

Acta Aquatica Turcica

Türk Su Bilimleri Dergisi



2019

Vol : 15

Number : 3

| Cilt : 15

Sayı : 3

e-ISSN: 2651-5474

**ACTA AQUATICA TURCICA
TÜRK SU BİLİMLERİ DERGİSİ
(YIL 2019 – CİLT: 15 – SAYI 3)**

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
Seval BAHADIR KOCA
Seçil METİN

Mizanpaj Editörleri / Layout Editors

Salim Serkan GÜÇLÜ
Ufuk Gürkan YILDIRIM

İngilizce Editörü / English Editor

Arda ÖZEN

İletişim / Contact

Acta Aquatica Turcica
Yayın Komisyonu Başkanlığı,
32260 Doğu Yerleşkesi-İSPARTA
Tel: 0 246 2118661 Faks: 0 246 2118697
<http://dergipark.gov.tr/actaquatr>
E-Posta: actaquatr@isparta.edu.tr

E-ISSN: 2651-5474

Yayın Tarihi: Eylül - 2019

ACTA AQUATICA TURCICA
(YIL 2019 – CİLT: 15 – SAYI: 3)

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 Reseach, 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

* Liste akademik unvan ve isme göre alfabetik sırayla hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH PAPERS:

<i>Yersinia ruckeri</i> İzolatlarının Genotiplendirilmesinde PCR Tabanlı DNA Fingerprinting Tekniklerinin Karşılaştırmalı Analizi Seda KÖSTERELİ, Ertan Emek ONUK.....	262-271
Farklı Çözgenlerle Elde Edilmiş <i>Ulva lactuca</i> Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitesi Fatma ÖZTÜRK, Sevim HAMZAÇEBİ.....	272-279
Nemrut Krater Gölü'nden (Bitlis/Türkiye) İzole Edilen <i>Chlorella</i> sp. Mikroalginde H ₂ O ₂ Uygulaması ile Triaçilgliserol Üretiminin Artırılması Emine SELÇUK, Turgay ÇAKMAK.....	280-288
Acute Toxicity of Cadmium on <i>Ophelia bicornis</i> Savigny, 1822 Levent BAT, Fatih ŞAHİN, Aysah ÖZTEKİN.....	289-297
Antalya, Rize ve Yalova Kıyı Sularından Örneklenen Karides Türlerinin (<i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816), <i>Palaemon adspersus</i> (Rathke, 1837), <i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)) Metal İçeriklerinin Değerlendirilmesi Tuba YAĞCI.....	298-306
Effects of the Feeds Containing Different Amounts of Hazelnut Meal, Soybean Meal, Fish Meal and Phytase on the Growth of Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Juveniles Orhan DEMİR, Adil YILAYAZ.....	307-317
Contribution to the Knowledge of Freshwater Halacarid Mites (Acari: Halacaridae) from Turkey Furkan DURUCAN, Yunus Ömer BOYACI.....	318-324
Propargite (Akarisit)'nin Sublethal Dozlarının <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758'da Biyokimyasal Kan Parametrelerine Etkisi Arınç TULGAR, Ekrem Şanver ÇELİK.....	325-339
The Effects of Dietary Administration with High Level Red Pepper (<i>Capsicum annum</i>) on Growth Performance, Coloration, Histology and Protection Against <i>Aeromonas sobria</i> in Yellow Tail Cichlid, <i>Pseudotropheus acei</i> Nalan Özgür YİĞİT, Seval BAHADIR KOCA, Özlem ÖZMEN, Behire Işıl DİDİNEN, Seçil METİN.....	340-346
Edremit Körfezi'nde Dağılım Gösteren Beş Kırlangıç Balığı (Triglidae) Türünün Besin Tercihleri Dilek İLHAN	347-353
Some Population Parameters of the <i>Sardinella maderensis</i> (Lowe, 1838) in the Sombreiro River of Niger Delta, Nigeria Olaniyi Alaba OLOPADE, Henry Eyina DIENYE, Nathanael Akinsafe BAMIDELE.....	354-364
Soğuk şartlarda (4±1°C) Depolanan Gümüşü Havuz Balığı (<i>Carassius gibelio</i>)'nda Meydana Gelen Kalite Değişimleri ve Aşamalı Çoklu Regresyon Yöntemine Göre Raf Ömrü Tahmin Modelinin Geliştirilmesi İsmail Yüksel GENÇ, Abdullah DİLER.....	365-377
Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumunun Farklı <i>In Vitro</i> Metodlarla Tespiti Fethi FİLİK, Ayşegül KUBİLAY.....	378-390

<i>Yersinia ruckeri</i> Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Yönetimindeki Virülens Faktörlerinin Araştırılması Nurdan FİLİK, Ayşegül KUBİLAY.....	391-403
Effects of Different Feeding Frequencies on Growth Performance and Feed Consumption in Juvenile Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> Linnaeus, 1758) Adem KURTOĞLU, Hüseyin SEVGİLİ, Masahiro OIAKAWA.....	404-410

Yersinia ruckeri İzolatlarının Genotiplendirilmesinde PCR Tabanlı DNA Fingerprinting Tekniklerinin Karşılaştırmalı Analizi

Seda KÖSTERELİ¹, Ertan Emek ONUK¹**

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: eeonuk@omu.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 27 Aralık 2018; Kabul 05 Şubat 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Köstereli, S., & Onuk, E. E. (2019). *Yersinia ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniklerinin karşılaştırmalı analizi. *Acta Aequatica Turcica*, 15(3), 262-271. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.503853>

Özet

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilmiş olan *Yersinia ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting metodlarını değerlendirmektir. Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilmiş 18 *Y. ruckeri* izolatı ERIC2 primerinin kullanıldığı enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR metodu, P5, P6 ve M13 primerlerinin kullanıldığı randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR metodu ve (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR metodu ile karakterize edildi. Test edilen tüm primerlerin doğru bir analiz için kullanılabilir amplifikasyon ürünü oluşturduğu belirlendi. Kluster ve ayırım gücü analizi sonuçlarına göre, *Y. ruckeri*'nin moleküler tiplendirmesi için en uygun primerin ERIC2 primeri olduğu, bunu P5, P6, M13 ve (GTG)5 primerinin takip ettiği belirlendi. ERIC-PCR DNA fingerprinting metodunun *Y. ruckeri*'nin epidemiyolojik sürveyansının belirlenmesinde güçlü bir genotipik araç olarak düşünülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, moleküler tiplendirme, RAPD-PCR, *Y. ruckeri*

Comparative Analysis of PCR-Based DNA Fingerprinting Techniques in the Genotyping of *Yersinia ruckeri* Isolates

Abstract

The aim of the present study was to evaluate different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing *Yersinia ruckeri* isolates from the different geographic region of Turkey. Eighteen *Y. ruckeri* isolates obtained from rainbow trout were characterized by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR with ERIC2 primer, randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR with P5, P6 and M13 primer and (GTG)5-PCR with (GTG)5 primer. It was determined that all the primers tested generated an appropriate pattern of amplified products suitable for accurate analysis. Based on the results of cluster analysis and discriminant function analysis, ERIC2 primer was found to be the most suitable primer for molecular typing of *Y. ruckeri*, followed by P5, P6, M13, and (GTG)5 primer. In conclusion, the ERIC-PCR DNA fingerprinting method can be considered as a powerful genotypic tool for epidemiological surveillance of *Y. ruckeri*.

Keywords: ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, molecular typing, RAPD-PCR, *Y. ruckeri*

GİRİŞ

Yersinia ruckeri salmonid cinsi balık yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan yersinyozis veya “enterik kırmızı ağız” (Enteric Red Mouth) olarak bilinen hastalığının etiyolojik ajanıdır (Tobback vd., 2007). Hastalık ilk defa 1950'li yıllarda Amerika'nın Idaho eyaletinin Hagerman vadisindeki gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiş ve 1966 yılında Ross vd. tarafından tam olarak tanımlanmıştır (Horne ve Barnes, 1999). Hastalık etkeni Ewing vd. (1978), tarafından ilk izolasyonu yapan Rucker'e ithafen *Y. ruckeri* olarak isimlendirilmiştir. Hastalık başlıca salmonid cinsi balıklarda görülmesine rağmen diğer balık türlerini de etkilemektedir (Horne ve Barnes, 1999). Günümüzde oldukça yaygın bir dağılıma sahip olan hastalık Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Afrika ve Avrupa'da görülmüştür (Tobback vd., 2007). Türkiye'de ise *Y. ruckeri* ilk defa İzmir'de gökkuşluğu alabalık yetiştiriciliği yapılan bir işletmeden 1990 yılında izole edilmiştir (Çağırman ve Yürekli Türk, 1991).

Bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla epidemik izolatlar, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta, salgınla ilişkili suşlar belirlenmekte; salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı hakkında bilgiler edinilebilmektedir (Durmaz, 2008). Teorik olarak fenotipik ve genotipik olarak iki ayrı tiplendirme sistemi bulunmaktadır. Fenotipik tiplendirmede kullanılan çeşitli besi yerlerindeki koloni morfolojisi, biyokimyasal testler, seroloji, toksin duyarlılığı, patojenite ve antibiyotik duyarlılığı gibi özellikler yakından ilişkili suşlar arasında ayırım yapmak için yeterince çeşitlilik sağlamamaktadırlar. Son zamanlarda, genetik yapısına göre bakteriyel suşların ayırt edilmesi olarak bilinen genotiplendirme, yüksek ayırım gücü nedeniyle bakteriyel suşların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir suşun belirli bir genotiplendirme yöntemiyle elde edilen genetik profili, parmak izi kadar benzersiz olabilmektedir. Bu nedenle, genotiplendirme aynı zamanda DNA parmak izi olarak adlandırılmaktadır (Li vd., 2009).

Mevcut bakteriyel tiplendirme metotları; DNA bant modeli, DNA dizi analizi ve DNA hibridizasyon temelli metotlar olmak üzere üç ana kategori altında sınıflandırılabilir. DNA bant modeline dayanan genotiplendirme metotların esasını genomik DNA'nın amplifikasyonu veya restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesiyle üretilen DNA bantlarının (fragmanları) boyutlarındaki farklılıklara göre incelenen suşların ayırt edilmesi oluşturur. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi restriksiyon enzimleri ile kesim esasına dayanan tiplendirme yöntemleridir. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), multiple-locus variable number tandem repeat analizi ise DNA'nın amplifikasyonuna dayalı tiplendirme yöntemleri içerisinde yer almaktadır (Li vd., 2009).

AP-PCR, bilinmeyen genomik bölgelerin rasgele primerler kullanılarak amplifiye edilmesine dayanan PCR'in klasik bir varyasyonudur (Li vd., 2009). RAPD yöntemi rastgele bir DNA segmentinin rastlantısal olarak seçilmiş bir nükleotid sekansı (primer) ile PCR ile amplifiye edilmesine dayanmaktadır (Fidanboylu, 2010). Bu nedenle AP-PCR aynı zamanda RAPD-PCR olarak da adlandırılmaktadır (Li vd., 2009). RAPD uygulamasında 9-10 baz uzunluğunda kısa rastgele sekansları kullanılmaktadır. Bu rastgele primerler bölgelerinin sayısı ve konumu bakteriyel bir türün farklı suşlarına göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılmasından sonra bakteriyel bir suş için karakteristiği olan bir bant modeli elde edilir (Olive ve Bean, 1999).

Bakteriyel genomlar içerisinde doğal olarak bulunan bir dizi tekrarlayan DNA sekansı bulunmaktadır. Bu sekanslar genom üzerinde çok sayıda kopya halinde dağılmış bir şekilde yerleşmiştir. Bu dağılık tekrarlayan DNA elementlerinin fonksiyonları hala bilinmemekle birlikte, bunların varlığı bakterilerin DNA parmak izlerinin ortaya konulması için kullanışlı parametrelerdir (Li vd., 2009). Bu metotlarda kullanılan primerler tekrarlanan DNA dizilimlerinin komplementeridir ve bu primerler kullanılarak, tekrarlar arasında kalan DNA parçalarının amplifikasyonu yapılmaktadır. Tekrarlayan elementlerinin sayı ve yerleşimindeki farklılıklar, bakteriyel türe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Tekrarlanan dizilimlerin dört grubu tanımlanmıştır. Bunlar: REP dizilimler, ERIC dizilimler, BOX dizilimler ve politrinükleotid (GTG)₅ dizilimlerdir. Bu tekrarlayan dizilimlere dayalı beş ayrı (REP-PCR, ERIC1 PCR, ERIC2 PCR, BOX-PCR ve (GTG)₅-PCR) rep-PCR uygulaması vardır ve bu yöntemler değişik bakteri gruplarının tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Durmaz, 2008). Bu tekrarlayan dizilimler içerisinde REP ve ERIC sekansları tiplendirmede en yaygın kullanılan dizilimlerdir. BOX elementlerinin REP ve ERIC dizilimleri ile sekans ilişkisi bulunmamaktadır (Olive ve Bean, 1999).

Bu çalışma ile PCR tabanlı farklı DNA fingerprinting metotlarının Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* izolatları arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesindeki etkinlikleri karşılaştırılmalı olarak ortaya konulmuştur.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakteriyel izolatlar ve kültür şartları

Çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 18 adet Gökkuşacağı alabalığı kökenli *Y. ruckeri* saha izolatu kullanıldı (Tablo 1). Çalışmadan önce gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklanan izolatlar Trypticase soy broth'a (Merck, Almanya) pasajlanarak 25 °C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Y.ruckeri* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

No	İzolatlar	İzolasyon Yeri		İzolasyon Yılı
1	Dersu BD	Antalya	Akdeniz	2017
2	Aşağı Gökdere BD	Isparta	Akdeniz	2015
3	15 SA	Isparta	Akdeniz	?
4	17 SA	Isparta	Akdeniz	1998
5	27 SA	Bolu	Karadeniz	1997
6	Y1 EO	Samsun	Karadeniz	2007
7	Y2 EO	Samsun	Karadeniz	2007
8	Y3 EO	Samsun	Karadeniz	2007
9	Y4 EO	Samsun	Karadeniz	2007
10	YK BD	İzmir	Ege	2015
11	18/1 SA	Denizli	Ege	1991
12	18/2 SA	Denizli	Ege	1995
13	28 SA	Manisa	Ege	1998
14	35 SA	Denizli	Ege	1996
15	35/1 SA	Denizli	Ege	1996
16	36 SA	Yalova	Marmara	1998
17	5 SA	Adapazarı	Marmara	1996
18	6 SA	Kırıkkale	İç Anadolu	1997

İzolatların DNA ekstraksiyonu

İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop (Thermo) ile 260 nm'de ölçüldü. İzolatlar ait DNA konsantrasyonları genotiplendirme çalışmalarında kullanılmak üzere 15 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında DNA'lar PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi

İzolatlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde 3 farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniği kullanıldı. Bu metotlarda kullanılan primerlerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle rastgele 7 izolat seçildi ve aşağıda bildirilen primerler ile reproducibile (üretken) bant verip vermedikleri belirlendi. Bu aşamada seçilen primer ve/veya primerler diğer izolatların genotiplendirilmesinde kullanıldı. Her bir genotiplendirme metodunda PCR karışımının oluşturulmasında içeriğinde 0,05 U/µl Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM her bir dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) bulunan 2×PCR master mix (Thermo) kullanıldı. Böylece herbir teknik için tüm değişkenler sabitlendi. Her bir fingerprinting tekniği için 60 ng template DNA, 8 pmol primer (2 µl), 12,5 µl 2×PCR master mix ve distile sudan oluşan toplam 25 µl PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Sonraki amplifikasyon aşamaları ise araştırmacılar tarafından bildirilen koşullar veya modifikasyonları kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünler etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Oluşan bant paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. Analizlerin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 7 izolat seçildi ve analizler arka arkaya 3 kez tekrarlandı. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık % 90 benzerlik katsayısına göre hesaplandı.

Y.ruckeri izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılan PCR tabanlı DNA fingerprinting teknikleri ve bu tekniklerde kullanılan primerler aşağıda verildi.

RAPD-PCR: Bu metotta random primer olarak M13 (GAG GGT GGC GGT TCT), P5 (AAC GCG CAA C) ve P6 (CCC GTC AGC A) primerleri kullanıldı (Grundmann vd., 1997; Mancuso vd., 2007).

M13 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'da oluşturulan PCR karışımı 94°C'de 5 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 50°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

P5 ve P6 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'da oluşturulan PCR karışımı 95°C'de 5 dk ön denatürasyon ve sonrasında 95°C'de 1 dk denatürasyon, 35°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

ERIC-PCR: Bu metoda ERIC-2 (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G) primeri kullanıldı (Versalovic vd., 1991). ERIC2 primerinin kullanıldığı ERIC-PCR'da oluşturulan PCR karışımı 95°C'de 7 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 52°C'de 1 dk primer bağlanma, 65°C'de 8 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 65°C'de 16 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

(GTG)5-PCR: Bu metoda (GTG)5 (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') primeri kullanıldı (Huang vd., 2013). (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR'da oluşturulan PCR karışımı 95°C'de 7 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 52°C'de 1 dk primer bağlanma, 65°C'de 8 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 65°C'de 16 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

BULGULAR

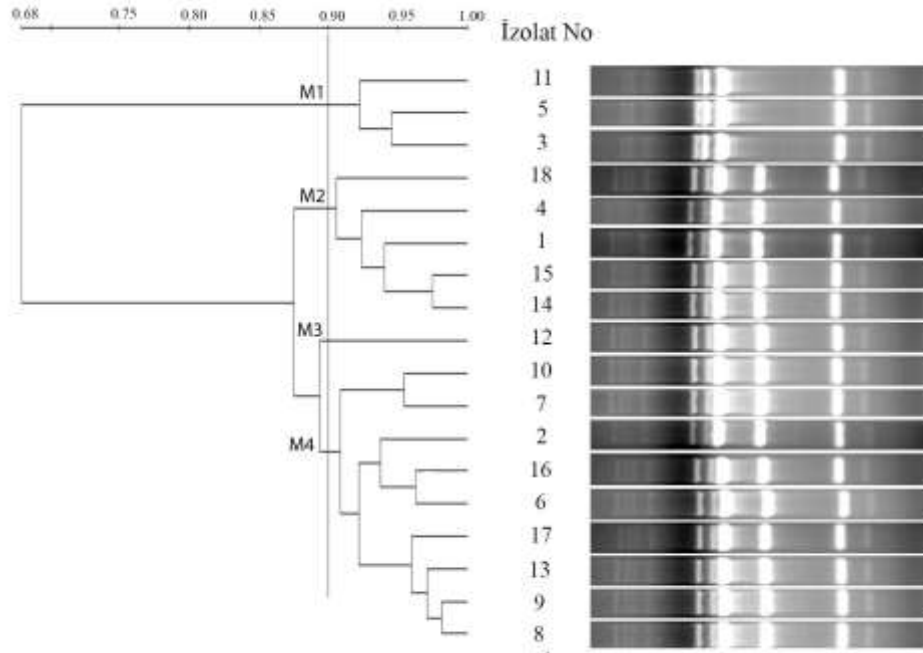
İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi

Y. ruckeri izolatları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting metodlarında kullanılan primerlerin rastgele seçilen 7 izolatının kullanıldığı ön denemede üretken bant paterni verdiği saptandı. Sonraki aşamada ise denemeler bütün izolatlar kullanılarak tekrar edildi. Testlerinin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.

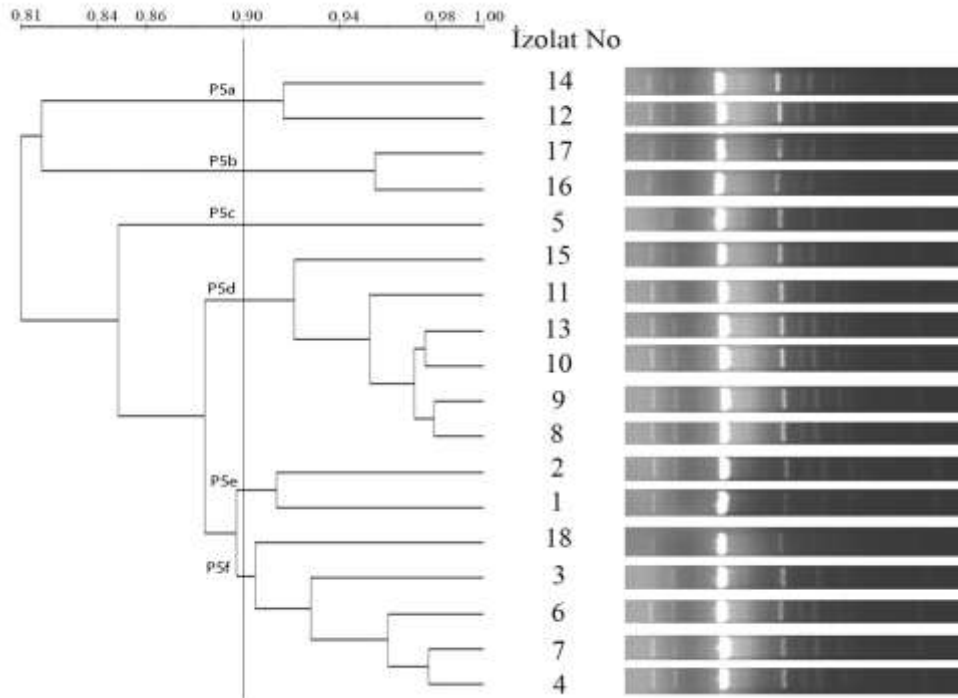
RAPD-PCR: *Y. ruckeri* izolatlarının M13 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 3 küme içerisinde olmak üzere toplam 4 farklı genotip (M1, M2, M3 ve M4) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. Bu genotiplerin sırasıyla 3, 5, 1 ve 9 izolat içerdiği, M4 no'lu genotipin baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 1). Testin ayırım gücü (Discriminatory Power) 0,6797 olarak hesaplandı.

