benzeri görülmemiş oranlarda düşmektedir. Biyolojik istilalar ve iklim değişikliği bu tür düşüşlerin ardındaki iki temel etkidir. İstilacı türlerin çoğalması, yakın zamanda yaşanan türlerin yok oluşunun %58'yle ilişkilendirilebilir ve şu anda dünya çapında yerli flora ve faunanın korunması açısından büyük bir tehdit olarak değerlendirilmektedir. Sorun, istilacı türlerin sayısının geçen yüzyılda dört kat arttığı, özellikle Avrupa'da ciddi boyutlara ulaşmıştır ve devam eden iklim şartlarıyla birlikte sosyo-ekonomik faaliyetlerin yoğunlaşmasıyla birlikte muhtemelen artmaya devam edecektir.

## **FİNANS KAYNAĞI**

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

## **ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Yazar bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan etmektedir.

## **YAZAR KATKILARI**

Çalışma tek yazarlıdır. Çalışmanın tüm bölümleri yazar tarafından tamamlanmıştır.

## **ETİK ONAY BEYANI**

Bu çalışmada deney hayvanları kullanılmaması nedeniyle Yerel Etik Kurul Onayı alınmamıştır.



## VERİ KULLANILABİLİRLİK ONAYI

Bu çalışmada kullanılan veriler makul talep üzerine ilgili yazarlardan temin edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Agardy, M. T. (1994). Advances in marine conservation: the role of marine protected areas. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(7), 267-270. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90297-6](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90297-6)
- Balmford, A., Gravestock, P., Hockley, N., McClean, C. J., & Roberts, C. M. (2004). The worldwide costs of marine protected areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9694-9697.
- Berkes, F., Anat, H., Esenel, M., & Kislalioglu, M. (1978, May 2-5). *Distribution and ecology of Monachus monachus on Turkish coasts* [Oral Presentation]. 1st International Conference on the Mediterranean Monk Seal, Rhodes, Greece.
- CSB. (2023). Türkiye'nin Deniz ve Kıyı Koruma Alanları Ulusal Stratejisi (taslak). <https://docplayer.biz.tr/5700538-T-c-cevre-ve-sehircilik-bakanligi-turkiye-nin-deniz-ve-kiyi-koruma-alanlari-ulusal-stratejisi-taslak.html>. (Erişim tarihi: 02 Haziran 2023).
- Demirel, O. (1993). *Hydrographic plans and three dimensional images of bottom morphology by echosounder data* [Master Thesis, Karadeniz Technical University].
- Rothwell, D. R., & Stephens, T. (2023). The international law of the sea. *Bloomsbury Publishing*, 25(16), 380.
- Edgar, G. J., Russ, G. R., & Babcock, R. C. (2007). Marine protected areas. *Marine Ecology*, 27, 533-555.
- Edgar, G. J., & Stuart-Smith, R. D. (2009). Ecological effects of marine protected areas on rocky reef communities-a continental-scale analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 388, 51-62. <https://doi.org/10.3354/meps08149>
- FAO/GFCM. (2019). Report of the twenty-first session of the scientific advisory committee on fisheries (Report No: 1290). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [www.fao.org/3/ca6704b/ca6704b.pdf](http://www.fao.org/3/ca6704b/ca6704b.pdf)
- Galgani, F., Fleet, D., Van Franeker, J. A., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., Oosterbaan, L., Poitou, I., Hanke, G., Thompson, R., Amato, E., Birkun, A., & Janssen, C. (2010). *Marine strategy framework directive-task group 10 report marine litter* (Report No: 312010-2009/2010). Office for Official Publications of the European Communities. <https://doi.org/10.2788/86941>
- Gomei, M., Abdulla, A., Schröder, C., Yadav, S., Sánchez, A., Rodríguez, D., & Abdul Malak, D. (2019). *Towards 2020 How Mediterranean countries are performing to protect their sea*. (Report no WWF-2019). World Wide Fund for Nature. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15323.52005>
- İnandık, H. (1971). *Deniz ve kıyı coğrafyası*. İstanbul Üniversitesi Yayınları 1219. <http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/KITAP/206548.pdf>
- Kaboğlu, G., Güçlüsoy, H., & Bizsel, K. C. (2005, March 23-25). *Marine protected areas in Turkey: History, current state and future prospects* [Oral Presentation]. INOC International Workshop on Marine and Coastal Protected Areas. <https://www.researchgate.net/publication/262994308>
- Kelleher, G. (1999). *Guidelines for marine protected areas*. World Commission on Protected Areas (WCPA). <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/pag-003.pdf>
- Kenchington, R., & Kelleher, G. (1992). Crown-of-thorns starfish management conundrums. *Coral Reefs* 11, 53-56. <https://doi.org/10.1007/BF00357422>
- Keskin, Ç. (2010). Distribution of demersal fish species in the Black Sea, Sea of Marmara and North Aegean Sea. *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 39, 560. [https://ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/39/Pg\\_0560.pdf](https://ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/39/Pg_0560.pdf)
- Keskin, Ç. (2012). A preliminary study on demersal fishes in the south-western Black Sea shelf (NW Turkey). *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 18(3), 341-349.
- Kurt-Şahin, G., Sezgin, M., Ünlüer, F., Öztürk, B., Cavdar, E., & Dağlı, E. (2017). Macrozoobenthic community structure of İğneada region in Turkey (the southwestern Black Sea). *Oceanological*

- and *Hydrobiological Studies*, 46(3), 340-349. <https://doi.org/10.1515/ohs-2017-0035>
- López Ornat, A. (2006). Guidelines for the establishment and management of mediterranean marine and coastal protected areas. MedMPA project. Ed:UNEP-MAP RAC\SPA.Tunis.
- Mascia, M. B., Claus, C. A., & Naidoo, R. (2010). Impacts of marine protected areas on fishing communities. *Conservation Biology*, 24(5), 1424-1429. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01523.x>
- MBS. (2023). TC Cumhurbaşkanlığı Mevzuat Bilgi Sistemi. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=23605&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2022).
- Nankinov, D. N. (2001). Migration, seasonal and spatial distribution of Manx Shearwater, *Puffinus puffinus* vn the Black Sea basin. *Proceedings of Institute of Oceanology*, 3, 170-179.
- Öztürk, B. (1994, June 27-30). *Past, present and future of the mediterranean monk seal monachus monachus (Herman, 1779) in the black sea*. The Proceedings of the First International Symposium on the Marine Mammals of the Black Sea. İstanbul, Türkiye.
- Öztürk, B., Topaloğlu, B., Kıdeys, A., Levent, B. A. T., Keskin, Ç., Sezgin, M., ... & Yalçiner, A. C. (2013). A proposal for new marine protected areas along the Turkish Black Sea coast. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 19(3), 365-379.
- Peyzax. (2023). Ramsar Sözleşmesi ve Türkiye’de bulunan 14 Ramsar alanları. <https://peyzax.com/ramsar-sozlesmesi-ve-turkiyede-bulunan-ramsar-alanlari/> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023).
- Pickaver, A., (2002). *Coastal and marine corridors. colloquia on marine and coastal ecological corridors*. Council of Europe Publishing.
- Tarım ve Orman Bakanlığı. (2023). Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Korunan Alanlar İstatistikleri. <https://www.tarimorman.gov.tr/DKMP/Menu/18/Korunan-Alan-Istatistikleri> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023)
- Tüдав. (2023). Açık deniz koruma alanları için bazı öneriler <https://tudav.org/wp-content/uploads/2018/04/ADKA.pdf> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023).
- Tüдав. (2023). Türk Deniz Araştırmaları Vakfı. <https://tudav.org/calismalar/deniz-alanlari/marmara-denizi/marmara-denizi-icin-koruma-alani-onerileri/> (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023).
- Turan, C., Ergüden, D., Gürlek, M., Sönmez, B., Dođdu, S. A., Uygur, N., Sakallı, U., Uyan, A., & Karan, S. (2014, Kasım 14-16). *Kuzey Doğu Akdeniz kıyılarında deniz koruma alanı için bir öneri*. 17. Sualtı Bilim ve Teknoloji Toplantısı, İstanbul, Türkiye.
- UDAP. (2023). Ulusal Deniz Araştırma Programı 2018-2027. [https://www.shodb.gov.tr/shodb\\_esas/orj/kurul/UDAP/2018%20UDAP%20taslak.pdf](https://www.shodb.gov.tr/shodb_esas/orj/kurul/UDAP/2018%20UDAP%20taslak.pdf) (Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023).
- UNEP. (2005). *Marine litter, an analytical overview*. United nations environment programme. UNEP.
- Ustaođlu Tırıl, S., Zengin, M., Akbulut, B., Memiş, D., Alagil, F., & Dađtekin, M. (2011). A participatory approach to tagging and monitoring as an initial step in developing a sturgeon conservation strategy along the Turkish Black Sea coast. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 411–414. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01646.x>
- Wilson, A. M., & Moser, M.E. (1994). Conservation of Black Sea wetlands: a review and preliminary action plan. *IWRB Publication*, 33:77 pp.
- WWF. (2023). Türkiye’deki Ramsar Alanları Değerlendirme Raporu. WWF-Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) [https://wwftr.awsassets.panda.org/downloads/wwf\\_turkiye\\_ramsar\\_alanlari\\_degerlendirme\\_raporu.pdf](https://wwftr.awsassets.panda.org/downloads/wwf_turkiye_ramsar_alanlari_degerlendirme_raporu.pdf)(Erişim tarihi: 26 Ağustos 2023).