Y. ruckeri izolatlarının P5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 5 küme içerisinde olmak üzere 6 genotip (P5a, P5b, P5c, P5d, P5e ve P5f) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. P5d no'lu genotipin içerdiği 6 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 2). Testin ayırım gücü 0,817 olarak hesaplandı.

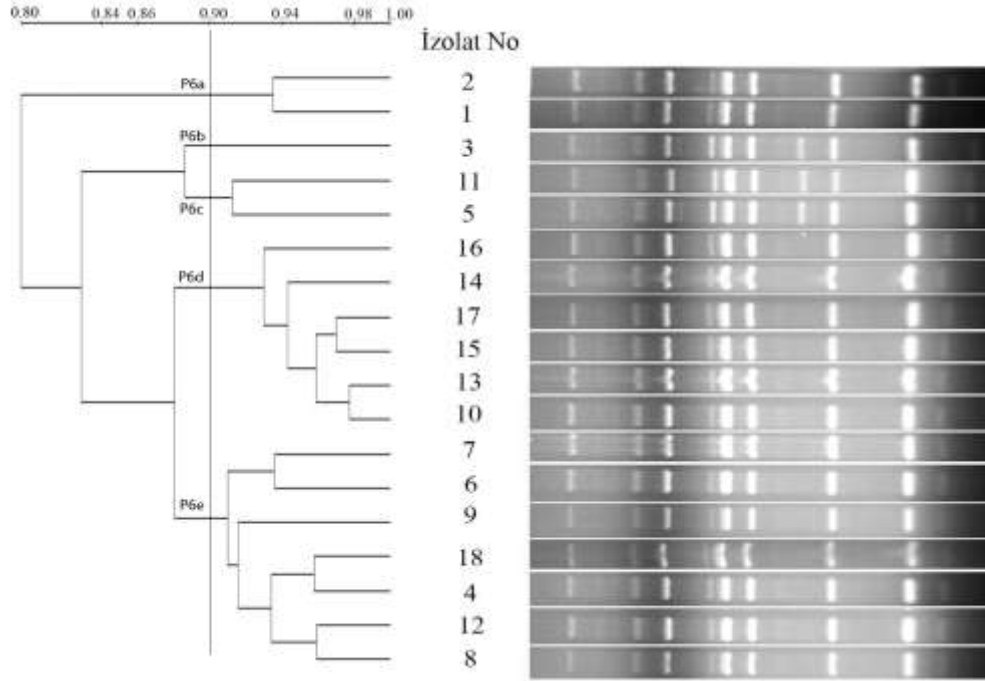
Y. ruckeri izolatlarının P6 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 5 genotip (P6a, P6b, P6c, P6d ve P6e) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. P6e no'lu genotipin içerdiği 7 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 3). Testin ayırım gücü 0,7516 olarak hesaplandı.



Şekil 1. *Y. ruckeri* izolatlarının M13 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

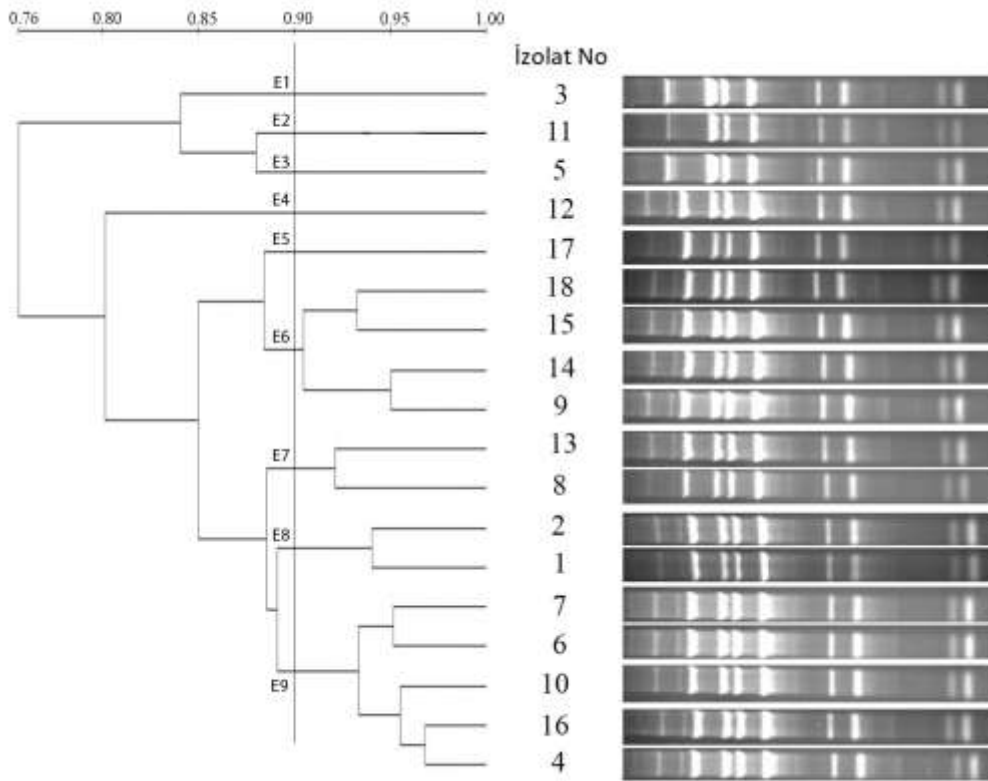


Şekil 2. *Y. ruckeri* izolatlarının P5 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.



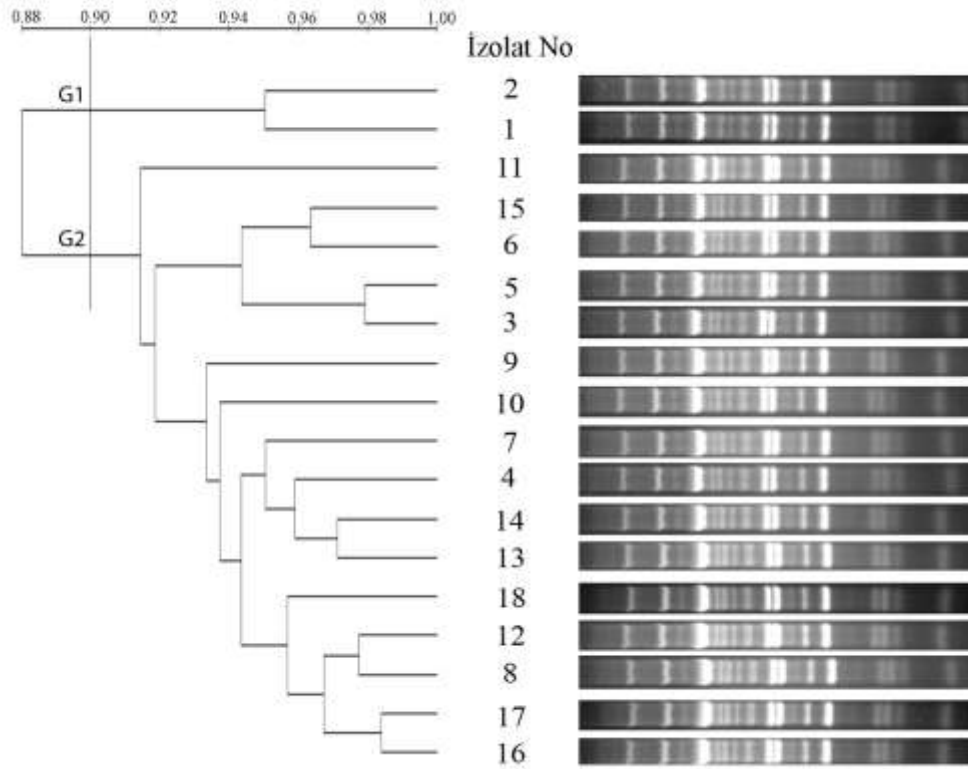
Şekil 3. *Y. ruckeri* izolatlarının P6 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

ERIC-PCR: *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre beş tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 9 genotip (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 ve E9) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. E9 no'lu genotipin içerdiği 5 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 4). Testin ayırım gücü 0,8824 olarak hesaplandı.



Şekil 4. *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile sergiledikleri ERIC-PCR bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

(GTG)5-PCR: *Y. ruckeri* izolatlarının (GTG)5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre 2 genotip (G1 ve G2) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. G2 no'lu genotipin içerdiği 16 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 5). Testin ayırım gücü 0,2092 olarak hesaplandı.



Şekil 5. *Y. ruckeri* izolatlarının (GTG)5 primeri ile sergiledikleri (GTG)5-PCR bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yersiniozis veya “Enteric Red Mouth Disease-Enterik Kırmızı Ağız Hastalığı” olarak bilinen hastalık, hem tatlı su hem de deniz salmonidlerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan önemli bakteriyel hastalıklardan biridir (Kumar vd., 2015). Hastalık ülkemiz de kültürü yaygın bir şekilde yapılan gökkuşluğu alabalıklarında yaygın olarak görülmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014).

Farklı coğrafik yerleşkelerden ya da balık türlerinden izole edilmiş olan bakteriyel patojenlerin karakterizasyonu için, tür içinde güvenilir markırlar bulmak amacıyla çok çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Önceleri izolatların biyokimyasal ve serolojik test sonuçlarını içeren fenotipik özelliklerine dayanılarak yapılan tiplendirme çalışmaları (Davies ve Frerichs, 1989; Romalde vd., 1993), ilerleyen yıllarda yerini moleküler yöntemlerin ön plana çıktığı çalışmalara bırakmıştır. Fenotipik metotlara oranla genotipik metotlar ile daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi bu metotların kullanımını arttıran başlıca faktör olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte bu metotların en önemli avantajları standardize edildikleri zaman stabil karakter göstermeleri, izolatların tüm farklı polimorfik özelliklerini ortaya koyabilmeleri yani güçlü ayırım yeteneğine sahip olmaları, benzer reagenler, aletler ve prosedürler kullanılarak bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi oldukça farklı mikroorganizma türleri için kullanılabilmesi, ucuz, hızlı, basit ve duyarlı yöntemler olmalarıdır (Köksal, 1999).

Günümüze kadar *Y. ruckeri* izolatlarının moleküler olarak tiplendirilmesinde RAPD-PCR, ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, REP-PCR, MLST ve PFGE (Bastardo vd., 2011a; Bastardo vd., 2012; Altun vd., 2013; Huang vd., 2013; Duman vd., 2017) gibi yöntemler kullanılmıştır. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda kullandıkları yöntemlerin *Y. ruckeri* izolatların tiplendirilmesindeki kullanılabilirliğini ve metotların ayırım güçlerini tekli veya kombine olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada DNA amplifikasyonuna dayanan tiplendirme metotlarından olan RAPD-PCR, ERIC-PCR ve (GTG)5-PCR’in izolatların tiplendirilmesinde kullanılabilirliği ve ayırım güçleri karşılaştırılmalı olarak ortaya konulmuştur.

Türkiye’de *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde araştırmacıların genellikle, ERIC-PCR metodunu ve ERIC2 primerini kullandıkları görülmektedir. Onuk vd. (2011), 97 *Y. ruckeri* izolatını ERIC2 primeri ile genotiplendirmişler ve % 75 benzerlik katsayısına göre izolatları 6 genotip içerisinde sınıflandırmışlardır. İzolatların % 59,8’inin baskın genotip içerisinde dağıldığını saptamışlardır. Araştırmacılar genel olarak Türkiye’nin farklı bölgelerden elde edilen izolatların bütün genotipler içerisine dağıldığını ortaya koymuş ve bu durumun balık transferinin yaygın olarak yapıldığının göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Altun vd. (2013), 15 *Y. ruckeri* saha izolatı ve 2 referans suşu inceledikleri çalışmalarında ERIC2 primeri ile % 70 benzerlik katsayısına göre izolatları 2 ayrı küme içerisinde gruplandırmış, kümelerden birincisinin 2 genotip, ikincisinin ise 3 genotip içerdiğini saptamışlardır. Predominant genotipin 5 izolat (% 29,4) içerdiği belirlenmiştir. Ek olarak izolatların coğrafik orjinlerine göre herhangi bir genogrup içerisinde gruplanmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da benzer şekilde genotipler arasında coğrafik orjinlere göre herhangi bir sınıflandırma yapılamamıştır. Duman vd. (2017), ise Türkiye kökenli 136 *Y. ruckeri* izolatı ERIC2 primeri ile % 72 benzerlik katsayısına göre 4 genogruba ayırmışlar ve izolatların izolasyon yıllarına göre farklı genogrulara dahil olduklarını ortaya koymuşlardır. Ege bölgesinden 2013 yılında izole edilen izolatların diğer izolatlara % 54 oranında benzerlik gösterdiğini, 124 adet izolatın % 90 oranında benzerlik gösterdiklerini, yine 2013 ve 2014 yılında elde edilen izolatların büyük oranda heterojen yapıda olduklarını, 2015 yılında elde edilen izolatların ise daha homojen bir yapıya sahip olduklarını ortaya koymuşlardır.

ERIC-PCR’den farklı olarak Türkiye’de RAPD-PCR metodunun kullanıldığı başka bir çalışma Özer vd. (2008), tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar Mersin İl’inden izole ettikleri 24 *Y. ruckeri* izolatını M13 primeri ile genotiplendirmişlerdir. Sonuç olarak izolatlarını tamamının aynı genetik profile sahip olduklarını ortaya koymuşlar ve bu metodun *Y. ruckeri* izolatlarının genetik karakterizasyonunda oldukça kullanılabilir olduğunu ve laboratuvar şartlarına kolayca adapte edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde M13 primeri ile analiz edilen izolatların 15’inin yüksek düzeyde (% 88 ve üzeri) benzer olduğu belirlenmiştir. Üç izolatın ise (3, 5 ve 11 nolu) farklı bir kümede yer aldığı belirlenmiştir.

RAPD-PCR’da P5 ve P6 primerleri kullanarak *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı balık patojenlerinde bu primerler kullanılarak izolatlar arası genetik ilişkiler ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesinde P5 ve P6 primerleri ile *Tenacibaculum maritimum* izolatları genotiplendirilmiştir. Çalışmada P5 primeri ile bazı izolatlarda amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. Dolayısıyla bu bakterilerin tiplendirilmesinde P5 primeri kullanılamayacağı ortaya konulmuştur. P6 primeri ile ise izolatların konakçı spesifitesine göre kümelerle ayrıldığı belirlenmiştir (Avendano-Herrera vd., 2004). Diğer bir çalışmada ise P5 ve P6 primerlerinin *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu belirlenmiş ve her iki primer ile yapılan gruplandırmada gruplar arasında yaklaşık aynı benzerlik katsayısı elde edilmiştir (Mancuso vd., 2007). Foschino vd. (2008), *Lactococcus garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan P5 ve P6 primerlerinin her ikisi ile de izolatların yeterli düzeyde amplifikasyon ürünü verdiği, dolayısıyla her iki primerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur. P5 primerinin ayırım gücünün (0,817), P6 primerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Aşılansız balıklarda görülen salgınlardan izole edilen *Y. ruckeri* izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin farklı fenotipik ve moleküler tiplendirme metodların kombine edilerek kullanıldığı bir polifazik çalışmada, izolatlar ERIC-PCR ve REP-PCR metodları ile karşılaştırmalı olarak genotiplendirilmiştir. Elde edilen amplifikasyon sonuçları her iki yöntemin de *Y. ruckeri* izolatlarını ayırt etmede başarılı olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte ERIC-PCR’ın REP-PCR’a oranla ayırım gücünün daha yüksek olduğu ve *Y. ruckeri* izolatlarını daha iyi ayırt ettiği belirlenmiştir (Bastardo vd., 2012). Şili ve Peru kökenli *Y. ruckeri* izolatlarının karakterize edildiği çalışmalarda da ERIC-PCR’ın REP-PCR’a oranla daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ortaya konulmuştur (Bastardo vd., 2011a; Bastardo vd., 2011b). Benzer şekilde bu çalışmada da DNA’nın amplifikasyonuna dayanan tiplendirme metodlarının karşılaştırılması sonucu ayırım gücü en yüksek olan metodun ERIC-PCR olduğu ve bu metodun hastalığın epidemiyolojisinde kullanılabilirliği belirlenmiştir.

Farklı tiplendirme metodlarının karşılaştırılması olarak değerlendirildiği çalışmada Huang vd. (2013), Almanya kökenli 83 *Y. ruckeri* izolatını karakterize etmişlerdir. Bu amaçla izolatların genotiplendirilmesinde (GTG)5-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR ve PFGE metodunu kullanmışlardır. İzolatlar REP-PCR ile iki, ERIC-PCR ile beş, (GTG)5-PCR ile dört ve BOX-PCR ile üç farklı küme içerisinde gruplandırılmıştır. PFGE metodu ile ise 17 farklı pulsetip elde edilmiştir. Çalışmada REP-PCR'ın 0.048 ile en düşük ayırım gücüne sahip olduğu yani test popülasyonundan rastgele seçilen iki izolatının farklı bir REP-PCR paterni gösterme olasılığının % 4,8 olduğu belirlenmiştir. REP-PCR metodunu sırasıyla BOX-PCR (0,071), (GTG)5-PCR (0,095) ve ERIC-PCR'ın (0,140) takip ettiği belirlenmiştir (Huang vd., 2013). Bu çalışmada ise farklı olarak değerlendirilen tiplendirme metodları arasında en düşük ayırım gücüne (GTG)5-PCR'ın sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç *Y. ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde (GTG)5-PCR'ın kullanılabilirliğinin düşük olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe yaygın olarak görülen ve ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde DNA amplifikasyonuna dayanan farklı tiplendirme metodları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu metodlar içerisinde ERIC-PCR ayırım gücü en yüksek metod olarak bulunmuştur. RAPD-PCR'da P5 ve P6 primerleri ilk kez kullanılmış olup, her iki primerin *Y. ruckeri* izolatları ile amplifikasyon ürünü verdiği belirlenmiştir. (GTG)5-PCR'ın ise en düşük ayırım gücüne sahip olduğu ve *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde tercih edilmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte çalışmada test edilen izolatların genetik olarak homojen bir yapıda olduğu belirlenmiştir.

Moleküler tiplendirme metodlarının epidemiyolojiye uyarlanması ve bakteriler arasındaki klonal ilişkilerin detaylı olarak ortaya konulması ile hastalıkların kapsamı, kaynağı ve rezervuarı hakkında bilgiler edinilebilmektedir. Bu bilgiler ışığında hastalıkla mücadelede etkin stratejiler geliştirilebilmektedir. Ülkemiz su ürünleri sektöründe hastalıkların kontrol altına alınmasında bu tarz çalışmaların bölgesel olarak yaygın bir şekilde devam etmesi ve ulusal veribankaları oluşturulması gerekmektedir.

Teşekkür: Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiş ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.18.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftçi, A., Duman, M., & Büyükekiz, A.G. (2013). Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 225-232.
- Avendano-Herrera, R., Rodriguez, J., Magarinos, B., Romalde, J.L., & Toranzo, A.E. (2004). Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 871-877.
- Bastardo, A., Bohle, H., Ravelo, C., Toranzo, A.E., & Romalde, J.L. (2011a). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Diseases Aquatic Organism*, 93, 207-214.
- Bastardo, A., Ravelo, C., & Romalde, J.L. (2012). Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1888-1897.
- Bastardo, A., Sierralta, V., Leon, J., Ravelo, C., & Romalde, J.L. (2011b). Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*, 317, 229-232.
- Çağırğan, H., & Yürekli, O. (1991). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in Turkey. Fifth International Conference, Disease of Fish and Shellfish Book of Abstracts, 131.
- Davies, R.L., & Frerichs, G.N. (1989). Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases*, 12, 357-365.
- Duman, M., Altun, S., Cengiz, M., Saticioglu, I.B., Buyukekiz, A.G., & Sahinturk, P. (2017). Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 125, 31-44.
- Durmaz, R. (2008). Bakteri tiplendirme çalışmaları için gerekli?, XXXIII. Türk mikrobiyoloji kongresi, İstanbul, Kongre Kitabı, s, 27-30.
- Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D.J., & Fanning, G.R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Red Mouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28, 37-44.