# Acta Aquatica Turcica

(e-ISSN: 2651-5474)

## Copyright Release For

Manuscript Submit Date: ...../...../.....

Manuscript Title : .....

The author(s) warrant(s) that;

- The manuscript is original and is not being forwarded for publish and assessment to publication elsewhere after sending *Acta Aquatica Turcica* (Acta Aqua.Tr.)
- The publishing, printing and distribution of the article is belong to the legal entity under name *Acta Aquatica Turcica* (Acta Aqua.Tr.).
- The written and visual materials such as the text, tables, figures and graphics etc. of the manuscript don't contain any copyright infringement, and the all legal permissions for them have been taken by the author(s).
- The all scientific, ethic and legal responsibility of the article is belong to author(s).

Notwithstanding the above, the Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights other than copyright, such as

- ✓ The patent rights,
- ✓ The using rights of the all authors will be published in book or other work without paying fees,
- ✓ The rights to reproduce the article for their own purposes provided are not sell under the seal of secrecy of distribution rights, and in accordance with the following conditions has been accepted by us.

Full Name, Address of Corresponding

Author:.....

.....  
.....  
.....

E-Mail : .....

Signature

.....

Full Name	Address	Signature

**Acta Aquatica Turcica**

Phone : +90 246 2146401 Fax: +90 246 2146445

<http://dergipark.org.tr/actaquatr>

[actaquatr@isparta.edu.tr](mailto:actaquatr@isparta.edu.tr)

# Author Guidelines

## PAGE SIZE

Page should be A4 (21 cm x 29.7 cm) size.

## MARGINS

Top: 2.5 cm      Right: 2.5 cm      Left: 2.5 cm      Bottom: 2.5 cm      Gutter: 0 cm

## TEXT FORMATING

Font : Times New Roman  
Font size : 12-point  
Alignment : Justified  
Indent : 1.25 cm  
Line spacing : 2  
Line numbers : Continuously throughout the manuscript  
Page numbers : Automatic numbered in the bottom center of the pages

## TITLE PAGE

The title page should be uploaded to the system separately from the manuscript file. The title page should contain only the following information.

### - *Title*

Title should be brief and informative reflecting the study. Abbreviations and formulae usage is not recommended.

### - *Running title*

A short (running) title with a maximum of 75 characters should be given to reflect the title.

### - *Authors names*

Name and surnames of the authors should be indicated clearly. Accuracy of the names spelling should be checked before submission.

### - *Institution*

Format used: University/Institution, Faculty, Department, Province-COUNTRY

Example: Isparta University of Applied Sciences, Eğirdir Fisheries Faculty, Department of Aquaculture, Isparta-TURKEY

### - *Corresponding author*

Please indicate the corresponding author who will be responsible for all the stages of publication, review, and post-publication. Contact information and mailing address of corresponding author should be given in the title page.

\*Corresponding Author: Name Surname, e-mail: ...