- Fidanboyulu, A. (2010). Gram negatif bakterilerin moleküler tiplendirilmesinde bazı pcr tabanlı yöntemlerin karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M., & Bottero, M.T. (2008). Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 652-62.
- Grundmann, H.J., Towner, K.J., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Mahmer, M., Seifert, H., & Vaneechoutte, M. (1997). Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3071-7.
- Horne, M.T., & Barnes, A.C. (1999). Enteric Red Mouth Diseases (*Yersinia ruckeri*) In: Fish Diseases and Disorders Volume 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed.: P.T.K. Woo, D.W. Bruno, CAB International, New York, USA. p, 455-479.
- Huang, Y., Runge, M., Michael, G.B., Schwarz, S., Jung, A., & Steinhagen, D. (2013). Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in north west Germany. *BMC Veterinary Research*, 9, 215
- Köksal, F. (1999). Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarıda kullanımı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 3, 189-95.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46, 103
- Li, W., Raoult, D., & Fournier, P.E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 892-916.
- Mancuso, M., Avendano-Herrera, R., Zaccone, R., Toranzo, A.E., & Magarinos, B. (2007). Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Biological Research*, 39, 71-82.
- Olive, D.M., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661-1669.
- Onuk, E.E., Çiftçi, A., Findık, A., Çiftçi, G., Altun, S., Balta, F., Özer, S., & Çoban, A.Y. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 124(7-8), 320-328.
- Özer, S., Bulduklu, P., Dönmez, E., Koyuncu, E., Serin, M.S., Aslan, G., Tezcan, S., Aydın, E., & Emekdas, G. (2008). Phenotypic and genetic homogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Mersin Province, Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(3), 97-104.
- Öztürk, R.Ç., & Altınok, İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 275-297.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Barja, J.L., & Toranzo, A.E. (1993). Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*: proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 411-419.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 30, 257-268.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831.

Farklı Çözgenlerle Elde Edilmiş *Ulva lactuca* Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitesi

Fatma ÖZTÜRK^{*}, Sevim HAMZAÇEBİ

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: fatma.ozturk@ikc.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 04 Ocak 2019; Kabul 05 Mart 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Öztürk, F., & Hamzaçebi, S. (2019). Farklı çözgenlerle elde edilmiş *Ulva lactuca* ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 272-279. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.508150>

Özet

Bu çalışmada, *Ulva lactuca* ekstraktlarının Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*) ve Gram negatif (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*) bakterilere karşı antibakteriyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, *U. lactuca*, aseton, etanol, metanol, hekzan, kloroform ve distile su gibi farklı çözücüler ile ekstrakte edilmiştir. Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Araştırma sonunda, en yüksek antibakteriyal aktivite etanol ekstresinde saptanmıştır. Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere kıyasla daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon zonu *S. aureus* (26 mm) ve *B. cereus*'ta (21 mm) tespit edilmiştir. Kloroform ekstresinin *E. coli* ve *A. hydrophila*'ya, hekzan ekstresinin ise *S. enteritidis*'e karşı yüksek düzeyde antibakteriyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aseton ve su ekstraktlarının ise test edilen bakteri türlerine karşı etkili olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular, *U. lactuca*'nın etanol ekstresinin, gıda ve farmasötik endüstrisinde doğal koruyucu madde olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir

Anahtar kelimeler: Antibakteriyal aktivite, alg ekstraktı, disk difüzyon yöntemi, *Ulva lactuca*

Antibacterial Activity of *Ulva lactuca* Extracts Prepared with Different Solvents

Abstract

In this study it was aimed to determine the antibacterial activity of *Ulva lactuca* extracts against Gram positive (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*) bacteria. For this purpose, *U. lactuca* was extracted with different solvents such as acetone, ethanol, methanol, hexane, chloroform and distilled water. Disc diffusion method was used to determine antibacterial activity. At the end of the study, the highest antibacterial activity was determined in the ethanol extract. Gram positive bacteria were found to be more sensitive than Gram negative bacteria. The highest inhibition zone was determined in *S. aureus* (26 mm) and *B. cereus* (21 mm). Chloroform extract was found to exhibit strong antibacterial activity against *E. coli* and *A. hydrophila*. However, antibacterial activity against *S. enteritidis* was detected in hexane extract. Acetone and water extracts were not effective against bacterial species tested. These findings show that the ethanol extract of *U. lactuca* has the potential to be used as a natural preservative in food and pharmaceutical industry.

Keywords: Antibacterial activity, algae extract, disc diffusion method, *Ulva lactuca*

GİRİŞ

Çok hücreli ökaryotik organizmalardan olan makro algler veya daha yaygın olarak bilinen yosunlar denizel ekosistemin çok önemli bir bölümünü oluştururlar (Pramitha ve Lipton, 2014; Dhanya vd., 2016; Chingizova vd., 2017). Deniz yosunları, doğada en hızlı büyüyen bitki organizmalarıdır. İlaç, kozmetik, gıda ve hayvan yemi gibi sektörlerde uygulama alanı bulabilen ve biyolojik olarak aktif bileşikler üretme kabiliyetine sahip canlılardır (Yu-Qing vd., 2016; Akbary ve Aminikhoei, 2018). Dünyada üretilen deniz yosunlarının % 50'si gıda sanayinde, % 40'ı ilaç-kozmetik sanayinde ve % 10'u diğer alanlarda değerlendirilmektedir (Çebi vd., 2016). Bugüne kadar, farklı biyolojik aktivitelere sahip, kimyasal olarak eşsiz deniz kökenli birçok bileşik izole edilmiş ve bunların bazıları yeni farmasötikleri geliştirmek için öncü moleküller olarak kullanılmıştır (Rangaiaha vd., 2010).

Deniz yosunları hayat kurtarıcı ilaçların en önemli kaynağıdır ve geleneksel olarak hiperlipidemi, güneş çarpması ve birçok idrar yolu hastalığının tedavisi için uzun yıllardır kullanılmaktadır (Umapoorani vd., 2016; Yu-Qing, 2018). Deniz yosunları, genel olarak, Rhodophyceae (kırmızı algler), Phaeophyceae (kahverengi algler) ve Chlorophyceae (yeşil algler) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (Pushparaj vd., 2014). *Ulva lactuca*, ülkemizde, Ege Denizi (Çandarlı Körfezi, İzmir Körfezi ve Midilli Adası), Marmara Denizi ve Karadeniz’de yayılış gösteren ve yüksek biyomaslara ulaşan bir Chlorophyceae üyesidir (Durmaz vd., 2008; Aktar, 2012). Deniz marulu olarak da isimlendirilen *U. lactuca*, kıyı alanlarının litoral ve sublitoral bölgelerindeki diğer algler ve kayalar üzerinde kozmopolit bir dağılım göstermektedir (Pushparaj vd., 2014; Yu-Qing vd., 2016). *Ulva* türleri, tadı, kimyasal bileşimi ve kalitesi nedeniyle ticari ürün olma potansiyeline sahiptir. Endüstriyel olarak önemli biyopolimerlerin iyi bilinen kaynaklarıdır ve bunların organik ekstraktlarının, kanser hücresi soyları, antibakteriyal, antifungal ve antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Pushparaj vd., 2014; Godeh vd., 2017). *U. lactuca*, alkaloid, flavonoid, tanen, steroid, saponin ve antrakınon gibi antibakteriyal potansiyele sahip biyoaktif bileşikler içermektedir (Umapoorani vd., 2016; Godeh vd., 2017). Ayrıca, bileşiminde bulunan sülfatlanmış polisakaritler, fenolikler, terpenoidler, laktonlar, sterol ve yağ asitlerinin antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan aktivitesi temel olarak süperoksit ve hidroksil radikallerine karşı temizleme aktivitesine, şelatlama kabiliyetine, tekli ve üçlü oksijeni söndürme ve azaltma gücüne bağlanmaktadır (El-Baky vd., 2008; Alghazeer vd., 2013).

U. lactuca, antiülser, antikanser, antibakteriyal, antiviral, antifungal, antiprotozoal, antienflamatuar, antioksidan, antikoagulan, antiperoksidatif, antihiperlipidemik, hepatoprotektif, hiperkolesterolemi ve immünostimulant etki gibi biyolojik aktivitelerine bağlı olarak tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Umapoorani vd., 2016). Su ürünleri ve diğer hayvansal üretim endüstrilerinde vücut kompozisyonu, büyüme performansı, yem değerlendirilmesi ve sindirilebilirliği üzerine denemeler yapılmasına rağmen, antimikrobiyel olarak kullanımına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır (Yıldırım vd., 2009; Abudabos vd., 2013; El-Waziry vd., 2015).

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan çok sayıda bakteri bulunmakla birlikte, en önemlileri *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp. olarak bilinmektedir (Sağlam ve Şeker, 2016). Gıda kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık üçte birinin bakteriyel etkenlerden meydana geldiği saptanmıştır. Bu etkenlerden *Salmonella* spp. ilk sırada yer alırken, *S. aureus* onu takip etmektedir (Çakıcı vd., 2015). *Salmonella* cinsi, 2600 kadar farklı serotip içermesine rağmen, yalnızca 50 tanesi insanlarda patojenite göstermektedir. Hastalığa neden olan serotiplerden en önemlileri *S. enteritidis* ve *S. typhimurium*’dur. *S. enteritidis*, gıda kaynaklı gastroenteritlere ve en fazla ölüme neden olan gıda patojenidir (Selamoğlu ve Halkman, 2017). *S. aureus*, deri enfeksiyonları, pnömoni, endokardit, menenjit, septisemi ve toksik şok sendromu gibi hayatı tehdit eden hastalıklara neden olmaktadır (Atyah vd., 2010). *E. coli* O157:H7, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpuraya yol açmaktadır. *V. parahaemolyticus*, diyare, ishal, baş ağrısı, kusma, bulantı, karın krampları ve düşük ateş ile karakterize akut gastroenterit gelişimine neden olmaktadır (Huang vd., 2018). *B. cereus* ise kusma ve ishale karakterize edilen gıda zehirlenmelerinden sorumludur. Bu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Bhunia, 2018). Antibiyotikler, tüm dünyada en çok kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, toplam sağlık bütçesinin % 35’i antibiyotiklere harcanmaktadır. Ülkemizdeki ilaç pazarının da yaklaşık % 20’sini antibiyotikler oluşturmaktadır (Erol vd., 2004). Antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı, antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Chingizova vd., 2017). Bu direnç, bakteriyel enfeksiyonlara yönelik morbidite, mortalite ve sağlık bakım maliyetlerini arttıran önemli bir faktör haline gelmiştir (Raj vd., 2015; Deveau vd., 2016; Chingizova vd., 2017).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya çapında her yerde antibiyotik direncinin bulunduğunu ve müdahale olmaksızın dünyanın postantibiyotik bir döneme doğru ilerlediğini bildirmiştir (WHO, 2014). Bu nedenle antibiyotik kullanımının kısıtlanması veya kontrol edilmesi ile ilgili girişimler ağırlık kazanmıştır (Erol vd., 2004). Ayrıca, farklı bir yapıya ve etki tarzına sahip yeni antibakteriyal maddelerin keşfine yönelik çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır (Kim vd., 2007). Kara ve deniz ekosistemleri potansiyel olarak zengin yeni antimikrobiyal kaynaklar içermektedir. Ancak, karasal organizmalar, antibiyotik kapasiteleri için yoğun olarak tüketilirken, denizel doğal ürünlerinin

antimikrobiyal olarak kullanımları daha kısıtlı düzeyde kalmıştır. Kimyasal ilaçların aksine, bitki ve yosunların doğal kaynaklı ve halk ilaçları olarak uzun süreli kullanımı nedeniyle toksik olmadığı düşünülmektedir (Dhanya vd., 2016; Chingizova vd., 2017). Yosunlardan elde edilen pek çok madde ilaç ve farmakoterapide uzun yıllardır kullanılmakta olup, izole edilen maddelerin antibakteriyal, antifungal, antiviral ve antikanser aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 2007; Pushparaj vd., 2014). Özellikle, deniz yosunları antimikrobiyal özellikleri bakımından değerlendirilmemiş bitki kaynakları olarak dikkat çekmektedir (Deveau vd., 2016).

Türkiye denizlerinde bulunan makro alglerin dağılımı, taksonomisi, kimyasal içerikleri, besin değerleri ve antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (Cetingul ve Guner, 1996; Dere vd., 2003; Taskin vd., 2006; Polat ve Ozogul, 2008). Ancak, *U. lactuca* türüne yönelik yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, farklı çözücüler (aseton, etanol, metanol, hekzan, klorofom ve distile su) kullanılarak hazırlanan *U. lactuca* ekstraktlarının gıda patojenlerine (*E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, *S. aureus* ve *B. cereus*) karşı antibakteriyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Test Mikroorganizmaları ve Besiyerleri

Denemede kullanılan Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 KUEN 1461, *S. enteritidis* ATCC 13076, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *A. hydrophila*) ve Gram pozitif (*S. aureus* ATCC 6538 ve *B. cereus*) bakteri türleri İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve ekstraktların antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) ve Müller Hilton Agar (MHA, Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

Alg Ekstraktının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *U. lactuca* alg türü, 2018 Haziran ayında, Ege denizi, Güllük Körfezi, Kıyıkışlacık Mevkii sahil şeridinden taze olarak toplanmıştır. Toplanan numuneler, yabancı maddeleri uzaklaştırmak için deniz suyu ile yıkanmış ve plastik torbalarda laboratuvara getirilmiştir. Musluk suyuyla yıkandıktan sonra kurutma fırınında (50 °C) kurutulup toz haline getirilmiştir. 20 g numune 200 ml çözücü (aseton, etanol, metanol, hekzan, kloroform ve distile su) içerisine ilave edilmiştir. Daha sonra çalkalamalı su banyosunda 50 °C'de 6 saat tutulduktan sonra filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Filtrat üzerine çözücü eklenerek ekstraksiyona devam edilmiştir. Bu işlem 4 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen çözücülerde rotary evaporatör (50 °C) kullanılarak uzaklaştırılmış ve freeze dryer kullanılarak liyofilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ekstraktlar, % 10'luk dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözdürülerek antibakteriyal aktivite denemelerinde kullanılmıştır (Mammadov vd., 2011).

Antibakteriyal Aktivitenin Belirlenmesi

Alg ekstraktlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer yöntemi) kullanılmıştır (Bauer vd., 1966). Denemede kullanılan bakterilerin 24 saatlik kültürleri steril fizyolojik tuzlu su ile seyreltilerek 0.5 Mc Farland standart yoğunluğuna getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan bakteri inokulumlarından 0,1 ml MHA içeren petri kutularına yayma plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Steril boş diskler ekim yapılan petri kutularına yerleştirildikten sonra alg ekstraktlarından 15 µl inoküle edilerek emmesi için bekletilmiştir. İnoküle edilen petri kutuları 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan zon çapları ölçülerek antibakteriyal aktivite belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak ampisilin (AMP; 10 µg) diski kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak boş disklere %10'luk DMSO'dan 15 µl inoküle edilmiştir. Denemeler 2 tekrerrür olarak gerçekleştirilmiştir.

İstatistik Analiz

Araştırmada elde edilen veriler ANOVA (varyans analizi) kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile değerlendirilmiştir. Deneme grupları arasında fark olup olmadığını test etmek için SPSS paket programı kullanılmıştır (IBM SPSS 2012).

BULGULAR

Bu çalışmada, distile su, aseton, metanol, etanol, kloroform ve hekzan gibi farklı polariteye sahip çözücülerle ekstrakte edilen *U. lactuca*'nın gıda patojenlerine karşı antibakteriyal aktivitesi değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan *U. lactuca* ekstraktlarının antibakteriyal etkisi bakteri türleri arasında farklılık göstermiştir. En yüksek antibakteriyal aktivite (26 mm), *S. aureus*'a karşı etanol ekstraktında elde edilmiştir. En düşük antibakteriyal aktivite (7 mm) ise *V. parahaemolyticus*'a karşı metanol ekstraktında saptanmıştır. Etanol ve metanol ekstraktları, Gram pozitif bakterilere özellikle *S. aureus*'a spesifik görünmektedir ($P<0,05$). *U. lactuca* etanol ekstraktı, *S. enteritidis* dışında test edilen diğer bakterilere karşı ampisilin (AMP) ile aynı düzeyde antibakteriyal aktivite sergilemiştir ($P<0,05$). Metanol ekstraktıyla yürütülen denemelerde ise, *V. parahaemolyticus* ve *A. hydrophila*'ya karşı tespit edilen inhibisyon zonunun AMP'den daha yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0,05$). Sonuç olarak, çözücülerin antibakteriyal etkilerinin farklı olduğu, *S. aureus* ve *B. cereus*'da etanol, *S. enteritis*'de hekzan, *E. coli*'de etanol ve kloroform ile *A. hydrophila*'da etanol, metanol ve kloroform ekstraktlarının etkili olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Aseton ve su ekstraktlarının ise test edilen bakteri türlerine karşı etkili olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$). *U. lactuca* ekstraktlarına karşı, Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilere kıyasla daha duyarlı bulunmuştur.

Tablo 1. *U. lactuca* ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi (mm)

Ekstrakt	Gram (-) Bakteriler				Gram (+) Bakteriler		
	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i> 0157:H7	<i>S. enteritidis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Metanol	0 ± 0 ^{Cb}	8 ± 1,4 ^{Bb}	10 ± 0,7 ^{Bb}	7 ± 1 ^{Ba}	8 ± 2 ^{Ba}	20 ± 2 ^{Aa}	12 ± 0,7 ^{Bb}
Etanol	18 ± 0,7 ^{Ba}	10 ± 0 ^{Cb}	8 ± 0 ^{Cb}	9 ± 1 ^{Ca}	9 ± 1 ^{Ca}	26 ± 0 ^{Aa}	21 ± 0 ^{Aba}
Kloroform	13 ± 0,9 ^{Aa}	0 ± 0 ^{Bc}	0 ± 0 ^{Bc}	0 ± 0 ^{Bb}	10 ± 1,4 ^{Aa}	0 ± 0 ^{Bc}	0 ± 0 ^{Bc}
Hekzan	0 ± 0 ^{Cb}	0 ± 0 ^{Cc}	12 ± 0 ^{Aab}	0 ± 0 ^{Cb}	0 ± 0 ^{Cb}	8 ± 2 ^{Bb}	0 ± 0 ^{Cc}
Aseton	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}
Su	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}
DMSO	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ab}	0 ± 0 ^{Ac}	0 ± 0 ^{Ac}
AMP	14 ± 0,7 ^{Ca}	21 ± 1,4 ^{Aba}	16 ± 0,7 ^{BCa}	0 ± 0 ^{Db}	0 ± 0 ^{Db}	24 ± 0,7 ^{Aa}	18 ± 2 ^{ABCab}

a, b, c(1), A, B, C(↔) Aynı veya ortak harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir ($P>0,05$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda, antibiyotiklere dirençli bakteri suşlarındaki artış ve sentetik ilaçların yüksek maliyeti, yeni ve doğal antimikrobiyel maddelere olan ilgiyi arttırmıştır (Kavitha vd., 2017). Deniz yosunları, polisakaritler, çoklu doymamış yağ asitleri, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip farklı metabolitlere ve doğal biyoaktif bileşiklere sahiptir (Umapoorani vd., 2016; Godeh vd., 2017). *U. lactuca*, patojenik mikroorganizmaları kontrol etmede güçlü bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (Yu-Qing vd., 2016; Godeh vd., 2017).

Bu çalışmada tespit edildiği gibi, *U. lactuca* etanol ekstraktının antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu farklı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Rangaiaha vd., 2010; Saritha vd., 2013; Boisvert vd., 2015). *U. lactuca*'nın etanol ekstraktının (500 µg/mL), *E. coli*, *Micrococcus luteus* ve *Brochothrix thermosphacta*'nın gelişimini % 69,5; % 61,4 ve % 21,4 düzeyinde inhibe ettiği belirtilmiştir (Boisvert vd., 2015). Saritha vd. (2013), *U. lactuca* etanol ekstraktının *E. coli* üzerinde antibakteriyal etkisinin olduğunu bulmuştur. Rangaiaha vd., (2010), *U. lactuca* etanol ekstraktında maksimum inhibisyon oranını *E. coli*'de elde etmiştir. Deniz yosunlarının (*Kappaphycus alvarezii* ve *U. lactuca*) aseton, kloroform, etanol, etil asetat ve metanol ekstresinin insan patojenlerine karşı (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*) antibakteriyal aktivitesi araştırılmış, en iyi aktivite, etanol ekstraktında kaydedilmiştir (Pushparaj vd., 2014). Bu araştırmacılar tarafından da belirtildiği gibi, etanolün diğer çözücülere kıyasla daha güçlü ekstraksiyon kapasitesine sahip olduğu ve daha fazla antibakteriyal bileşik (alkaloidler,

steroidler, flavonoidler, uçucu yağlar, terpenoidler) açığa çıkarttığı için daha etkili olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada, en yüksek antibakteriyal aktivitenin etanol ekstraktından elde edildiği, bunu metanol ekstraktının takip ettiği belirlenmiştir. Godeh vd. (2017), *Ulva* türlerinin metanolik ekstraktlarının *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella pnömoniye* karşı antibakteriyal aktivitesini değerlendirmişlerdir. Özellikle ilkbahar ve yaz mevsimlerinde toplanan *U. lactuca*'nın metanolik ekstraktları *S. aureus* üzerinde maksimum inhibitör etkiye (20 mm) sahip bulunmuştur. *E. coli* üzerindeki inhibitör aktivitenin daha düşük (17-12 mm), *P. mirabilis* ve *K. pneumonia* üzerinde ise etkili olmadığı belirlenmiştir (Godeh vd., 2017). Yeşil (*Cladophora glomerata*, *U. lactuca* ve *Ulva reticulata*), kırmızı (*Gracilaria corticata* ve *Kappaphycus alvarezii*) ve kahverengi (*Sargassum wightii*) alg türlerinin su ve metanolik ekstraktlarının Gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*) ve Gram pozitif bakterilere (*Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes*) karşı etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, metanol ekstraktlarının su ekstraktından daha yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Mansuya vd., 2010). *U. lactuca*'nın etil asetat, metanol ve su ekstresinin *S. aureus* ve *E. coli*'yi inhibe etme yeteneğinin araştırıldığı bir başka çalışmada, *U. lactuca*'nın metanol ekstresi maksimum (15 mm) antibakteriyal aktiviteyi göstermiştir (Kavitha vd., 2017).

Kim vd., (2007) tarafından, *U. lactuca*'nın etil-eter, etil asetat, hekzan ve su ekstraktlarının antibakteriyal aktivitesi, Gram pozitif (*B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*), Gram-negatif (*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*) ve mantar (*Candida albicans*) türlerine karşı denenmiştir. İnhibisyon zonları sadece etil-eter fraksiyonunda gözlenmiştir (Kim vd., 2007). Tüney vd. (2006) tarafından da, 11 deniz alginden elde edilen metanol, aseton, dietil eter ve etanol ekstraktında en yüksek antimikrobiyal aktivite dietil eter kullanımında gerçekleşmiştir (Tüney vd., 2006). Deniz suyu ve yapay deniz suyunda üretilen *U. lactuca*'nın dichloromethane/methanol ekstraktı *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *M. luteus*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*'e karşı antibakteriyal etki göstermesine rağmen ticari ilaçlar kadar etkili bulunmamıştır (El-Baky vd., 2008). Başka bir çalışmada, *U. lactuca*, *U. fasciata*, *U. reticulata*'nın farklı çözücülerle (kloroform, etil asetat, aseton ve metanol) hazırlanan ekstraktları *Enterococcus faecalis*'in farklı suşlarına karşı test edilmiştir. En düşük zon çapı metanol ekstraktından elde edilmiştir. Buna karşın, etil asetat ekstraktları, diğer solventlere kıyasla daha yüksek antibakteriyal aktivite göstermiştir (Chandrasekaran vd., 2014). Kosanic vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmada ise *U. lactuca*'nın aseton ekstraktının MIC değerlerinin *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis*'te sırasıyla 2,5; 0,625 ve 0,312 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ancak, antibakteriyal aktivite standart antibiyotiklere kıyasla daha zayıf bulunmuştur. Yapılan bu araştırmalarda, antibakteriyal aktivitenin ekstraksiyon yöntemine ve ekstraksiyonda kullanılan çözücünün türüne bağlı olarak değişim gösterdiği rapor edilmiştir (Tüney vd., 2006; Kolsi vd., 2015).

Vallinayagam vd. (2009) yapmış olduğu bir çalışmada, *U. lactuca*'nın kloroform ekstraktının, *S. aureus* (2,1 mm), *Shigella bodii* (1,36 mm), *P. aeruginosa* (1,23 mm) ve *Shigella dysenteriae*'ye (2,56 mm) karşı inhibitör etkiye sahipken, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholera* ve *K. pneumonia* üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur. Tarafımızca yürütülen bu çalışma da ise, kloroform ekstraktının yalnızca Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *A. hydrophila* üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteri türleri arasındaki farklılığın Vallinayagam vd. (2009) tarafından da ifade edildiği gibi direnç mekanizmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bakteri türleri, iç ve dış membran permeabilitesinde değişiklik meydana getirerek, antimikrobiyel maddeyi enzimlerle inaktive ederek, kimyasalın bağlandığı reseptör bölgede değişiklik oluşturarak antimikrobiyel maddelere karşı daha dirençli hale gelmektedir (Yüce, 2001).

U. lactuca, mikroorganizmalar üzerinde etkili olan antimikrobiyal aktiviteden sorumlu alkaloid, flavonoid, tanen, steroid, saponin ve antrakinonları içermektedir. (Umapoorani vd., 2016; Godeh vd., 2017). Bu çalışmada, *U. lactuca* ekstraktlarının Gram pozitif bakteriler üzerinde daha güçlü antibakteriyal etki oluşturduğu belirlenmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Tüney vd., 2006; Kolsi vd., 2015; Raj vd., 2015; Chingizova vd., 2017). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısı ve geçirgenliğinin farklı olması duyarlılıklarının da farklı olmasına neden olmaktadır (Kosanic vd., 2015). Gram negatif bakterilerde, dış zar antibiyotikler de dahil olmak üzere birçok maddeye engel oluşturmaktadır (Raj vd., 2015). Gram-negatif bakteriler, lipopolisakkarit bileşenlerini taşıyan bir dış fosfolipidik membrana sahiptir. Bu yapı, hücre duvarını

lipofilik çözücülere geçirimsiz kılarken, porinler hidrofilik çözücü için seçici bir engel oluşturur. Gram pozitif bakteriler ise, yalnızca, etkili bir geçirgenlik engeli olmayan dış peptidoglikan katmana sahiptir (Arias vd., 2004; Kosanic vd., 2015).

Deniz yosunlarının antimikrobiyal aktivitesinin coğrafi koşullar ve mevsimsel değişikliklere bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmiştir (Deveau vd., 2016). Elde ettiğimiz sonuçların önceki çalışmalardan farklı olması, alg hasadının yapıldığı bölge ve mevsimin farklı olmasına, aktif metabolitleri elde etmek için kullanılan ekstraksiyon yöntemine ve kullanılan hedef bakteri suşlarının duyarlılıklarındaki farklılığa bağlanmıştır. Antibakteriyal aktiviteye ilişkin yapılan bu çalışmada, *U. lactuca* ekstraktlarının test edilen bakterilere karşı etkili olduğu, bu etkinin özellikle Gram pozitif patojenlere karşı daha yüksek olduğu saptanmıştır. Antibakteriyal aktivitede en etkili ekstraksiyon yönteminin etanol ekstraksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, *U. lactuca*'nın, gıda ve farmasötik endüstrisinde doğal koruyucu madde olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abudabos, A.M., Okab, A.B., Aljumaah, R.S., Samara, E.M., Abdoun, K.A., & Al-Haidary, A.A. (2013). Nutritional value of green seaweed (*Ulva lactuca*) for broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 12(2), e28.
- Akbary, P., & Aminikhoie, Z. (2018). Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1345-1353.
- Aktar, S. (2012). *Ulva lactuca* bitkisi'nin morfolojisi ve fenolik bileşiklerinin stabilitesi üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 93 s.
- Alghazeer, R., Whida, F., Abduelrhman, E., Gammoudi, F., & Azwai, S. (2013). Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Natural Science*, 5(1), 7.
- Arias, M.E., Gomez, J.D., Cudmani, N.M., Vattuone, M.A., & Isla, M.I. (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences*, 75(2), 191-202.
- Atyah, M.A.S., Zamri-Saad, M., & Siti-Zahrah, A. (2010). First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 502-504.
- Bhunja, A.K. (2018). Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer.
- Çebi, A., Soyulu, E.N., & Kablan, S. (2016). Karadeniz'den toplanan *Ulva lactuca* L. türünün toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 6(14), 22-29.
- Cetingul, V., & Guner, H. (1996). Determination of chemical contents of some of the economically important green algae. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 13, 101-118.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493-496.
- Boisvert, C., Beaulieu, L., Bonnet, C., & Pelletier, É. (2015). Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds. *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), 377-387.
- Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., & Raj, A.G. (2014). Antibacterial activity of selected marine macro algae against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2, 940-946.
- Chingizova, E.A., A.V. Skriptsova, M.M. Anisimov., & Aminin, D.L. (2017). Antimicrobial activity of marine algal extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 9, 113- 122
- Çakıcı, N., Demirel-Zorba, N.N., & Akçalı, A. (2015). Gıda endüstrisi çalışanları ve stafilkokal gıda zehirlenmeleri. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 72(4).
- Deveau, A.M., Miller-Hope, Z., Lloyd, E., Williams, B.S., Bolduc, C., Meader, J.M., & Burkholder, K.M. (2016). Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important *Staphylococci* is impacted by lunar phase of macroalgae harvest. *Letters in Applied Microbiology*, 62(5), 363-371.
- Dere, S., Dalkiran, N., Karacaoglu, D., Yildiz, G., & Dere, E. (2003). The determination of total protein, total soluble carbohydrate and pigment contents of some macro algae collected from Gemlik-Karacaali (Bursa) and Erdek-Ormanli (Balıkesir) in the Sea of Marmara, Turkey. *Oceanologia*, 45, 453-471.
- Dhanya, K. I., Swati, V.I., Vanka, K.S., & Osborne, W.J. (2016). Antimicrobial activity of *Ulva reticulata* and its endophytes. *Journal of Ocean University of China*, 15(2), 363-369.
- Durmaz, Y., Duyar, H.A., Gökpinar, Ş., Öğretmen, Y.Ö., & Bandarra, N.M. (2008). *Ulva* spp. (Sinop, Karadeniz) türünün yağ asitleri, α tokoferol ve toplam pigment miktarının araştırılması. 2(3), 350-356.

- El-Baky, H.A., El Baz, F. K., & El Baroty, G.S. (2008). Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *American Eurasian Journal of Agricultral Enviromental Sciences*, 3, 434-444.
- El-Waziry, A., Al-Haidary, A., Okab, A., Samara, E., & Abdoun, K. (2015). Effect of dietary seaweed (*Ulva lactuca*) supplementation on growth performance of sheep and on in vitro gas production kinetics. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(1), 81-86.
- Erol, S., Özkurt, Z., Parlak, M., Ertek, M., & Taşıyan, M. (2004). Bir üniversite hastanesinde antibiyotik kullanımı ve antibiyotik kullanım politikasının gerekliliği. *Flora*, 9(1), 54-60.
- Godeh, M.M., El-Gahmi, H.A., Bleiblo, A.M., & Said, A.A. (2017). Antibacterial Activity of methanolic extracts of 5 species of *Ulva* from Benghazi coasts, Libya [Version 1; awaiting peer review]. *Control*, 1, 07.
- Huang, Y.S., Hwang, C.A., Huang, L., Wu, V.C.H., & Hsiao, H.I. (2018). The risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw oysters as affected by processing and distribution conditions in Taiwan. *Food Control*, 86, 101-109.
- Kavitha, K., Rynghang, J.S., & Peter, J.D. (2017). Antimicrobial activity of sea weed - *Ulva lactuca* against common bacterial pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Indian Journal of Applied Microbiology*, 20(1), 42-46.
- Kim, I.H., Lee, D.G., Lee, S.H., Ha, J M., Ha, B.J., Kim, S.K., & Lee, J.H. (2007). Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(5), 579-582.
- Kosanic, M., Ranković, B., & Stanojković, T. (2015). Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 390-397.
- Kolsi, R.B.A., Frikha, D.O.N.Y.E.Z., Jribi, I.M.E.D., Hamza, A.S.M.A., Feki, L.O.T.F.I., & Belghith, K.A.R.I. M.A. (2015). Screening of antibacterial and antifungal activity in marine macroalgae and magnoliophytea from the coast of Tunisia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 47-51.
- Mammadov, R., Ili, P., Ertem Vaizogullar, H., & Afacan Makascı, A. (2011). Antioxidant activity and total phenolic content of *Gagea fibrosa* and *Romulea ramiflora*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30(3), 57-62.
- Mansuya, P., Aruna, P., Sridhar, S., Kumar, J.S., & Babu, S. (2010). Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of selected seaweeds from Gulf of Mannar region. *Journal of Experimental Sciences*, 1(8), 23-26.
- Polat, S., & Ozogul, Y. (2008). Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8), 566-572
- Pramitha, V.S., & Lipton, A.P. (2014). Antimicrobial effect of *Ulva fasciata* Delile, 1813 solvent extracts against multidrug resistant human pathogenic bacteria and fish pathogens. *Indian Journal of Geo-Marine Science*, 43(12), 2244-2253.
- Pushparaj, A., Raubbin, R.S., & Balasankar, T. (2014). Antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3, 432-436.
- Raj, G.A., Krishnamoorthy, M.C S., & Venkatesalu, V. (2015). Antibacterial activity of different solvent extracts of *Caulerpa chemnitzia* (Esper) JV Lamououx, from Mandapam, Gulf of Mannar Southeast Coast, Tamil Nadu, India. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*, 1, 24-31.
- Rangaiaha, G.S., Lakshmi, P., & Sruthikeerthia, K. (2010). The antimicrobial activity of the crude extracts of Chlorophycean seaweeds *Ulva*, *Caulerpa* and *Spongomorpha* spp. against clinical and phytopathogens. *Drug Invention Today*, 2, 311-314.
- Sağlam., D., & Şeker, E. (2016). Gıda kaynaklı bakteriyel patojenler. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9(2), 105-113.
- Saritha, K., Mani, A.E., Priyalaxmi, M., & Patterson, J. (2013). Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3), 276-282.
- Selamoğlu, H., & Halkman, A.K. (2017). Gıda maddelerinde Salmonella aranmasında laktoz broth ve tamponlanmış peptonlu su ile özengenleştirme süresinin karşılaştırılması. *Gıda/The Journal of Food*, 42(4), 457-467.
- Taskin, E., Ozturk, M., & Wynne, M.J. (2006). First report of microspongium globosum Reinke (Phaeophyceae, Myrionemataceae) in the Mediterranean Sea. *Nova Hedwig*, 82(1-2), 135-142.
- Tüney, İ., Cadirci, B.H., Ünal, D., & Sukatar, A. (2006). Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 30(3), 171-175.
- Umapoorani, T., Periyarayagam, K., Indumathi, S., Balasubramanian, R., Sugithra, B., Subbulakshmi, N., & Velmurugan, R. (2016). Antimitotic activities of ulvan from *Ulva lactuca* (1) by using *Allium cepa* root tip model. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 5779-5783.
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance-global report on surveillance. Geneva, Switzerland: WHO Press.

- Vallinayagam, K., Arumugam, R., Kannan, R.R.R., Thirumaran, G., & Anantharaman, P. (2009). Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam coastal regions. *Global Journal of Pharmacology*, 3(1), 50-52.
- Yu-Qing, T., Mahmood, K., Shehzadi, R., & Ashraf, M.F. (2016). *Ulva lactuca* and its polysaccharides: Food and biomedical aspects. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(1), 140-151.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmalar. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
- Yıldırım, Ö., Ergün, S., Dernekbaşı, S. Y., & Türker, A. (2009). Effects of two seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3), 455-460.

Nemrut Krater Gölü'nden (Bitlis/Türkiye) İzole Edilen *Chlorella* sp. Mikroalgında H₂O₂ Uygulaması ile Triaçilgliserol Üretimini Artırılması

Emine SELÇUKⁱⁿ, Turgay ÇAKMAK^{in*}

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.

*Sorumlu Yazar: turgay.cakmak@medeniyet.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 05 Ocak 2019; Kabul 22 Nisan 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Selçuk, E., & Çakmak, T. (2019). Nemrut Krater Gölü'nden (Bitlis/Türkiye) izole edilen *Chlorella* sp. mikroalgında H₂O₂ uygulaması ile triaçilgliserol üretimini artırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 280-288. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.508780>

Özet

Bu çalışmada Nemrut Volkanik Gölü'nden izole edilen bir *Chlorella* sp. mikroalgında oksidatif stresin düzeyine bağlı olarak triaçilgliserol miktarında ve formasyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Bu amaçla mikroalgelerde oksidatif stresi uyarmak için büyüme ortamlarına 1µM, 5µM, ve 20µM yoğunluklarda hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanmıştır. Hidrojen peroksit uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur. Uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1µM ve 5µM H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma kalkmıştır. Mikroalgelerin H₂O₂ içerikleri, uygulanan H₂O₂ yoğunluğu ile orantılı şekilde artmıştır. Mikroalgelerin klorofil ve karotenoid içerikleri H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da lineer olarak azalmıştır. Mikroalgelerin triaçilgliserol içerikleri özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte yaklaşık olarak 2,1 kat artış ile en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Floresans görüntüleme ile elde edilen sitoplazmik lipid cisimi üretimindeki artış da bu veriyi desteklemiştir. Böylece, bu çalışma ile elde edilen sonuçlar kısa süreli ve düşük yoğunlukta H₂O₂ uygulamasının mikroalglerden biyodizel hammaddesi olan triaçilgliserol üretiminde kullanılabilecek bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Chlorella*, H₂O₂, nötral lipid, oksidatif stres, triaçilgliserol.

Enhancement of Triacylglycerol Production via H₂O₂ Application in *Chlorella* sp. Isolated from Nemrut Crater Lake (Bitlis/Turkey)

Abstract

In this study, oxidative stress depended changes in lipid production and formation in *Chlorella* sp. was analyzed. The strain was isolated from Lake Nemrut which is a volcanic lake located in Bitlis province. In order to induce oxidative stress in microalgae 1µM, 5µM, and 20µM hydrogen peroxide (H₂O₂) were added into the growth media. Hydrogen peroxide application caused a significant decrease in growth starting from the first day of incubation. Following decrease of the growth for first five-days, microalgae started to grow up as a response to 1µM and 5µM H₂O₂ application. The H₂O₂ contents of microalgae increased in proportion to the applied H₂O₂ concentration. Total chlorophyll and carotenoid contents showed a gradual increase during first 24 hours of H₂O₂ application, and then a linear decrease was followed afterwards. A maximum of 2.1 fold increase in triacylclglyerole content of microalgae was recorded after 24 hours of 5µM H₂O₂ application. Fluorescence imaging of cytoplasmic lipid bodies support this datum. Thus, results of this study showed that short-term and low-density H₂O₂ application might be used as a potential approach to induce microalgal triacylglycerol production as a biodiesel feedstock.

Keywords: *Chlorella*, H₂O₂, neutral lipid, oxidative stress, triacylglycerol.

GİRİŞ

Kısa yaşam döngüleri, kolay manipüle edilebilmeleri ve tarıma uygun olmayan alanlarda kolayca üretilebilmeleri gibi özellikleriyle mikroalgler, sürdürülebilir yolla katma değeri yüksek ürün eldesi için biyoteknoloji endüstrisinde önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir. Genel olarak biyotik ya da abiyotik stres faktörüne cevapta mikroalglerde ergastik maddeler ya da sekonder metabolitlerin üretimi değişkenlik gösterir.

Mikroalglerin biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol üretim etkinliğinin artırılması üzerine şimdiye kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla abiyotik stress faktörlerinin uygulanması ile büyümede baskılanmanın yanında nötral lipid üretiminde artışın sağlandığı çalışmalardır (Sharma vd., 2012). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda başlıca düşük sıcaklık (Elmoraghy vd., 2012), makroelement açlığı (Elibol Cakmak vd., 2014), mikroelement fazlalığı (Chen vd., 2011), tuzluluk (Mohan ve Devi, 2014), yüksek (He vd., 2015) ya da düşük ışık şiddeti (George vd., 2014), pH (Elibol Çakmak, 2018) ile azot kaynağındaki değişimin (Elibol Çakmak, 2019) çok sayıda mikroalg türünün nötral lipid üretiminin artırılması üzerine olumlu etkilerinin oluşu bildirilmiştir. Diğer taraftan abiyotik stress uygulamasının sebep olduğu büyümedeki baskılanma ile nötral lipid üretiminin mikroalglerde oluşan oksidatif stresin düzeyi ile doğrudan ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir (Solovchenko, 2012; Elibol Cakmak vd., 2015).