### - *ORCID's of the authors*

ORCID's of the authors should be identified. Please visit <https://orcid.org> to register an ORCID.

## MANUSCRIPT FORMAT

Manuscripts in original articles, short communication, case report and reviews should be prepared in accordance with the format below\*.



## **FIGURES**

The figure title should be short and concise, centered at the bottom of the figure. Figures should have a minimum resolution of 300 DPI. Figures should be cited in the text as Figure 1, Figure 2, etc. The figures should be given in the nearest place where it cited.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

In this section, those who help to the conduct the study apart from financial support, are indicated.

Example: The authors thank Ahmet Taş (Isparta University of Applied Sciences, Turkey) for his helps during the laboratory part of the study.

## **FUNDING**

In this section, institutions that provide financial support to the conduct of the study are indicated using the grant number.

Example-1: This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Isparta University of Applied Sciences grant 3241-E2-14.

Example-2: No financial support was received for the present study.

## **CONFLICT OF INTEREST**

Conflicts of interest of the author(s), if any, are indicated in this section.

Example: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

The contributions of each author to the relevant stages of the study are indicated by using each work package and the first letters of the name and surname.

Example:

Fiction: IT; Literature: KL, TN; Methodology: CT, FU; Performing the experiment: FM, CT, FU; Data analysis: FU, TA; Manuscript writing: CT, FU, Supervision: CT. All authors approved the final draft.

## **ETHICAL APPROVAL STATEMENTS**

The ethics committee approvals obtained for the study are indicated with information of institute, date, and number. Manuscripts that are not declare, although they require the Local Ethics Committee Approval in studies conducted with vertebrates, and the Approval for Ethics Committee Approval of Non-Interventional Investigates in survey/interview studies will not be considered for scientific evaluation.

Example-1: Local Ethics Committee Approval was not obtained because experimental animals were not used in this study.

Example-2: This study was conducted with the approval of Animal Experiments Local Ethics Committee of Isparta University of Applied Sciences (Date: 01.07.2010, No: 21438139-147).

## **DATA AVAILABILITY STATEMENT**

In this section, data availability statement should be declared by the authors regarding the anonymous availability of the data used in the manuscript. Acta Aquatica Turcica encourages authors to share research data used.

Example-1: The data that support the findings of this study are openly available in Figshare at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11815566.v1>

Example-2: The data used in the present study are available upon request from the corresponding author. Data is not available to the public due to privacy or ethical restrictions.

Example-3: Data supporting the findings of the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Example-4: Data sharing is not applicable for the present study as no new data was created or analyzed.

Example-5: Research data is not shared.

Example-6: Data supporting the findings of the present study are available in the supplementary material to this article.

## CITATIONS

Citations are written in the following formats, in the order of the year, separated by a semicolon (;).

- Single author

(Author, Year)

-- It is thought to be ... (Küçük, 2008; Güçlü, 2018a; Güçlü, 2018b).

-- According to Küçük (2008), ...

- Two authors

(Author-1 and Author-2, Year)

-- They are among the important parameters (Küçük and Güçlü; 2001; Ekici and Koca, 2021a; Ekici and Koca, 2021b).

-- According to Ekici and Koca (2021b),...

- Three or more authors

(Author-1 et al., Year)

-- It can be repeated periodically (Yiğit et al., 2006a; Yiğit et al., 2006b; Boyacı et al., 2020).

-- According to Boyacı et al. (2020),...

## REFERENCES LIST

References should be indented 1.25 cm from the second line and should be prepared according to APA version 7. Ideally, the names of all authors should be provided. Usage of "et al" in long author lists (more than 10) will also be accepted. Except for special uses, only the first letter of the title of all references should be capitalized, and all words in the names of the sources (journal, publishing house and congress) should be written with a capital letter.

### *1-Journal articles*

The name of the journal (italic) without shortening, volume (italic), issue, page numbers and DOI number having an active link should be specified.

Petrauskienė, L., Utevska, O., & Utevsky, S. (2009). Can different species of medicinal leeches (*Hirudo* spp.) interbreed? *Invertebrate Biology*, 128(4), 324-331. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2009.00180.x>

Wagenaar, D. A., Hamilton, M. S., Huang, T., Kristan, W. B., & French, K. A. (2010). A hormone-activated central pattern generator for courtship. *Current Biology*, 20(6), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.027>

### *2-Book*

The title of book should be written in italic, and it should be followed with Publisher information.