Literatürde bildirilen 10 farklı türle temsil edilen *Chlorella* (Chlorophyta) cinsi mikroalgler heterotrof, miksotrof ya da fotoototrof olarak yetiştirilebilmektedir ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılan nötral lipid üretiminde biyoteknolojik olarak üretilebilme potansiyeli taşırlar (Petkov ve Garcia, 2007). *Chlorella* cinsi mikroalglerdeki lipid içeriğinin kuru ağırlığın %14-%63'ü oranında değişebildiği bildirilmiştir (Gouveia ve Oliveira, 2009; O'Grady ve Morgan, 2011). Nötral lipid üretiminin artırılması için yapılan stres uygulamaları bir yana özellikle evsel ve endüstriyel atıksularda diğer yeşil mikroalgere göre daha geniş bir yayılım gösteren *Chlorella* türlerinin oksidatif strese toleranslı oldukları ve bu bölgelerden izole edilen mikroalglerin biyodizel hammaddesi üretimi açısından daha etkili oldukları yönünde bulgular bildirilmiştir (Osundeko vd., 2013; Sibi vd., 2016).

Hidrojen peroksit alglerde çoğunlukla fotosentez ve solunum esnasında normal olarak hücre içerisinde üretilen, ancak aşırı birikmesi durumunda çok sayıda metabolik faaliyeti sekteye uğratan ve oksidatif hasara sebep olabilen güçlü bir oksidanttır (Mallick ve Mohn, 2000). Bu çalışmada, Bitlis il sınırları içerisinde bulunan volkanik bir göl olan Nemrut Gölünden izole edilen *Chlorella* sp. mikroalginde artan yoğunluklarda hidrojen peroksit uygulaması ile mikroalglerde oluşturulan oksidatif stresin düzeyine bağlı olarak lipid miktarında ve formasyonundaki değişiklikler incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Türün İzolasyonu, Tanımlanması ve Büyütme Koşulları

Chlorella sp. mikroalgi Bitlis ilinde bulunan bir volkanik göl olan Nemrut Krater Gölünden (42°15'25"N 38°31'11"E), izole edilmiştir. *Chlorella* sp. türü morfolojik (Bellinger ve Sige, 2015) tanımlamanın yanı sıra 18S rRNA geninin sekans analizi yapılarak da teşhis edilmiştir. Bu amaçla PCR'la çoğaltılan genomik DNA parçasının sekans analizi (Hoham vd., 2002)'e göre yapılmıştır. Tür tanımlama amacıyla DNA çoğaltımı ve Sanger sekans analizi için ileri 5'-TGATCCTTCYGCAGGTTAC-3' ve geri: 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' birbirini takip eden primerler kullanılmıştır. Sekans sonucu elde edilen sonuçlar NCBI-BLAST programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada mikroalgler içerisinde 0,25g/L NaNO₃, 0,18g/L KH₂PO₄, 0,075g/L MgSO₄.7H₂O, 0,025 g/L CaCl₂.2H₂O, 0,075g/L K₂HPO₄, 0,0025g/L NaCl, 0,1g/L Na₂EDTA, 0,05g/L FeSO₄.7H₂O, 0,1g/L H₃B₃, 18,1 mg/L MnCl₂.4H₂O, 2,22 mg/L ZnSO₄.7H₂O, 3,9mg/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0,8mg/L CuSO₄.5H₂O, ve 0,5mg/L Co(NO₃)₂.6H₂O bulunan ve pH'sı 6,8'e ayarlanmış olan Bold's Basal Medium büyütme ortamında kültüre alınmışlardır (Bischoff ve Harold, 1963). Çalışma için mikroalgler dört gruba ayrılmıştır. İçerisinde 100ml hacimde 0, 1µM, 5µM, ve 20µM H₂O₂ ilave edilmiş olan BBM çözeltilisi bulunan 250ml'lik erlenlerde kültüre alınan mikroalglerin büyüme hızları 120 rpm devir hızında 26°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 250 µE/(m²/s) sürekli ışık altında 12 gün boyunca takip edilmiş, inkübasyondan 2, 8, 24, 48 ve 72 saat sonra hasat edilen örnekler belirlenen analizler için kullanılmıştır. Mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişiklikler her 24 saatte bir optik yoğunluğa göre 680nm dalga boyunda belirlenen absorbans değişimleri esas alınarak takip edilmiştir.

Mikroalglerin İçerdikleri H₂O₂ Yoğunluğunun Belirlenmesi

Mikroalglerdeki H₂O₂ miktarının tayini (Shin vd., 2005)'e göre Amplex Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 100mg mikroalg örneğinin üzerine 150µl fosfat tamponu (20 mM KH₂PO₄, pH 7.4) ilave edilmiş, 2dk

boyunca sonikasyon ile hücrelerin parçalanması sağlanmış ve 12000 xg devir hızında 5dk boyunca 4°C'de santrifüjlenerek elde edilen süpernatant örnekleri kullanılmıştır.

Toplam Klorofil ve Toplam Karotenoidlerin Spektrofotometrik Tayini

Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil ve karotenoid miktarı (Jeffrey ve Humphrey, 1975)'den modifiye edilerek spektrofotometrik metodla belirlenmiştir. Tayin için 100g mikroalg örneği üzerine 500 µl %90'luk aseton ilave edilerek 15 dk boyunca karıştırılmış ve 10000 xg devir hızında 5 dk boyunca 4°C'de santrifüj edilmiş, 250µl süpernatant 96 kuyucuklu plağa yüklenmiştir. Süpernatant absorpsiyonları sırasıyla 750, 664, 647, 470 ve 630 nm'dalga boylarında %90'luk aseton körüne karşı okunmuştur. Toplam klorofil ve karotenoid miktarları (Jeffrey ve Humphrey, 1975) tarafından bildirilen denklemler kullanılarak hesaplanmış olup toplam klorofil sonuçları klorofil a ve b'nin toplamı olarak sunulmuştur.

Sitoplazmik Lipid Cisimlerinin Floresans Görüntülenmesi

Mikroalglerde oluşan sitoplazmik lipid cisimlerinin görüntülenmesi amacıyla mikroalgler (Elsev vd., 2007) tarafından tarif edildiği şekilde Nil kırmızısı ile boyanmıştır. Buna göre, 680nm dalga boyunda yapılan ölçüme göre alınarak absorpsiyon değerleri 0,2-0,3 aralığında seyreltilmiş olan 1 ml hacimde mikroalg örneklerinin içerisine 5µg/ml Nil kırmızısı (Invitrogen) ilave edilmiş ve mutlak karanlıkta 15dk boyunca oda şartlarında hafif şekilde çalkalanmak suretiyle karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında örneklerin floresans görüntüleri TXRED (560nm ex-630nm em) filtresi ile floresans mikroskop sistemi (Zeiss AXIO Imager M2) kullanılarak elde edilmiştir.

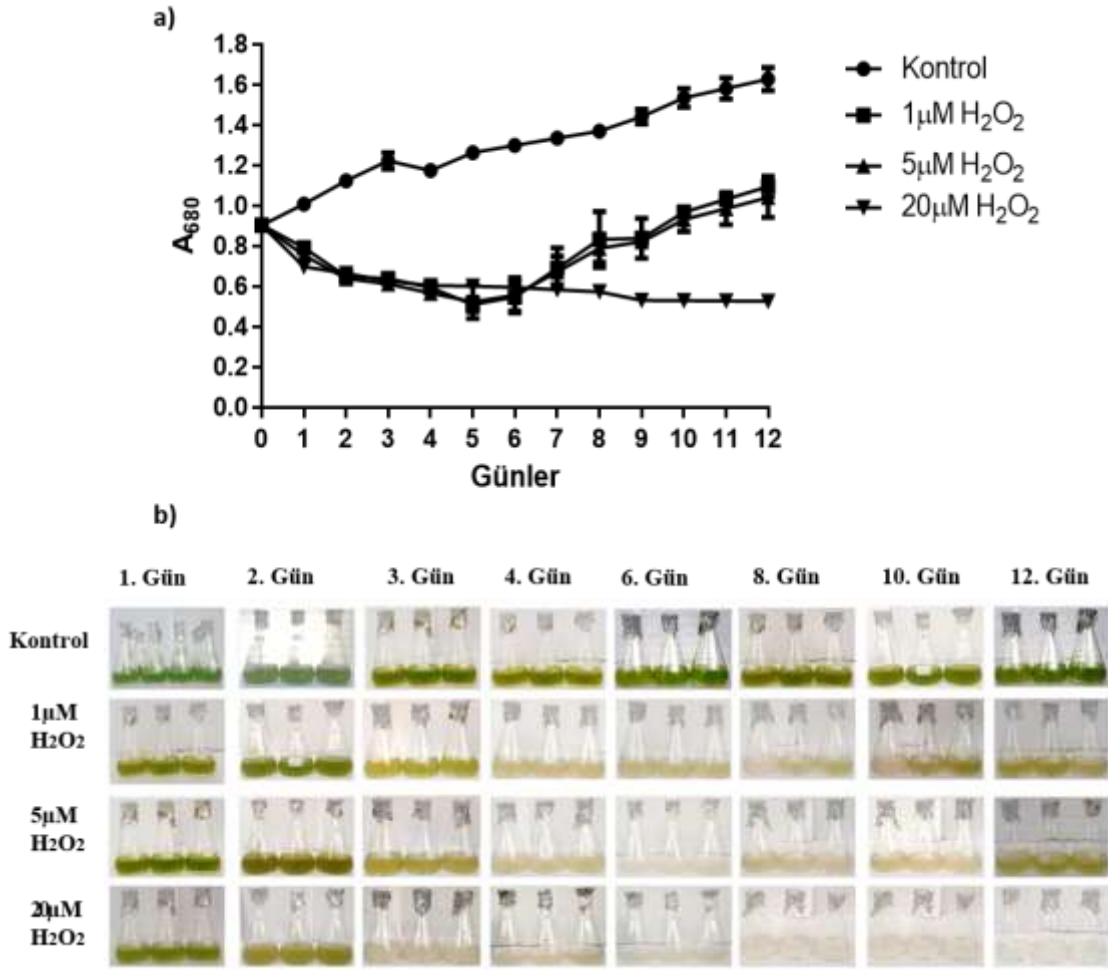
FT-IR analizi ile Triaçilgliserollerin miktarsal tayini

Mikroalglerin ürettikleri triaçilgliserollerin (TAG) miktarsal tayinleri Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile nisbi olarak belirlenmiştir. Ölçüm için 50mg liyofilize edilmiş mikroalg örnekleri pens yardımıyla doğrudan ATR modülü ile desteklenmiş FT-IR (PerkinElmer-L160000A, USA) cihazının örnek modülüne yerleştirilmiştir. Numune alıcısının kızılötesi spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında 128 tarama ile kaydedilmiştir. FTIR analizinde çevresel koşullardan fazla etkilenmeyen absorpsiyon bandı olan Amid 1 (1652 cm⁻¹) değeri doğrulama değeri olarak seçilmiştir. Böylece, trigliseritlerin ester grubunun (C=O) titreşimi (1744 cm⁻¹) ile verdiği absorpsiyon değerinin Amid 1 değerlerine oranlanarak mikroalglerdeki triaçilgliserol konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikler tespit edilmiştir (Mairet vd., 2011). Daha sonra H₂O₂ uygulanan mikroalglerden elde edilen TAG/Amid 1 oranları, H₂O₂ uygulanmayan kontrol grubu ile elde edilen TAG/Amid 1 oranına bölünerek mikroalglerin TAG içeriklerinde meydana gelen nisbi değişim “-n katı değişim” olarak grafiklendirilmiştir.

Bu çalışmada deney iki farklı zamanda 3 biyolojik tekrar kullanılarak yürütülmüş ve elde edilen verilerin ortalamaları sunulmuştur. Değerler arasındaki istatistiksel farklılıklar ikinci dereceden iki kuyruklu student t-test uygulaması kullanılarak değerlendirilmiş, %95 veya daha yüksek oranda farklı olduğu belirlenen veriler önemli bulgular olarak değerlendirilmiştir.

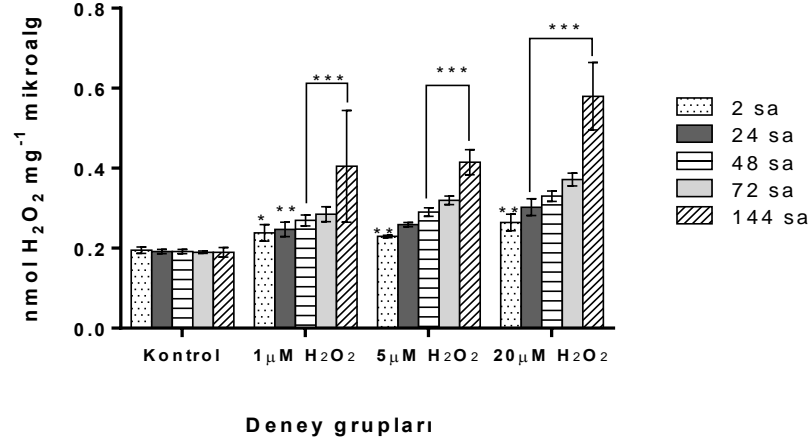
BULGULAR

Herhangi bir stres faktörü uygulandığında mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişim, stresin şiddeti hakkında bir fikir verebilir. Bu çalışmada mikroalglerin büyümesi ortama 1, 5 veya 20µM H₂O₂ ilave edildiğinde ilk gün sırasıyla yaklaşık %21, %25 ve %31 oranında baskılanmıştır (Şekil 1). Büyümedeki baskılanma zamana bağlı olarak artmış ve 5. günün sonunda büyümedeki baskılanma sırasıyla %59, %60 ve % 62 olarak belirlenmiş, bu süreden sonra 1 ve 5µM H₂O₂ ilave edilmiş olan grupta yeniden büyüme gerçekleşmeye başlamış ve hatta büyüme hızlanmıştır. Büyümedeki baskılanma 1 ve 5µM H₂O₂ uygulanan gruplarda 12 günlük inkübasyonun sonunda %32 ve %36 düzeylerinde iken 20µM H₂O₂ uygulanmış olan grupta büyümedeki baskılanma lineer olarak artmış ve %68 ile en yüksek değere ulaşmıştır (Şekil 1a,b).



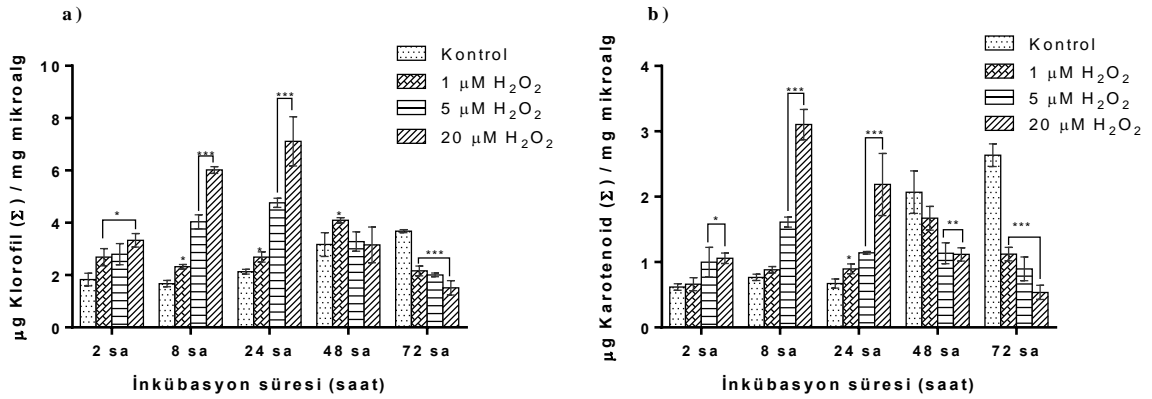
Şekil 1. Artan yoğunluklarda H₂O₂ uygulanan mikroalglerin büyümelerinde meydana gelen değişimi gösteren a) Absorbans ölçümleri ile b) erlen görüntüleri

Mikroalglerin büyümelerindeki baskılanma ilk 5 günlük inkübasyonun sonunda 1µM ve 5µM uygulamalarda en yüksek düzeylere çıkmış, 20µM H₂O₂ uygulanan grupta da bu süreden sonra durağan bir seyir izlenmiştir. Bu sebeple takip eden analizler 5 gün boyunca hasat edilen örnekler kullanılarak yürütülmüştür. Mikroalglerin hücrel H₂O₂ içerikleri ortama uygulanan H₂O₂ konsantrasyonları ile doğru orantı göstermiştir (Şekil 2). Ortam H₂O₂ yoğunluğu arttığında mikroalglerdeki H₂O₂ konsantrasyonu da yüksek değerde bulunmuştur. İnkübasyonun ilk gününde 1µM, 5µM ve 20µM H₂O₂ uygulanan türlerde kontrole kıyasla sırasıyla %22, %18 ve %36 düzeylerinde daha yüksek olarak belirlenen hücrel H₂O₂ konsantrasyonları 5 günlük inkübasyon periyodunun sonunda sırasıyla %113, %119 ve %205 oranında daha yüksek değerler olarak belirlenmiştir.



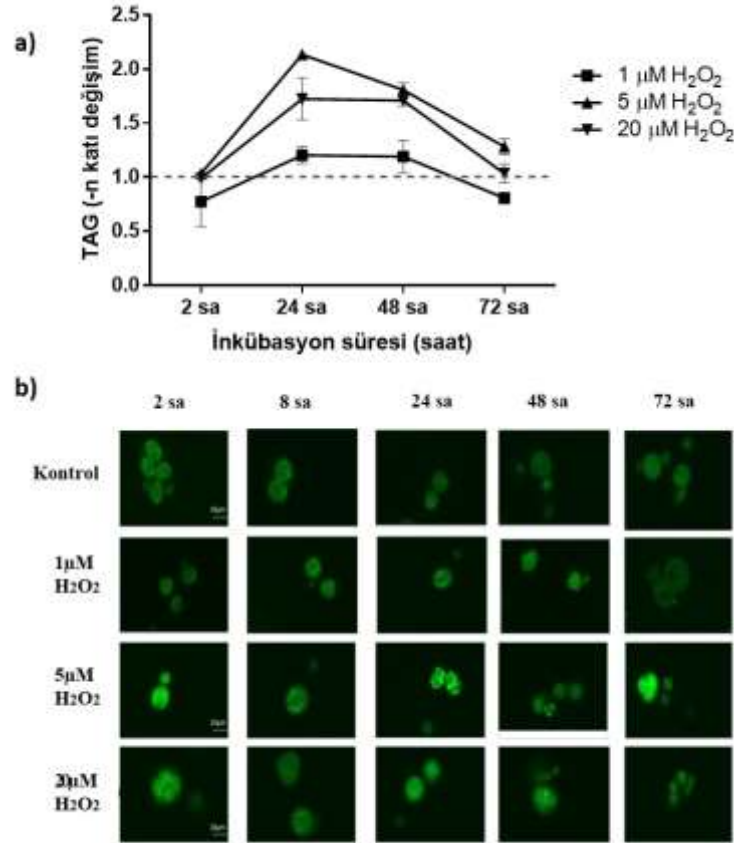
Şekil 2. Mikroalglerin H₂O₂ içeriklerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişim

Mikroalglerin toplam klorofil içerikleri H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatte artmış, daha sonra önemli oranda azalmıştır (Şekil 3a). H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %49, %52 ve %81 oranında artış belirlenmiş ve bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %26, %123 ve %233 oranlarında artışlar olarak kaydedilse de takip eden günlerde klorofil parçalanması sonucu toplam klorofil miktarında önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. Mikroalglerin içerdikleri toplam klorofil miktarı 72 saatlik inkübasyonun sonunda 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %41, %45 ve %58 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3. Mikroalglerin a) toplam klorofil ve b) toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişim

Mikroalglerdeki zamana ve H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak toplam klorofil miktarındaki değişime benzer sonuçlar alglerdeki karotenoid miktarındaki değişime paralellik göstermiştir (Şekil 3b). H₂O₂ uygulamasından sonraki ilk iki saat içerisinde 1, 5 ve 20 uM H₂O₂ uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %6, %46 ve %70 oranında artış belirlenmiş bu artışlar 24 saatin sonunda sırasıyla yaklaşık olarak %33, %69 ve %202 oranlarında artışlar olarak belirlense de takip eden günlerde önemli oranda azalma gözlemlenmiştir. Mikroalglerdeki toplam karotenoid miktarı 1, 5 ve 20uM H₂O₂ uygulanan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %57, %68 ve %79 oranında daha düşük olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4. Mikroalglerin a) TAG içeriklerinde meydana gelen nispi değişim ve b) sitoplazmik lipid cisimlerinin floresans görüntüleri

Mikroalglerin triaçilgliserol içerikleri FT-IR analizi ile tayin edilmiştir. Genel olarak H₂O₂ uygulaması *Chlorella* sp. mikroalginin triaçilgliserol üretimi üzerine ilk 24 saatte en yüksek düzeye çıkarmıştır (Şekil 4). Mikroalglerin TAG içerikleri 1,5 µM ve 20 µM H₂O₂ uygulamasına cevapta ilk 24 saatin sonunda yaklaşık olarak sırasıyla 1,2- 2,1 ve 1,7 kat artmış, ancak daha sonra TAG içerikleri lineer düşüş sergilemiştir (Şekil 4a). Böylece TAG içeriğindeki en yüksek artış 5µM H₂O₂ uygulamasından 24 saat sonra belirlenmiştir. Diğer taraftan FT-IR ölçümleri ile elde edilen sonuçlar floresans boyama ile elde edilen görüntülerle uyumludur (Şekil 4b). İnkübasyondan sonraki ilk 8 saatte H₂O₂ stresi uygulanan hücrelerde lipid kesecikleri net bir şekilde görülmüştür. Özellikle 24 saat sonra 5µM H₂O₂ uygulamasında sitoplazmik lipid cisimlerinin oluşumu net bir şekilde artmıştır. 20µM yoğunlukta H₂O₂ uygulanan mikroalglerde zaman içerisinde hücresel bütünlük bozulmaya başlamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikroalglerden biyodizel hammaddesi ve katma değeri yüksek ürün eldesi için uygulanan stresin şiddeti önemlidir. Bu çalışmada, H₂O₂ uygulaması ilk günden itibaren büyümede önemli düzeyde baskılanmaya sebep olmuştur (Şekil 1). Özellikle uygulamanın ilk 5 gününde büyümedeki baskılanma artmış, takip eden günlerde 1 µM ve 5 µM H₂O₂ uygulanan gruplarda büyüme yeniden gelişmiş ve baskılanma ortadan kalkmıştır. Düşük konsantrasyonda H₂O₂ değerinde hücreler hayatta kalabilecek kapasite gösterirken yüksek konsantrasyondaki H₂O₂ yoğunluğu hücrelerin muhtemelen yüksek oksidatif stres ile birlikte membran yapılarında bozulma meydana geldiği için 20µM olarak uygulanan grupta yeniden büyüme gerçekleşmemiş olabilir.

Doğal sularda H₂O₂ yoğunluğu 10µM'a kadar çıkabilmektedir (Cooper vd., 1988). Diğer taraftan artan H₂O₂ yoğunluğuna siyanobakterilere kıyasla ökaryot yapıda mikroalglerin 10 kat daha fazla dayanım gösterdikleri bildirilmiştir (Drábková vd., 2007). Aynı çalışmada 8µM H₂O₂ uygulamasına cevapta *Microcystis aereginosa* siyanobakterisinin büyümesindeki önemli baskılanmanın siyanobakterinin fotosentez verimindeki %50'lik düşüştan kaynaklandığı, *Pseudokirchneriella*

subcapitata yeşil mikroalginin büyümesinde görülen %15'lik baskılanmanın da yine bu algin fotosentez veriminde görülen %7'lik düşüşle doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Drábková vd., 2007). Bununla birlikte (Mallick ve Mohn, 2000) yaptıkları çalışmada yeşil bir mikroalg olan *Chamydomonas sp.* türünün fizyolojik faaliyetlerinde 10µM H₂O₂ uygulamasına cevapta önemli bir değişim görülmemesini, bu mikroalgde bulunan tiol-modüle enzimlerin H₂O₂'ye karşı hassas olmamasından dolayı mikroalgin fotosentez sistemindeki dayanımdan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada mikroalglerin içerdikleri H₂O₂ konsantrasyonları zamana ve uygulanan H₂O₂ yoğunluğuna paralel bir artış sergilemiştir (Şekil 2). Böylece, ortam H₂O₂ yoğunluğundaki artış mikroalglerde doğrudan oksidatif strese sebep olan bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan mikroalglerin toplam klorofil ve karotenoid içerikleri H₂O₂ uygulanan gruplarda konsantrasyon ile doğru orantılı olarak ilk 24 saatte artmış, daha sonra da azalmıştır (Şekil 3). Benzer şekilde (Choo vd., 2004) yeşil mikroalglerden *Cladophora glomerata* ve *Enteromorpha ahlneriana*'da oksidatif strese verilen akut cevapta ilk olarak klorofil ve karotenoid üretimindeki artışın önemli olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan *Chlorella sp.* mikroalginin özellikle ilk 24 saatlik inkübasyon süresi içerisinde karşılaştığı oksidatif strese cevapta fotosentez mekanizmaları hücrel redoks dengesinin sağlanmasında başlıca rol oynamış olabilir.

Hücrel redoks homeostazisini bozan olağan dışı stres koşullarına cevapta mikroalgler tarafından TAG sentezlendiği çok sayıda çalışma ile rapor edilmiştir (Zemke vd., 2010; Xin vd., 2018). Bu çalışmada hidrojen peroksit uygulaması ilk 24 saatlik inkübasyonda mikroalglerin TAG içeriklerini istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır. FT-IR analizi ile belirlenen TAG içeriklerindeki değişim 24 saatin sonunda özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasında yaklaşık olarak ,1 kat ile en yüksek düzeyde artış olarak kaydedilmiştir (Şekil 4a). Mikroalglerin Nil kırmızısı ile boyanması ile elde edilen floresans görüntüleri de FT-IR ile elde edilen verileri desteklemekte, mikroalglerin sitoplazmik lipid cisimcikleri üretiminin özellikle 5µM H₂O₂ uygulamasının ilk 24 saat içerisinde tetiklediğini göstermiştir (Şekil 4b). Triaçilgliseroller alglerde fotosentez sisteminin düzenlenmesinde önemli biyokimyasal roller üstlenen uzun zincirli yağ asitlerinin üretilmesi için başlıca kaynaktır (Sharma vd., 2012). Yine TAG üretimi oksidatif strese maruz kalan alglerde fotosentez sonucu üretilen enerjinin depo edilebilmesi için çok uygun bir yoldur (Yilancioglu vd., 2014). Son olarak sitoplazmik lipid cisimcikleri şeklinde depo edilen TAG'lerin alglerde fotosentez sisteminin aşırı yüklenmesini engellemek adına ışığı adeta geri yansıtan bir optik koruyucu olarak rol oynayabilecekleri bildirilmiştir (Solovchenko, 2012). Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlar, varsayılan 72500 tür (Guiry, 2012) ile temsil edilen alg dünyasında biyodizel hammaddesi olarak TAG üretim etkinliği belirlenecek olan mikroalglerin seçiminde doğrudan oksidatif stres uyarımının uygun bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Yüksek yapıli bitkiler gibi ökaryot yapıda olan mikroalglerin depoladıkları ve büyük oranda TAG'lerden teşkil olan nötral lipidlerin biyodizel hammaddesi olarak kullanıma elverişli olmaları bu organizmaları fosil yakıtlara bağımlılığın azaltılabilmesi açısından biyoteknolojik olarak üstün kılmaktadır. Bu çalışmada Nemrut Gölünden izole edilen bir mikroalg olan *Chlorella sp.* türünde 5 µM H₂O₂ uygulamasının 24 saat içerisinde mikroalglerden biyodizel hammaddesi olarak kullanılan triaçilgliserol miktarını iki katın üzerine çıkarmıştır. Bu sayede düşük yoğunlukta H₂O₂ uygulamasının biyoteknolojik açıdan mikroalglerden biyodizel ve katma değeri yüksek ürün eldesinde değerlendirilebilecek uygun bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır.

Teşekkür: Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2015). *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*: John Wiley & Sons.
- Bischoff, H., & Harold, C. B. (1963). *Some soil algae from enchanted rock and related algal species* (Vol. 1): University of Texas.
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T., Ng, K., & Salley, S. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1649-1655.
- Choo, K.-s., Snoeijs, P., & Pedersén, M. (2004). Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(1), 111-123.

- Cooper, W. J., Zika, R. G., Petasne, R. G., & Plane, J. M. (1988). Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight. *Journal of Environmental Science and Technology*, 22(10), 1156-1160.
- Drábková, M., Admiraal, W., & Maršálek, B. (2007). Combined exposure to hydrogen peroxide and light selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Journal of Environmental Science and Technology*, 41(1), 309-314.
- Elibol Çakmak, Z., Olmez, T. T., Çakmak, T., Menemen, Y., & Tekinay, T. (2014). Induction of triacylglycerol production in *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparative analysis of different element regimes. *Bioresource Technology*, 155, 379-387.
- Elibol Çakmak, Z., Olmez, T. T., Çakmak, T., Menemen, Y., & Tekinay, T. (2015). Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycological Research*, 63(3), 202-211.
- Elibol Çakmak, Z. (2018). Meke Krater Gölü'nden (Konya/Türkiye) izole edilen *Dunaliella tertiolecta* mikroalginin nötral lipid içeriğine pH değişimlerinin etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(3), 220-231.
- Elibol Çakmak, Z. (2019). Ammonium nutrition induces triacylglycerol, β -carotene, and lutein production in *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(4), 331-342.
- Elmoraghy, M., Webster, T., & Farag, I. (2012). Microalgae lipid triggering by cooling stressing. *Journal of Energy and Power Engineering*, 6(12), 1918.
- Else, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 639-642.
- George, B., Pancha, I., Desai, C., Chokshi, K., Paliwal, C., Ghosh, T., & Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus*—A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology*, 171, 367-374.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36(2), 269-274.
- Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of phycology*, 48(5), 1057-1063.
- He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219-228.
- Hoham, R., Bonome, T., Martin, C., & Leebens-Mack, J. (2002). A combined 18S rDNA and rbcL phylogenetic analysis of Chloromonas and Chlamydomonas (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *Journal of phycology*, 38(5), 1051-1064.
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemistry Physiology Pflanzen*, 167(19), 1-194.
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., & Sciandra, A. (2011). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresource Technology*, 102(1), 142-149.
- Mallick, N., & Mohn, F. H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, 157(2), 183-193.
- Mohan, S. V., & Devi, M. P. (2014). Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae. *Bioresource Technology*, 165, 288-294.
- O'Grady, J., & Morgan, J. A. (2011). Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(1), 121-125.
- Osundeko, O., Davies, H., & Pittman, J. K. (2013). Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. *Biomass & Bioenergy*, 56, 284-294.
- Petkov, G., & Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Journal of Biochemical Systematics and Ecology*, 35(5), 281-285.
- Sharma, K., Schuhmann, H., & Schenk, P. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553.
- Shin, R., Berg, R. H., & Schachtman, D. P. (2005). Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Journal of Plant and Cell Physiology*, 46(8), 1350-1357.
- Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2016). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels—A review. *Journal of the Energy Institute*, 89(3), 330-334.
- Solovchenko, A. J. R. j. o. p. p. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 167-176.
- Xin, Y., Shen, C., She, Y., Chen, H., Wang, C., Wei, L., & Xu, J. (2018). Biosynthesis of triacylglycerol molecules with tailored PUFA profile in industrial microalgae. *Molecular Plant*, 12 (4), 474-488.

- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *Plos One*, 9(3).
- Zemke, P., Wood, B., & Dye, D. (2010). Considerations for the maximum production rates of triacylglycerol from microalgae. *Biomass & Bioenergy*, 34(1), 145-151.

Acute Toxicity of Cadmium on *Ophelia bicornis* Savigny, 1822

Levent BAT*, Fatih ŞAHİN, Aysah ÖZTEKİN

University of Sinop Fisheries Faculty, Sinop, Turkey.

*Corresponding Author: leventbat@gmail.com

Research Article

Received 08 January 2019; Accepted 12 March 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Bat, L., Şahin, F., & Öztekin, A. (2019). Acute toxicity of cadmium on *Ophelia bicornis* Savigny, 1822. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 289-297. <https://doi.org/10.22392/actaqua.509974>

Abstract

Static bioassays to assess acute toxicity of cadmium on *Ophelia bicornis* were first time conducted. Organisms were exposed to the different concentrations of cadmium for 24, 48, 72 and 96-hr. The LC₅₀ values for 24, 48, 72 and 96-h with 95% confidence limits were estimated by the probit method and were found as 26 (22.8-29.4), 18 (15-22), 12 (9.1-14.4) and 7.2 (6.8-7.5) mg/l for Group 1 (15 and 25 mm in length) and 28 (24.6-33.8), 24 (22.4-25.5), 18 (16.1-19) and 8.7 (7.8-9.6) mg/l for Group 2 (26 and 36 mm in length), respectively. Toxicity of Cd was dependent on concentration and exposure time. LC₅₀ increased with increasing the length of organisms. Mortality of *O. bicornis* was increased by Cd concentration and exposure. Results showed that *O. bicornis* was sensitive to cadmium.

Key words: Lethal concentration, acute toxicity, cadmium, *Ophelia bicornis*

Kadmiyumun *Ophelia bicornis* Savigny, 1822 Üzerindeki Akut Toksisitesi

Özet

Ophelia bicornis türünde kadmiyumun akut toksisitesini değerlendirmek için statik biyolojik deneyler ilk kez yapılmıştır. Organizmalar 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle farklı Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. % 95 güven aralığına sahip LC₅₀ değerleri 24, 48, 72 ve 96 saatleri için probit yöntemiyle tahmin edilmiş olup, sırasıyla Grup 1 (15 ve 25 mm boy) için 26 (22,8-29,4), 18 (15-22), 12 (9,1-14,4) ve 7,2 (6,8-7,5) ve Grup 2 (26 ve 36 mm boy) için 28 (24,6-33,8), 24 (22,4-25,5), 18 (16,1-19) ve 8,7 (7,8-9,6) mg/l olarak hesaplanmıştır. Kadmiyum toksisitesi hem konsantrasyon hem de maruz kalma süresine bağlı olarak değişmiştir. LC₅₀ değerleri organizmaların uzunluğu arttıkça arttı. *O. bicornis* bireylerinde mortalite Cd konsantrasyonu ve maruz kalma süresiyle artmıştır. Sonuçlar *O. bicornis* türünün kadmiyuma duyarlı olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Letal konsantrasyon, akut toksisite, kadmiyum, *Ophelia bicornis*

INTRODUCTION

Marine pollution which derived from toxic metals has become a threat to the coastal biota and is one of the matters of concern. These toxic metals are mainly entered the coastal waters from industrial effluent, domestic and agricultural areas and many of these compounds are highly resistant. The ecotoxicological tests with aquatic organisms help to protect the natural environment and people health from contaminants such as heavy metals in the water. The need to protect biota in the water ecosystems from contaminants released into the coastal environment have risen up during last few decades. As a results usage of the many standard methods for determining the acute and chronic toxicity of contaminants including heavy metals has increased. The common methods for assessing the toxicity of contaminants in wastewaters, effluents, water bodies and sediment are bioassays. There are many types of organisms that can be used as bio-indicators to determine the toxicity of chemicals including heavy metals but commonly used of them is with crustaceans and polychaetes (Bat, 2005).

The Marine Strategy Framework Directive (MSFD) necessitates that the European Commission should make criteria and methodological standards to permit consistency in approach in assessing the degree to which Good Environmental Status (GES) is being maintained (Official Journal of the European Union, 2008/56/EC). The concentration of contaminants including heavy metals in the marine environment and their effects need to be assessed taking into account the impacts and threats to the ecosystem.

The polychaetes are commonly used organisms for sediment testing around European seas (Bat, 2005) including the Black Sea (Bat et al., 2014). Literature has recommended polychaetes in ecotoxicological studies (Bat and Raffaelli, 1998; Bat et al., 2001). *Ophelia bicornis* is known to prefer clean habitats in Sinop coasts of the Black Sea (Dagli et al., 2015) and is also sensitive to a broad range of toxic chemicals (Bat et al., 2016). No literature is available concerning the toxicity of heavy metal on *O. bicornis* from the Black Sea coasts.

The polychaetes *O. bicornis* is important links in detritus food chains. The selection of *O. bicornis* has several advantages including its small size, its relatively short life cycle and reproduction, easy to collection and hold in the laboratory conditions and its wide distribution in the habitat. *O. bicornis* has been used as fish bait (Dagli et al., 2005) and is used as bio-indicator species in heavy metal pollution monitoring study (Bat et al., 2016). Cd is one of the most toxic metals for most of the aquatic organisms and human life even at very low concentrations. With this study, *O. bicornis* was first time examined eco-toxicologically.

MATERIALS and METHODS

Test solutions

A stock solution of cadmium was prepared by dissolving of weighted $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ in bi-distilled water and used for the course of this study. Different concentrations of the stock solution were prepared from low values (0 mg Cd/l as control) to high values (64 mg Cd/l) on toxicity test. Preliminary tests were carried out to establish suitable concentration ranges. The stock solution was diluted to the desired concentration before beginning the toxicity tests. Nominal concentrations of $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ were 0 (control), 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 mg/l and were prepared freshly. Test concentrations were made up by serial dilutions of the stock solution with natural sea water which had been previously filtered through a filter (Bat et al., 2018a).

Collection and analysis of sediment

The sediment was taken from the surroundings of *O. bicornis* and was washed through a 0.5 mm mesh sieve into a tank to remove any associated macrofauna and particles. They were then washed again through a mesh sieve 0.5 mm to ensure a standard particle size for the sediment in all experiments. The area is known to be clean and where supported a healthy population of *O. Bicornis* (Bat et al., 2016).

Total organic content, pH, redox potential and water content of sediment samples were determined. Sediment samples for total organic content were dried at 105°C for 24 h. Five grams of dried sample were then treated with hydrochloric acid vapour overnight in a desiccating jar to convert any calcium carbonates to chlorides. Samples were then placed in a muffle furnace at 600°C for 4 hours. The loss ignition was taken as the organic carbon content of the sediment (Buchanan, 1984).

For the pH analysis, 1: 2.5 percent pure water were added to the sediment samples taken in a certain amount and the samples were thoroughly mixed in the water. After 30 min sediments were expected to settle in water, pH was measured by pH meter. Oxidation-reduction (Eh) values were measured with Portable redox meter. In order to determine the water content, dry weight was weighed by drying for 2 days. After cooling, water amount % calculated from weight differences (Bat et al., 2018b).

Test organisms

The used organisms for test are *O. bicornis* (Figure 1) which is deposit feeders. It is broadly distributed in the sediments at Sinop shores of the Black Sea and sampling area was shown in Figure 2. Samples were collected from the area up to 2 m depth by snorkelling.



Figure 1. *Ophelia bicornis*



Figure 2. Sampling area.

The sampled organisms were acclimated for 7 days in 10-l container containing clean seawater and sediment. The seawater used for the experiment was pumped from the natural sea in the surroundings of *O. bicornis* through a filter to avoid water containing suspended particles and organisms smaller than 10 μm . The photoperiod is adjusted to 16-h light and 8-h dark. Acute toxicity tests were carried out in 1 litre jars in the laboratory following static bioassay method. The jars were covered with black plastic bags to prevent the light from coming from the sides except for above. Clean sediment of 5 cm thickness was placed at the bottom of each jar. Required quantity of the chemical was weighed and was added directly to test medium for preparing different concentrations. Then the solution was stirred

with a glass rod carefully for uniformity. All the bioassays carried out during the study were done following the methods outlined in American Society for Testing and Materials (ASTM, 1990 and 1991) and U.S. Environmental Protection Agency and U.S. Army Corps of Engineers (U.S. EPA/COE Manual, 1991). During acclimation and experimental period, the animals were not fed.

Specimens were divided into two groups. Between 15 and 25 mm in length of individuals were formed as Group 1, whereas between 26 and 36 mm in length of them as Group 2. The organisms were exposed to the concentrations for 24, 48, 72 and 96-hr at $17^{\circ}\text{C}\pm 1$. Ten worms were put each jar. The toxicity of the Cd was evaluated by estimation of the LC_{50} value. Mortality was recorded for daily observations. The dead worms were counted and removed immediately after death to avoid decomposition. Dissolved oxygen, pH and temperature were measured twice daily for water quality. Mortality data was used for calculating lethal concentration LC_{50} , 95% confidence interval using probit analysis (Finney, 1971) in SPSS software version 21.

The toxicity test was evaluated to be valid and acceptable if mean control mortality was lower than 10 percent and water quality parameters were maintained within acceptable limits (American Society for Testing and Materials (ASTM, 1990).

The bioassay was conducted with 3 replicates at each concentration and control. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. If ANOVA results were significant, the control and treatment means or procedures were compared by Tukey test to determine which treatment(s) or procedure(s) differed from which (Zar, 1984).

RESULTS and DISCUSSIONS

The average total organic content, pH, redox potential, water content of the sediment at the start of the experiment were $0.81\%\pm 0.05$, 7.92 ± 0.09 , 148 Eh and $24\%\pm 3$, respectively. The average temperature over the experimental period in all tests was $17^{\circ}\text{C}\pm 1$, dissolved oxygen was 7.4 ± 0.5 mg/l, salinity was $17.2\text{‰}\pm 0.3$ and pH was 8.5 ± 0.3 .

There was no mortality in control organisms during the course of toxicity tests, indicating that the holding facilities, seawater, control sediment and handling techniques were acceptable for conducting such toxicity tests, as required in the standard U.S. EPA/COE protocol where mean mortality should be $\leq 10\%$ (U.S. Environmental Protection Agency and U.S. Army Corps of Engineers, 1991).