Nesemann, H., & Neubert, E. (1999). *Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea*. Spektrum Akademischer Verlag.

Sawyer, R. T. (1986). *Leech biology and behavior*. Oxford University Press.

### *3-Book section*

The title of the chapter should be normal, the title of the book should be in italic, the editor(s), the page numbers of the section, the publisher and the DOI number (if available) having active link should be included.

Le Couteur, D., Kendig, H., Naganathan, V., & McLachlan, A. (2010). The ethics of prescribing medications to older people. In S. Koch, F. M. Gloth, & R. Nay (Eds.), *Medication management in older adults* (pp. 29-42). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-457-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-457-9_3)



McCormack, B., McCance, T., & Maben, J. (2013). Outcome evaluation in the development of person-centred practice. In B. McCormack, K. Manley, & A. Titchen (Eds.), *Practice development in nursing and healthcare* (pp. 190-211). John Wiley & Sons.

#### ***4-Web pages / Online documents***

The title of the page should be in italic, the name of the website and the active link to the page should be specified.

International Union for Conservation of Nature. (2010). *Chondrostoma nasus*. <https://www.iucnredlist.org/species/4789/97800985>

Wikipedia. (2021). Toxicology. <https://en.wikipedia.org/wiki/Toxicology>

#### ***5-Dissertations/Thesis***

The title of the dissertation/thesis should be in italic, its type (Doctoral, Master's, Specialization in Medicine) and the name of the university should be specified.

Filik, N. (2020). Inhibition effect of phenolic compounds on the environmental sensing system of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from cultured fish and determination of the clonal relationship between strains by pulsed field gel electrophoresis method. [Doctoral dissertation, Isparta University of Applied Sciences].

Ozdal, A. M. (2019). Effects on growth and coloration of red pepper supplementation as pigment sources to diets of jewel cichlid (*Hemichromis guttatus*). [Master's thesis, Isparta University of Applied Sciences].

#### ***6-Conference, symposium presentations***

Event date, presentation title (italic), presentation type (Oral presentation, Poster presentation), event name, city and country should be given.

Ceylan, M., Çetinkaya, O. (2017, October 4 - 6). Assessment of population structure and size of medicinal leech *Hirudo verbana*, inhabiting some model wetlands of Turkey [Oral Presentation]. International Symposium on Limnology and Freshwater Fisheries, Isparta, Turkey.

Snoswell, C. (2016, October 31 - November 3). Models of care for store-and-forward tele dermatology in Australia [Poster presentation]. 7th International Conference on Successes and Failures in Telehealth, Auckland, New Zealand.

**NOTE:** Manuscripts that are not prepared in accordance with the journal writing rules will not be considered for scientific evaluation.

# Yazım Kuralları

## SAYFA BOYUTU

Sayfa A4 (21 cm x 29,7 cm) formatında olmalıdır.

## KENAR BOŞLUKLARI

Üst: 2,5 cm Sol: 2,5 cm Alt: 2,5 cm Sağ: 2,5 cm Cilt payı: 0 cm

## YAZI STİLİ

Yazı karakteri : Times New Roman

Yazı karakteri büyüklüğü : 12 punto

Paragraf : İki yana yaslı

Paragraf girintisi : 1,25 cm

Satır aralığı : 2

Satır numarası : Metnin tümünde satır numarası atanmalıdır

Sayfa numarası : Sayfaların altına gelecek şekilde otomatik numaralanmış

## BAŞLIK SAYFASI

Başlık sayfası, makale dosyasından ayrı olarak sisteme yüklenmelidir. Başlık sayfasında sadece aşağıdaki bilgiler yer almalıdır.

### - *Başlık*

Başlık kısa, bilgilendirici ve çalışmayı net olarak yansıtmalıdır. Kısaltma ve formül kullanımı önerilmez.

### - *Kısa başlık*

Başlığı yansıtmak üzere maksimum 75 karakterde kısa bir başlık verilmelidir.

### - *Yazarlar*

Yazarların ad ve soyadları kısaltılmadan açık olarak yazılmalıdır. Makale yüklenmeden önce yazar isimlerinin doğruluğu kontrol edilmelidir.

### - *Kurum bilgisi*

Kullanılan düzen: Üniversite/Enstitü, Fakülte, Bölüm, İl-ÜLKE

Örnek: Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta-TÜRKİYE

### - *Sorumlu yazar*

Makalenin tüm aşamalarından sorumlu olacak sorumlu yazar belirtilmelidir. Başlık sayfasında sorumlu yazarın iletişim bilgileri ve posta adresi verilmelidir.

\*Sorumlu Yazar: Adı Soyadı, e-posta: ...

### - *ORCID bilgileri*

Tüm yazarların ORCID bilgileri belirtilmelidir. Lütfen ORCID tanımlaması yapmak için <https://orcid.org> adresini ziyaret ediniz.

## MAKALE FORMATI

Araştırma makalesi, kısa makale, olgu sunumu ve derlemeler aşağıdaki formata uygun olarak hazırlanmalıdır.

Araştırma Makalesi	Kısa Makale	Olgu Sunumu	Derleme
--------------------	-------------	-------------	---------

Başlık  
Kısa başlık  
Yazarlar  
Kurum bilgileri  
Sorumlu yazar e-posta adresi  
ORCID bilgileri

Başlık  
Özet  
Anahtar kelimeler

Title  
Abstract  
Keywords

1. Giriş

2. Materyal ve Metot 3. Bulgular 4. Tartışma 5. Sonuç	2. SERBEST İÇEREİK	2. Olgu Sunumu 3. Tartışma 4. Sonuç	2. SERBEST İÇEREİK
--	--------------------	---	--------------------

Teşekkür  
Finans  
Çıkar Çatışması Beyanı  
Yazar Katkıları  
Etik Onay Beyanı  
Veri Kullanılabilirlik Beyanı  
Kaynaklar

## ÖZET

Özet, çalışmanın amacını, kullanılan metotları, öne çıkan bulguları ve literatüre katkısını öz bir şekilde içermelidir. Hem Türkçe hem de İngilizce dillerinde maksimum 300 kelime olacak şekilde yazılmalıdır.

Not: Türk olmayan yazalar için Türkçe Özet desteği sağlanmaktadır.

## ANAHTAR KELİMELER

Anahtar kelimeler başlıkta yer almayan, çalışmayı yansıtacak kelimelerden seçilmelidir. En az 3 (üç), en çok 5 (beş) kelime belirtilmeli; kelimeler aralarında virgül (,) son kelimedenden sonra ise nokta (.) gelmelidir.

Anahtar kelimeler: CITES, akuaponik, üretim protokolü, mortalite, immünoloji.

## ONDALIK GÖSTERİM

Türkçe makalelerde “,” (virgül) İngilizce makalelerde ise “.” (nokta) olmalıdır.

Türkçe: %10,25

İngilizce: 10.25%

## LATİNCE GÖSTERİM

Tür ismi, metinde ilk geçtiği yerde kısaltılmadan (*Cyprinus carpio*), sonrasında ise cinsi ismi kısaltılarak (*C. carpio*) verilmelidir.

## TABLolar

Tablo başlığı, tablonun üstüne gelecek şekilde kısa ve öz olmalıdır. Tabloda yer alan kısaltmalar tablonun altında açıklanmalıdır. Tablo özel bir tasarım uygulanmamış, düz kılavuz şeklinde olmalıdır. İhtiyaç bulunması halinde tablo içi metinde yazı karakteri büyüklüğü 10 puntoya kadar düşürülebilir. Tablolara metin içinde Tablo 1, Tablo 2, ... şeklinde atıf yapılmalıdır. Tablolar, alıntılanıkları yere en yakın yerde verilmelidir.

Tablolar düzenlenebilir olmalıdır. Ekran görüntüsü veya resim formatındaki tablolar kabul edilmemektedir.