LC_{50} values for 24, 48, 72 and 96 hours with 95% confidence limits were calculated by the probit methods and were found as 26 (22.8-29.4), 18 (15-22), 12 (9.1-14.4) and 7.2 (6.8-7.5) mg/l for Group 1 and 28 (24.6-33.8), 24 (22.4-25.5), 18 (16.1-19) and 8.7 (7.8-9.6) mg / l for Group 2, respectively (Figure 3). In all bioassays, the rate of *O. bicornis* mortality is increased corresponding to the high toxic concentrations and duration of exposure. No mortality was observed during cadmium exposure poisoning in the first twelve hours in both groups and the movement of the worms were normal. With time in higher Cd concentrations, the worms wrinkled, gradually became brittle and got decomposed. In lower Cd concentrations, mortality of the worms was late. Statistical analysis between mortality rate at different concentrations of Cd at 24, 48, 72 and 96 hours of exposures showed significant relationship ($p < 0.05$). However, there was no significant differences ($p > 0.05$) in mortality rates at 24-hr toxicity test.

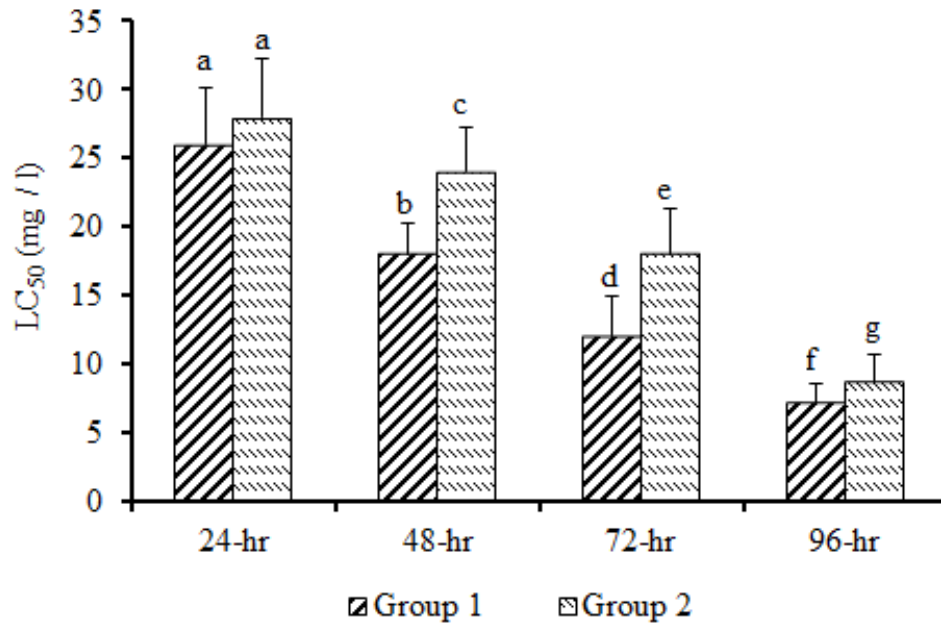


Figure 3. LC₅₀ values with 95% confidence limits of CdCl₂.2½H₂O in seawater with clean sediment to *O. bicornis* for two sizes at 24, 48, 72 and 96-hrs of exposure. a, b, c, d, e, f, g= The same letters beside the vertical bars in graph indicate the values are not significantly different ($p > 0.05$)

The acute toxicity of cadmium to *O. bicornis* was dependent on both the concentrations and exposure times (Figure 4 and 5). Toxicity of Cd decreased with increase in the length of *O. bicornis*. On the other hand LC₅₀ increased with increasing the length of organisms. It may be suggested that metabolic activity of *O. bicornis* played an important role in metal toxicity. Because metabolism of younger individuals is normally higher than that of older individuals thus, Cd toxicity is higher in younger individuals than the older ones. It means that, if Cd levels in water get higher with time it may be seen low metal toxicity owing to growth and lowered metabolic activity in older specimens. This trend indicates that smaller individuals of *O. bicornis* are more sensitive to Cd and hence have a greater toxic to them than larger species. The larger organisms may be developed a protective defence against the deleterious effects of Cd that produce degenerative changes like oxidative stress in the body. This tendency seems to specify that as smaller species in aquatic ecosystem, the sensitivity to heavy metals toxicity increases. In the study of Mendez and Green-Ruiz (2006) that supported this, the larvae of the polychaete *Capitella* sp. showed high sensitivity to Cd.

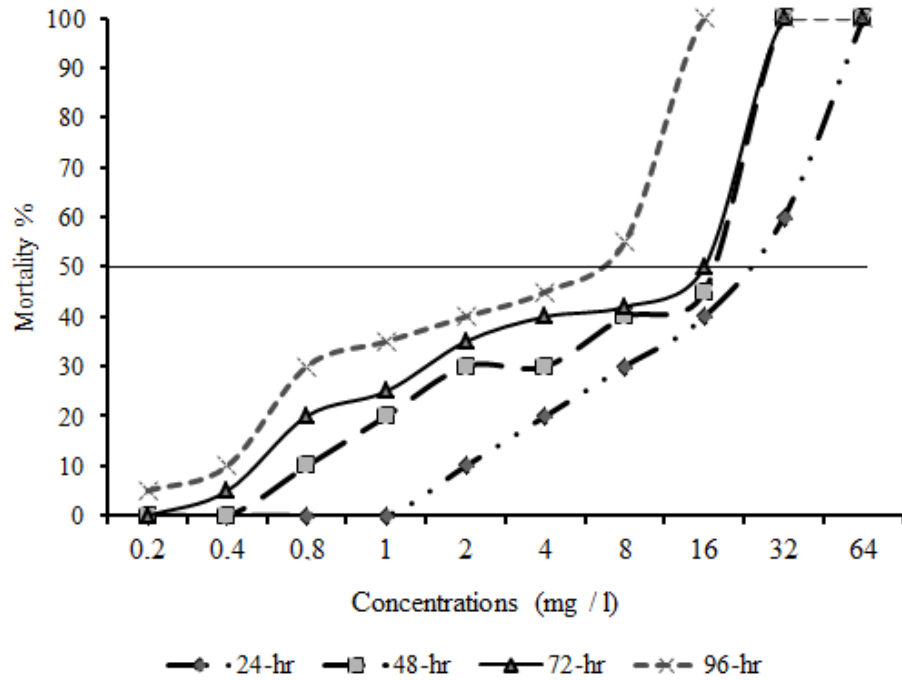


Figure 4. Relations between the percent mortality of *O. bicornis* for Group 1 (15-25 mm in length) at different concentrations and exposure times.

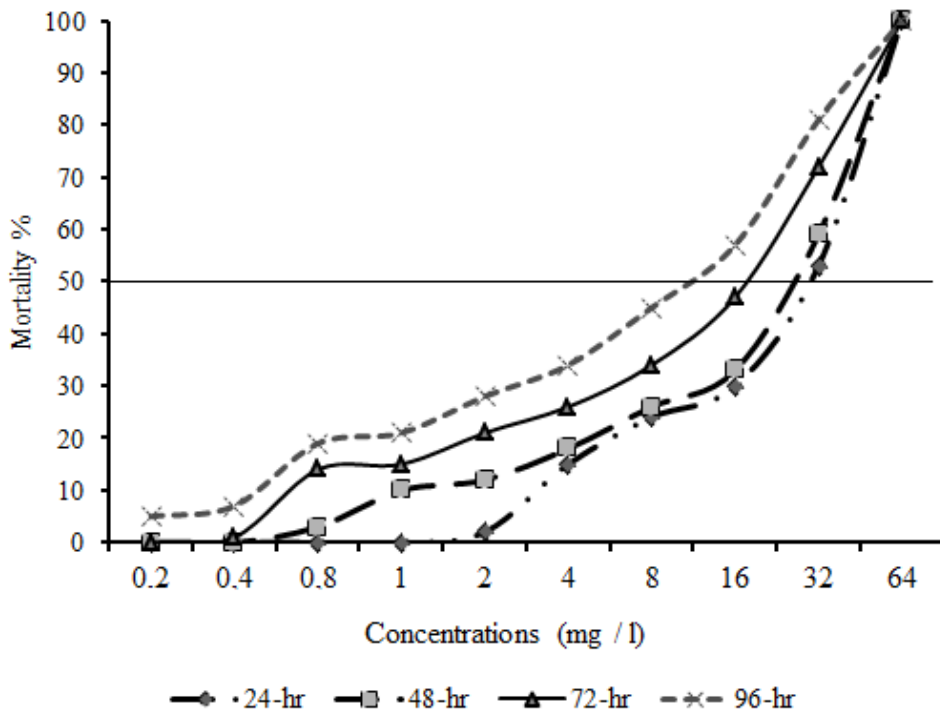


Figure 5. Relations between the percent mortality of *O. bicornis* for Group 2 (26-36 mm in length) at different concentrations and exposure times.

These findings were in agreement with Bat et al. (2001) who study on the toxicity of zinc and lead in water with sediment was made to identify to tolerance limit of the hazardous substances to the polychaete worm *Hediste diversicolor*. It was found that small worms are more sensitive to Zn and Pb than bigger worms. Bat et al. (2017) showed that Cd was highly toxic to larvae of Baltic prawn *Palaemon adspersus*. Similarly, in another study of Reish et al. (1976) 96-hr LC₅₀ of Cd was 7.5 ppm

for adult polychaetes *Capitella capitata* and 0.22 ppm for trochophore larvae. Ray and McLeese (1983) also found Cd levels in polychaetes *Nereis virens* increased with increasing Cd levels in sediment. Smaller *N. virens* accumulated higher Cd levels (per unit wt.) and at a greater rate than larger worms. Bryan and Hummerstone (1973) found that Zn was regulated by the worm *Nereis diversicolor*, whereas Cd was not, in laboratory, rising concentrations in solution the rate of absorption of Cd rises more quickly than that of Zn. In the field, Zn levels in the worm *N. diversicolor* vary less than Cd and populations from high-Zn sediments are better at regulating Zn than normal populations and *N. diversicolor* more resistant to Zn than normal ones.

On contrary Bat et al. (2013) studied the acute toxic effects of copper, lead and zinc in seawater on the survival of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. They found that the 96-h LC₅₀ values for the medium and larger mussels were lower than that of the smaller individuals. It is concluded that smaller individuals were more tolerant to metals than bigger sizes. Further bioassays are needed to evaluate such trends for much smaller sizes or other small benthic organisms.

Comparison of polychaete LC₅₀ results involving Cd exposures in water are given in Table 1.

Table 1. Comparison of polychaete LC₅₀ results involving Cd exposures in water.

Species	Time (hr)	Cd-LC ₅₀ (ppm)	References
<i>Capitella capitata</i>	96	7.5 for adults; 0.22 for trochophore larvae	Reish et al., 1976
<i>Capitella capitata</i>	96	0.6-1	Reish et al. 1983
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	96	12 for adults; 12.5 for juveniles	Reish et al., 1976
<i>Neanthes vaali</i>	168	6.4	Ahsanullah, 1976
<i>Nereis virens</i>	24,48,96	25, 25, 11	Eisler, 1971
<i>Nereis virens</i>	24,96,168	56, 9.3, 0.7	Eisler and Hennekey 1977
<i>Laeonereis acuta</i>	96	8.2349	Carricavur et al., 2018
<i>Perinereis aibuhitensis</i>	96	0.7934–13.5673	Wang et al., 2008
<i>Ophrgotrocha labronica</i>	48	4	Røed, 1980

The results of the present study in agreement with Reish et al. (1976), Eisler and Hennekey (1977), Wang et al. (2008) and Carricavur et al. (2018) who found similar LC₅₀ values for 96-hr for the polychaetes *C. capitata*, *Nereis virens*, *Perinereis aibuhitensis* and *Laeonereis acuta*. In the present study 24 and 48-hrs LC₅₀ values were also similar to *Nereis virens* (Eisler, 1971). On the other hand *Ophrgotrocha labronica* (Roed, 1980) was the most sensitive organisms when compared with *O. bicornis* and *N. virens* (see Table 1).

In general, the use of bioassays to straight measurement of toxicity of contaminants is a correct and reliable method to detect its effect. Here, the toxicity of Cd on *O. bicornis* by static method has been studied. The results provide baseline information in formulating strategy for controlled release of treated industrial effluents into the receiving water bodies. The estimated LC₅₀ values for Cd with nominal concentrations for the *O. bicornis* show that Cd is toxic to this species. For application of toxicity data in control of wastewater discharges and estimate of environmental affects both acute and chronic toxic levels have to be determined to protect ecosystem.

CONCLUSION

The polychaete worm (*O. bicornis*) was used as the test organism for the static bioassay method. The worms were exposed up to 96-hr to Cd concentrations ranging from 6.6 to 8.1 mg/l in seawater with clean sediment. As heavy metals including cadmium binds to sediments and gradually becomes

available to the bottom dwelling organisms, *O. bicornis* was selected as the test organism in the present study. *O. bicornis* is a primary consumer of the detritus-based food chain of marine coastal areas. It feeds on organic matter, particles of detritus, algae and other microorganisms, indicating that it plays a major role in the biomagnification of toxic heavy metals from bottom sediments to the higher trophic levels. In conclusion, *O. bicornis* is sensitive to cadmium than other many polychaetes (Bat, 2005).

REFERENCES

- Ahsanullah, M. (1976). Acute toxicity of cadmium and zinc to seven invertebrate species from Western Port, Victoria. *Marine and Freshwater Research*, 27(2),187. doi:10.1071/mf9760187
- American Society for Testing and Materials (1990). Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. ASTM E 1367-90. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA, pp. 1-24.
- American Society for Testing and Materials (1991). Standard guide for collecting, storage, characterization and manipulation of sediments for toxicological testing. ASTM E 1391-90. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA, pp. 1105-1119.
- Bat, L. (2005). A review of sediment toxicity bioassays using the amphipods and polychaetes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 5,119-139.
- Bat, L., & Raffaelli, D. (1998). Sediment toxicity testing: A bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226, 217-239.
- Bat, L., Gündoğdu, A., Akbulut, M., Çulha, M., & Satılmış, H.H. (2001). Toxicity of zinc and lead to the polychaete worm *Hediste diversicolor*. *Turkish Journal of Marine Sciences*, 7, 71-84.
- Bat, L., Üstün, F., Gökkurt Baki, O., & Şahin, F. (2013). Effects of some heavy metals on the sizes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22 (7), 1933-1938.
- Bat, L., Arici, E., Öztekin, A., & Yardim, Ö. (2016). A preliminary study of the heavy metal levels in *Ophelia bicornis* (Savigny, 1820) in the Black Sea. *Pakistan Journal of Marine Sciences*, 25(1-2), 93-100.
- Bat, L., Bilgin, S., & Öztekin, A. (2017). Toxicity of cadmium on larvae of *Palaemon adspersus* Rathke, 1837 from the Black Sea. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(9), 375-378. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J7-118>.
- Bat L, Şahin F., & Öztekin A. (2018a). Acute toxicity of heavy metals to *Hyale crassipes* (Heller, 1866) in the Black Sea. *Pakistan Journal of Marine Sciences*, 26(2), 01-07.
- Bat L, Şahin F., & Öztekin A. (2018b). Toxic metals in *Nereis diversicolor* Müller, 1776 from inner shores in Sinop peninsula of the Black Sea as bio-indicator species. *Pakistan Journal of Marine Sciences*, 26(1), 11-20.
- Bryan, G.W., & Hummerstone, L.G. (1973). Adaptation of the Polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 53, 839-857.
- Buchanan, J.B. (1984). Sediment analysis. In: N.A. Holme and A.D. McIntyre (Eds.), *Methods for the Study of Marine Benthos*. Blackwell Sci. Publ., pp. 41-65.
- Carricavur, A. D., Boudet, L. C., Romero, M. B., Polizzi, P., Marcovecchio, J. E., & Gerpe, M. (2018). Toxicological responses of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute, subchronic and chronic exposure to cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 217-224.
- Dagli, E., Ergen Z., & Çınar, M.E. (2005). One-year observation on the population structure of *Diopatra neapolitana*, Delle Chiaje (Polychaeta: Onuphidae) in Izmir Bay (Aegean Sea, eastern Mediterranean). *Marine Ecology*, 26, 265-272. doi:10.1111/j.1439-0485.2005.00055.
- Dagli, E., Kurt Şahin, G., Sezgin, M., & Cengiz, Z. (2015). First Record of *Ophelia bicornis* Savigny in Lamarck, 1818 (Polychaeta: Opheliidae) from the Turkish Coast of the Black Sea (Sinop Peninsula) with Ecological Features. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 625-632. doi: 10.4194/1303-2712-v15_3_06.
- Eisler, R. (1971). Cadmium Poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and other Marine Organisms. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28 (9), 1225–1234. doi:10.1139/f71-188.
- Eisler, R., & Hennekey, R. J. (1977). Acute toxicities of Cd²⁺, Cr⁶⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ to estuarine macrofauna. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 6(1), 315-323.
- Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*.3. edition. Cambridge University Press London.
- Official Journal of the European Union. Directive 2008/56/Ec of The European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). L 164 (2008) 19-40.

- Ray, S., & McLeese, D.W. (1983). Factors affecting uptake of cadmium and other metals from marine sediments by some bottom-dwelling marine invertebrates. In: D.R. Kester, B.H. Ketchum, I.W. Duedall and P.K. Park (Eds.). *Wastes in the ocean, Dredged-material disposal in the ocean*, 2, 185-197.
- Reish, D.J., Martin, J.M., Piltz, P.M., & Word, J.Q. (1976). The effect of heavy metals on laboratory populations of two polychaetes with comparisons to the water quality conditions and standards in Southern California marine waters. *Water Research*, 10, 299-302.
- Reish, D. J., Baoling, W., Zhengang, F., & Peiyuan, Q. (1983). The effect of cadmium and chromium on two populations of the polychaetous annelid *Capitella capitata*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1(3), 337-341.
- Røed, K. H. (1980). Effects of salinity and cadmium interaction on reproduction and growth during three successive generations of *Ophryotrocha labronica* (Polychaeta). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33(1), 47.
- U.S. Environmental Protection Agency and U.S. Army Corps of Engineers (1991). Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal. Testing manual. EPA-503/8-91/001, Washington, DC.
- Wang, J., Zhou, Q., Zhang, Q., & Zhang, Y. (2008). Single and joint effects of petroleum hydrocarbons and cadmium on the polychaete *Perinereis aibuhitensis* Grube. *Journal of Environmental Sciences*, 20(1), 68–74. doi:10.1016/s1001-0742(08)60010-8
- Zar, J.H. (1984). *Biostatistical analysis*. Second edition. Prentice Hall, Int., New Jersey.

Antalya, Rize ve Yalova Kıyı Sularından Örneklenen Karides Türlerinin (*Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)) Metal İçeriklerinin Değerlendirilmesi

Tuba YAĞCIⁱⁿ

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bilecik.

Sorumlu Yazar: tuba.yagci@bilecik.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 17 Ocak 2019; Kabul 01 Nisan 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Yağcı, T. (2019). Antalya, Rize ve Yalova kıyı sularından örneklenen karides türlerinin (*Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)) metal içeriklerinin değerlendirilmesi. *Acta Aequatica Turcica*, 15(3), 298-306. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.514050>

Özet

Bu çalışmada Akdeniz'in Antalya kıyısı, Karadeniz'in Rize kıyısı ve Marmara'nın Yalova kıyısından örneklenen karides türlerinin (sırasıyla; *Aristeus antennatus*, *Palaemon adspersus*, *Parapenaeus longirostris*) kas dokularında kadmiyum (Cd), bakır (Cu), çinko (Zn) ve nikel (Ni) ağır metal konsantrasyonları tespit edilmiştir. Atomik Absorpsiyon Spektrometre (AAS) cihazı kullanılarak ölçüm işleri gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen ağır metal içeriklerine göre hesaplanan metal kirlilik indeksi (MPI) ile günlük ve haftalık alım değerleri bölge kirliliği ve insan sağlığı açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ulusal-uluslararası limit değerler ve uluslararası tüketilebilir ve standart değerler ile karşılaştırılmıştır. Cd'nin en yüksek konsantrasyonu *P. adspersus* ve *P. longirostris*'de, Cu konsantrasyonu ise en yüksek *P. adspersus*'da kaydedilmiştir. Ni içeriğinin yalnızca *A. antennatus*'da olmasına karşın, Zn konsantrasyonu sırasıyla en yüksek *P. adspersus*, *P. longirostris* ve *A. antennatus*'da kaydedilmiştir. Sonuç olarak, Cd seviyeleri Marmara Denizi ve Karadeniz'den alınan örneklerde maksimum kabul edilebilir sınırların üzerinde bulunmuştur. Ayrıca Marmara Denizi ve Karadeniz'den alınan örneklerin metal kirlilik indeksleri limit değer (1<MPI) üzerinde bulunmuştur. Metal seviyeleri insan sağlığı açısından değerlendirildiğinde tüketiciler için risk oluşturmamaktadır.

Anahtar kelimeler: Metal kirliliği, biyomonitor, karides, akuatik ekosistem.