## **ŞEKİLLER**

Şekil başlığı, şeklin altına ortalanmış olarak kısa ve öz olmalıdır. Şekiller minimum 300 DPI çözünürlükte olmalıdır. Şekillere metin içinde Şekil 1, Şekil 2, ... şeklinde atıf yapılmalıdır. Şekiller, alıntılандıkları yere en yakın yerde verilmelidir.

## **TEŞEKKÜR**

Bu bölümde finansal destek dışında çalışmanın yürütülmesine katkı sunanlar belirtilir.

Örnek: Yazarlar çalışmanın laboratuvar bölümünde yardım eden Ahmet Taş'a (Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Türkiye) teşekkür etmektedir.

## **FİNANS**

Bu bölümde çalışmanın yürütülmesine finansal destek sağlayan kurumlar destek numarası kullanılarak belirtilir.

Örnek-1: Bu çalışma 3241-E2-14 proje numarası ile Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Örnek-2: Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finans desteği alınmamıştır.

## **ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI**

Bu bölümde yazarların varsa çıkar çatışmaları belirtilir.

Örnek: Yazarlar, bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan eder.

## **YAZAR KATKILARI**

Bu bölümde isim ve soy ismin ilk harfleri kullanılarak yazarların çalışmanın ilgili aşamalarına yaptıkları katkılar belirtilir.

Örnek:

Kurgu: BT; Metodoloji: CT, FU; Deneyin gerçekleştirilmesi: FM, CT, FU; Veri analizi: FU, TA; Makale yazımı: CT, FU, Denetleme: CT. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

## **ETİK ONAY BEYANI**

Bu bölümde çalışmanın yürütülmesinde alınan etik kurul onayının alındığı kurum, tarih ve numarası belirtilir. Omurgalı hayvanlarla yürütülen çalışmalarda Yerel Etik Kurul Onayı, anket/mülakat çalışmalarında ise Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Onayı gerektirdiği halde beyan edilmeyen makaleler bilimsel değerlendirmeye alınmamaktadır.

Örnek-1: Bu çalışmada deney hayvanları kullanılmaması nedeniyle Yerel Etik Kurul Onayı alınmamıştır.

Örnek-2: Bu çalışma Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile yürütülmüştür (Tarih: 01.07.2010, No: 21438139-147).

## **VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI**

Bu bölümde makalede kullanılan verilerin anonim kullanılabilirliğine ilişkin beyanda bulunulmalıdır. Acta Aquatica Turcica dergisi, yazarları araştırma verilerini paylaşmaya teşvik etmektedir.

Örnek-1: Bu çalışmada kullanılan veriler Figshare platformunda <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11815566.v1> DOI adresi ile erişime açıktır.

Örnek-2: Bu çalışmada kullanılan verilere ilgili yazardan talep üzerine erişilebilir. Veriler, gizlilik veya etik kısıtlamalar nedeniyle kamuya açık değildir.

Örnek-3: Bu çalışmada kullanılan veriler makul talep üzerine ilgili yazardan temin edilebilir.

Örnek-4: Bu çalışmada yeni veri oluşturulmadığı veya analiz edilmediği için veri paylaşımı bu makale için geçerli değildir.

Örnek-5: Araştırma verileri paylaşılmaz.

Örnek-6: Bu çalışmada kullanılan veriler bu makalenin ekinde mevcuttur.

## ATIFLAR

Atıflar yıl sırasına göre ve aralarında noktalı virgül (;) olacak şekilde aşağıdaki formatlarda yazılır:

- Tek yazar:

(Yazar, yıl)

-- ... olduğu düşünülmektedir (Küçük, 2008; Güçlü, 2018a; Güçlü, 2018b).

-- Küçük (2008)'e göre ...

- İki yazar:

(Yazar-1 ve Yazar-2, yıl)

-- ... önemli parametreler arasında yer almaktadır (Küçük ve Güçlü; 2001; Ekici ve Koca, 2021a; Ekici ve Koca, 2021b).

-- Ekici ve Koca (2021b)'a göre ...

- Üç ve daha çok yazar:

(Yazar vd., yıl)

-- ... dönemselsel olarak tekrarlayabilmektedir (Yiğit vd., 2006a; Yiğit vd., 2006b; Boyacı vd., 2020)

-- Boyacı vd. (2020)'e göre ...

## KAYNAKLAR

Kaynaklar APA 7. versiyona göre yazılmalıdır. Tüm yazarların isimleri verilmelidir, ancak 10. yazardan sonra "vd." kısaltması da kabul edilmektedir. Özel kullanımlar hariç olmak üzere tüm eser türlerinde eser isminin sadece ilk harfi büyük, eserin yayınlandığı veya sunulduğu dergi, yayınevi, kongre isimlerinde geçen tüm kelimeler büyük harfle başlanarak yazılmalıdır.

### *1-Makale*

Dergi ismi kısaltılmadan (italik), cilt (italik), sayı, sayfa numaraları ve aktif link içerecek şekilde DOI numarasına yer verilmelidir:

Petrauskienė, L., Utevskas, O., & Utevsky, S. (2009). Can different species of medicinal leeches (*Hirudo spp.*) interbreed? *Invertebrate Biology*, 128(4), 324-331. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2009.00180.x>

Wagenaar, D. A., Hamilton, M. S., Huang, T., Kristan, W. B., & French, K. A. (2010). A hormone-activated central pattern generator for courtship. *Current Biology*, 20(6), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.027>

### *2-Kitap*

Kitap başlığı italik olacak şekilde ve yayın kuruluş ismi olacak şekilde verilmelidir.

Nesemann, H., & Neubert, E. (1999). *Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea*. Spektrum Akademischer Verlag.



Sawyer, R. T. (1986). Leech biology and behavior. Oxford University Press.

### **3-Kıtap bölümü**

Bölüm başlığı normal, kitap başlığı italik olacak şekilde, editör(ler), bölümün sayfa numaraları, yayıncı kuruluş ve varsa aktif link içerek şekilde DOI numarasına yer verilmelidir:

Le Couteur, D., Kendig, H., Naganathan, V., & McLachlan, A. (2010). The ethics of prescribing medications to older people. In S. Koch, F. M. Gloth, & R. Nay (Eds.), Medication management in older adults (pp. 29-42). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-457-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-457-9_3)

McCormack, B., McCance, T., & Maben, J. (2013). Outcome evaluation in the development of person-centred practice. In B. McCormack, K. Manley, & A. Titchen (Eds.), Practice development in nursing and healthcare (pp. 190-211). John Wiley & Sons.

### **4-Web sitesi**

Sayfa başlığı italik, websitesinin ismi ve sayfanın aktif linki olacak şekilde verilmelidir.

International Union for Conservation of Nature. (2010). Chondrostoma nasus. <https://www.iucnredlist.org/species/4789/97800985>

Wikipedia. (2021). Toxicology. <https://en.wikipedia.org/wiki/Toxicology>

### **5- Tezler**

Tez başlığı italik olacak şekilde, tez türü (Doktora, Yüksek lisans, Tıpta Uzmanlık) ve üniversite ismi belirtilmelidir.

Filik, N. (2020). Kültür balıklarından izole edilen Aeromonas hydrophila suşlarında fenolik bileşenlerin çevreyi algılama sistemi üzerine inhibisyon etkisi ve suşlar arasındaki klonal ilişkinin pulsed field jel elektroforez yöntemiyle belirlenmesi [Doktora tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi].

Özdal, A. M. (2019). Effects on growth and coloration of red pepper supplementation as pigment sources to diets of jewel cichlid (Hemichromis guttatus) [Yüksek lisans tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi].

### **6- Konferans, sempozyum sunumları**

Etkinlik tarihi, sunu başlığı (italik), sunum türü (Sözlü sunum, Poster sunum), etkinlik adı, şehir ve ülke verilmelidir.

Ceylan, M., Çetinkaya, O. (2017, Ekim 4 - 6). Assessment of population structure and size of medicinal leech Hirudo verbana, inhabiting some model wetlands of Turkey [Sözlü sunum]. International Symposium on Limnology and Freshwater Fisheries, Isparta, Türkiye.

Snoswell, C. (2016, Ekim 31 - Kasım 3). Models of care for store-and-forward teledermatology in Australia [Poster sunum]. 7th International Conference on Successes and Failures in Telehealth, Auckland, Yeni Zelanda.

**NOT:** Dergi yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan makaleler değerlendirmeye alınmayacaktır.