The Evaluation of Heavy Metal Content in Shrimp Species (*Aristeus antennatus* (Risso, 1816), *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837), *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)) Sampled from the Antalya, Rize and Yalova Coastal Ecosystems

Abstract

In this study, the cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn) and nickel (Ni) heavy metal concentrations in the muscle tissues of three shrimp species (respectively; *Aristeus antennatus*, *Palaemon adspersus*, *Parapenaeus longirostris*) were determined. The organisms were collected from the Antalya coast of the Mediterranean Sea, Rize coast of the Black Sea, and from the Yalova coast of the Marmara Sea and Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) instrument were used for measurement. The metal pollution index (MPI) was calculated based on the detected heavy metal content, and the daily and weekly intake values were evaluated in terms of regional pollution and human health. The results were compared with the national-international limit values and international consumed and standart values. The highest concentration of Cd was detected in *P. adspersus* and *P. longirostris*, while the Cu concentration was highest in *P. adspersus*. Although the Ni content was recorded only in *A. antennatus*, Zn concentration was highest in *P. adspersus*, *P. longirostris*, and *A. antennatus*, respectively. The Cd levels were above the maximum acceptable limits in the samples taken from Marmara Sea and the Black Sea. In addition, the MPI of samples taken from Marmara Sea and the Black Sea was found to be above the limit value (1<MPI). In terms of human health, the metal levels do not pose any risk to consumers.

Keywords: Metal pollution, biomonitoring, shrimp, aquatic ecosystem.

GİRİŞ

Karidesler, Krustase sınıfına dahil olup, Decapoda takımında yer almaktadır (Kocataş vd., 1991). Türkiye'nin sahip olduğu Karadeniz ve Akdeniz ile bu ekosistemleri birbirine bağlayan İstanbul, Çanakkale ve Marmara Denizi'nden oluşan Türk Boğazlar Sistemi'nde şimdiye kadar Krustase'lerin yaklaşık 244 türü tanımlanmıştır. Bu türlerin arasında 84'ü karides faunasına aittir (Kocataş ve Katağan 2003; Ateş vd., 2010). Karideslerin içerdiği yüksek protein miktarı nedeniyle pek çok ülkede denizel besin kaynağı olarak tüketilmektedir. *Palaemon adspersus* Rathke, (1837); Avrupa Atlantik kıyıları, Baltık Denizi, Akdeniz kıyıları, Karadeniz ve Hazar Denizi'nde, *Palaemon longirostris* Lucas, (1846); Avrupa Atlantik kıyısı, Baltık denizi ve Akdeniz'de, *Aristeus antennatus* Risso, (1816); Kuzey Adriyatik Denizi, Hint Okyanusu, Doğu Atlantik'in Orta bölgesi, Brezilya'nın kuzey kıyıları ve Akdeniz'de yayılış gösteren ekonomik türler arasında yer almaktadır (Sezgin vd., 2007; Marra vd., 2005). Ticari önemlerinin yanı sıra ağır metal indikatörleri olarak sıklıkla kullanılan karidesler, ekolojik olarak da oldukça önemlidir (Baboli ve Velayatzadeh, 2013).

Akuatik çevrelerde ağır metal ve iz elementlerin seviyeleri sanayi, madencilik ve tarımsal faaliyetler gibi insan aktiviteleri ile artarak kirliliğe neden olmaktadır. Metal birikimi besin zinciri vasıtasıyla akuatik canlıların organlarında çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (Heath, 1987; Kalay ve Canlı 2000). Bu nedenle akuatik organizmalar buldukları çevrede kirliliğin biyolojik olarak en iyi şekilde izlenmesine imkân sağlar (Schüürman ve Markert 1998; Velayatzadeh vd., 2014). Akuatik organizmalarda Cd (kadmium) biyobirikimi çok düşük seviyede bile zararlıdır. Bununla birlikte metabolik faaliyetler için gerekli fakat düşük miktarlarda ve sürekli tüketildiğinde toksik olan Cu (Bakır), Zn (Çinko), Ni (Nikel) gibi metallerin maksimum sınır değerlerine ulaşması hem insan sağlığı hem de çevre kirliliği için endişe uyandırmaktadır (Rainbow ve White 1989; Pourang vd., 2005; Çelik ve Oehlschläger 2007). Ekotoksikolojik araştırmalar sahil ve iç kesimlerde bulunan su ortamlarında metal kirliliğinin hızlı bir şekilde arttığını bildirmektedir (Burrige vd., 1999; Kimbrough vd., 2008). Türkiye'nin Karadeniz kıyıları artan sanayileşmeden, Marmara Denizi kıyıları ise kentsel atık sular, tarım, ulaşım gibi faaliyetler ve Karadeniz'den gelen kirlilikten olumsuz etkilenmektedir (Balkıs ve Çağatay 2001; Altas ve Büyükgüngör 2007). Antalya Körfezi'nde deniz ürünlerinin metal içerikleri ile ilgili yapılan araştırmalar Akdeniz kıyı sularında henüz metal kirliliği tehlikesinin olmadığını belirtmektedir. Fakat bölgede uluslararası taşımacılık, kentleşme ve turizmin yaygın olması metal kirliliği riskini artırmaktadır (Yazkan, 2002; Kayhan vd., 2010). Tüm canlıları tehdit eden bu kirliliğin oluşturduğu ekolojik hasar, izlenmesi ve önlem alınması gereken çok ciddi bir problemdir. Biyomonitör organizmalar, metali depolayarak sulardaki seviyesinin zamana dayalı ölçümünü sağlayan, çevre kirleticileri için erken belirleyici indikatörlerdir (Rainbow, 1993).

Bu araştırmada Karadeniz, Marmara Denizi ve Akdeniz kıyılarının metal kirliliği durumunun izlenmesi için yapılan araştırmalara katkı sağlamak amacıyla örneklendirilen karides türlerinde (sırasıyla, *P. adspersus*, *P. longirostris* ve *A. antennatus*) Cd, Cu, Zn, Ni metallerinin konsantrasyonları incelenmiştir. Sonuçlar daha önceki veriler ve ulusal-uluslararası tolere edilebilir üst limitler ile karşılaştırılmıştır (TGK, 2001, 2011; FAO, 1983). Ayrıca örneklerin alındığı lokalitelerin kirlilik durumunun tanımlanmasında metal kirlilik indeksleri (MPI) kullanılmıştır. Metal analizi yapılan karides türlerinin biyomonitör özelliklerinin anlaşılabilmesi için her bir türe ait ortalama metal içerikleri arasındaki farklar incelenmiştir. Metal seviyelerinin insan sağlığı açısından kabul edilebilir sınırlarda olup olmadığı günlük ve haftalık alımlar hesaplanarak, Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün önerdiği geçici kabul edilebilir günlük (PTDI) ve haftalık (PTWI) standart değerlerle belirlenmiştir (FAO,WHO, 2004; FAO, 2014).

MATERYAL VE METOT

Örneklerin metal analizi

Örnekler 2017 yılında, Nisan-Mayıs aylarında *P. adspersus* Rize (Doğu Karadeniz Kıyısı), *A. antennatus* Antalya (Akdeniz Kıyısı) ve *P. longirostris* Yalova (Marmara Denizi kıyısı)'da bölge balıkçılarından temin edilmiştir (Şekil 1). Metal analizi için örneklerin kas dokusu türe göre etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Her tür için en az 15 birey olmak üzere kas dokusundan alınan örnekler 105 °C'de kurutulmuştur. Kurutulan örnekler porselen havanda ezilerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Homojenize edilen örneklerden 0,5 gr alınarak 5 ml (% 65'lik) nitrik

asitle karıştırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 100 °C’de 4 saat asitle yakma işlemi uygulanmıştır. Yakılmış örnekler tekrar oda sıcaklığında bekletilerek filtre edilmiş ve süzülmüştür. Süzülen örnekler deiyonize su ile 25 ml’ye tamamlanarak çözeltinin şeffaflaştırılması sağlanmıştır (Çağlak ve Karşlı 2014).



Şekil 1. Karides örneklerinin alındığı lokaliteler

Hazırlanan dilüsyonda tayin edilmek istenen Cd, Cu, Ni ve Zn elementleri için Atomik absorpsiyon spektrometre (AAS) cihazında (Perkin-Elmer 1100B) metal stok çözeltisinden hazırlanan standartlar (Merck) ile kalibrasyon sağlanmıştır. Her bir örnek çözelti içindeki metal miktarı, absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin 3’er kez okutulması ile oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden belirlenmiştir. Türler arasında metal konsantrasyon farklarının istatistiksel olarak değerlendirilebilmesi için IBM SPSS Versiyon 24.0 istatistik paket programı, tek yönlü varyans analizi kullanılarak ortalama ve standart sapma hesaplanmıştır (Tablo 1). Ortalama değerler arasındaki farklar $P < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca farklı türlerde tespit edilen toplam metal içeriğini karşılaştırmak ve bölgelerin kirlilik durumlarının anlaşılabilmesi için metal kirlilik indeksi (MPI) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Shue vd., 2014). MPI değeri 1’den fazla ise kirlilik olduğuna, 1’den az ise herhangi bir kirliliğin olmadığına işaret etmektedir (Rakocevic vd., 2018).

$$MPI = (Cf1 \times Cf2 \times \dots \times Cfn)^{1/n}$$

Cfn: Metal konsantrasyonu

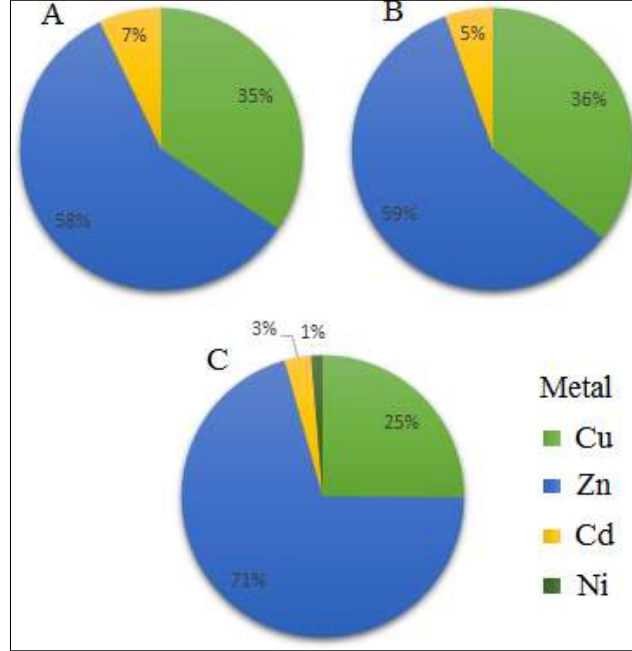
n: örnek sayısı

Araştırmada analizi yapılan türlerin balıkçılar tarafından satışa sunulan ve insanlar tarafından tüketilen türler olması nedeniyle insan sağlığı açısından öneminin anlaşılabilmesi için günlük ve haftalık tüketim değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar 70 kg ağırlığında olan bir kişinin günlük ortalama balık tüketiminin 15 gr olduğu varsayılarak yapılmıştır (Korkmaz ve Çolakfakıoğlu, 2016). Tespit edilen metal seviyeleri kilogram başına günlük tüketime izin verilen standart değerler ile karşılaştırılarak Tablo 2’de sunulmuştur.

BULGULAR

Karideslere ait üç farklı türde toplam metal seviyelerinin ortalamasına göre en yüksek konsantrasyon sırasıyla *P. adspersus* (Karadeniz), *P. longirostris* (Marmara Denizi) ve *A. antennatus*’da (Akdeniz) tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Cu en yüksek konsantrasyonda *P. adspersus* > *P. longirostris* > *A. antennatus* olmak üzere 5,87 mg/kg, 4,49 mg/kg, 2,48 mg/kg olarak kaydedilmiştir. Zn’ nin ise en yüksek konsantrasyonu *P. adspersus* (9,58 mg/kg), en düşük konsantrasyonu *A. antennatus* (6,94 mg/kg) türünde bulunmuştur. Analizi yapılan metaller arasında en toksik olan Cd konsantrasyonları *P. adspersus* ve *P. longirostris*’de birbirine çok yakın ve sınır değerlerin üzerindedir

(0,93-0,90 mg/kg). *A. antennatus*'da ise Cd ve Ni içeriği en düşük seviyededir (0,30, 0,13). *P. adspersus* ve *P. longirostris* türlerinde ise Ni konsantrasyonu yoktur (Şekil 2). Türk Gıda Kodeksi ve Gıda ve Tarım Örgütü'nün deniz canlılarındaki kabul edilebilir ağır metal konsantrasyon verileri bu araştırmadaki değerler ile karşılaştırıldığında, Cd dışında araştırılan diğer metaller kabul edilebilir standart değerlerin altındadır (Tablo 1).



Şekil 2. Toplam metal konsantrasyonlarının türlere göre dağılımı (A: *P. longirostris*, B: *P. adspersus*, C: *A. antennatus*)

Tablo 1. Karides türlerinin kas dokusunda tespit edilen metal konsantrasyonlarının karşılaştırılması (ortalama konsantrasyon ± standart sapma, nd: tespit edilemeyen değer (null)).

Tür	Metal	Yıl	Bölge	Metal düzeyi	Referans	FAO mg/kg	TGK mg/kg
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Cu	2007	Marmara Denizi	24,50±3,850 mg/kg	Kurun vd., 2007	30	20
		2008	Antalya/Akdeniz	1,33 ± 0,007 mg/kg	Gökoğlu vd., 2008		
		2009	Kuzey Doğu Akdeniz	2,2±0,672 mg/kg	Öksüz vd., 2009		
		2009	Marmara Denizi	5,19-7,60 mg/kg	Özden, 2010		
		2014	Tekirdağ/Marmara	25,48±0,3 mg/kg	Dökmeci vd., 2014		
		2017	Yalova /Marmara	4,49 ± 0,55 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Zn	2007	Marmara Denizi	40,42±11,24 mg/kg	Kurun vd., 2007	30	50
		2008	Antalya/Akdeniz	14,57 ± 3,57 mg/kg	Gökoğlu vd., 2008		
		2009	Kuzey Doğu Akdeniz	6,1± 0,472 mg/kg	Öksüz vd., 2009		
		2009	Marmara Denizi	11,090-17,707 mg/kg	Özden, 2010		
		2014	Tekirdağ/Marmara	22,4±24,4 mg/kg	Dökmeci vd., 2014		
		2017	Yalova /Marmara	7.58 ± 1.66 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Cd	2007	Marmara Denizi	0,77±0,31 mg/kg	Kurun vd., 2007	0,05	0,05
		2008	Antalya/Akdeniz	0.23 ± 0,03 mg/kg	Gökoğlu vd., 2008		
		2009	Kuzey Doğu Akdeniz	0,784±0,081 mg/kg	Öksüz vd., 2009		
		2009	Marmara Denizi	0,007-0,098 mg/kg	Özden, 2010		
		2014	Tekirdağ/Marmara	0,106±0,01 mg/kg	Dökmeci vd., 2014		
		2017	Yalova /Marmara	0,93 ± 0,32 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Ni	2007	Marmara Denizi	4,27±2,78 mg/kg	Kurun vd., 2007	-	-
		2009	Marmara Denizi	0,316-0,507 mg/kg	Özden, 2010		
		2014	Tekirdağ/Marmara	19,25±7,1 mg/kg	Dökmeci vd., 2014		
2017		Yalova /Marmara	nd	Araştırma sonucu			

<i>Palaemon adspersus</i>	Cu	2007	Marmara Denizi/Kuzey	38,65±6,56 mg/kg	Kurun vd., 2007	30	20
		2017	Rize/Karadeniz	5,87 ± 0,53 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Zn	2007	Marmara Denizi/Kuzey	44±18,86 mg/kg	Kurun vd., 2007	30	50
		2017	Rize/Karadeniz	9,58 ± 0,77 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Cd	2007	Marmara Denizi/Kuzey	0,66±0,39 mg/kg	Kurun vd., 2007	0,05	0,05
		2017	Rize/Karadeniz	0,9 ± 0,31 mg/kg	Araştırma sonucu		
Ni	2007	Marmara Denizi/Kuzey	4,70±1,64 mg/kg	Kurun vd., 2007	-	-	
	2017	Rize/Karadeniz	nd	Araştırma sonucu			
<i>Aristeus antennatus</i>	Cu	2015	Akdeniz	2,099±0,01mg/kg	Olgunoğlu, 2015	30	20
		2017	Akdeniz/Antalya	2,48±0,27 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Zn	2015	Akdeniz	9,953±0,10 mg/kg	Olgunoğlu, 2015	30	50
		2017	Akdeniz/Antalya	6,94 ± 0,76 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Cd	2015	Akdeniz	nd	Olgunoğlu, 2015	0,05	0,05
		2017	Akdeniz/Antalya	0,3 ± 0,25 mg/kg	Araştırma sonucu		
	Ni	2015	Akdeniz	nd	Olgunoğlu, 2015	-	-
		2017	Akdeniz/Antalya	0,13 ± 0,10 mg/kg	Araştırma sonucu		

Ayrıca farklı karides türleri arasındaki metal kirliliğinin önem derecesi metal kirlilik indekslerine göre *P. adspersus* ve *P. longirostris*'de sırasıyla; 3,1, 3,6 ($1 < \text{MPI}$) olarak, *A. antennatus*'da ise 0,9 ($1 > \text{MPI}$) olarak hesaplanmıştır. Karadeniz ve Marmara Denizi kıyılarından örneklendirilen türlerin metal kirlilik indeks değerlerinin 1 kritik değerinin üzerinde olması bu bölgelerde kirliliğin varlığına işaret etmektedir. Akdeniz bölgesinden örneklenen tür için hesaplanan MPI değerine göre bölgede endişe verici bir kirliliğin olmadığı kanısına varılmıştır. Metal konsantrasyonları belirlenen karides türlerinin Antalya, Rize ve Yalova'da insanlar tarafından tüketilmesi nedeniyle içerdikleri metal konsantrasyonlarına bağlı olarak, günlük ve haftalık alım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Cu, Zn, Cd ve Ni içeriklerinin tolere edilebilir günlük ve haftalık limitlerin oldukça altında olduğunu ve tüketiciler açısından sorun teşkil etmediğini göstermiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Karides türlerinde hesaplanan haftalık alım değerleri (HHA) ve günlük alım değerleri (HGA) ile tolere edilebilir standart haftalık (THA) ve günlük (TGA) alım değerlerinin karşılaştırılması

Metal	THA ¹	THA ²	TGA ³	HHA – HGA (<i>P.longirostris</i>)	HHA - HGA (<i>P.adspersus</i>)	HHA - HGA (<i>A. antennatus</i>)
Cu	3500 ^a	245000	35000	471,4-67,3	616,3-88	260,4-37,2
Zn	7000 ^a	490000	70000	795,9-113,7	1005,9-143,7	728,7- 104,1
Cd	7 ^a	490	70	97,6-13,9	94,5-13,5	31,5-4,5
Ni	35 ^b	2450	350 ^c	-	-	13,6-1,9

¹ THA, Tolere edilebilir haftalık alım ($\mu\text{g}/\text{hafta}/\text{kg}$ vücut ağırlığı),

² THA, 70 kg ağırlığında yetişkin bir kişi için ($\mu\text{g}/\text{hafta}/70$ kg vücut ağırlığı),

³ TGA, tolere edilebilir günlük alım ($\mu\text{g}/\text{gün}/70$ kg vücut ağırlığı),

^a (FAO/WHO, 2004),

^b Bir hafta için hesaplanan değer ($\mu\text{g}/\text{hafta}/\text{kg}$ vücut ağırlığı),

^c WHO, (2014) 1 kg vücut ağırlığı için günlük 5 μg 'lık bir TGA önermektedir. (70 kg ağırlığındaki bir kişi için 350 μg),

HHA, Bu çalışmada hesaplanan haftalık alım değeri ($\mu\text{g}/\text{hafta}/70$ kg vücut ağırlığı),

HGA, Bu çalışmada hesaplanan günlük alım değeri ($\mu\text{g}/\text{hafta}/70$ kg vücut ağırlığı).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ekosistemlerde geniş ölçüde dağılım gösteren kurşun (Pb), civa (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi esansiyel olmayan ağır metaller ile çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi esansiyel elementlere belirli konsantrasyonlarda maruziyet tüm canlılarda toksik etkiler oluşturabilmektedir (Benavides vd., 2005). Ağır metallerin hayvanlar ve insanlar üzerindeki en önemli zararlı etkisi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktır. Süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^\cdot) hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif türler sürekli olarak biyolojik sistemlerde, normal oksidatif metabolizma sırasında düşük seviyelerde üretilmektedir (Sanchez-Chardi vd., 2007). Fakat ağır metaller gibi kimyasal maddelere maruz kalma nedeniyle artan serbest radikal oluşumu oksidatif strese neden olarak hücrelerde DNA, lipid ve proteinlerde zararlı etkiler oluşturmakta ve bunun sonucu olarak, enzimler ve diğer önemli

makromoleküllerin fonksiyonları değişmektedir (Viegas-Crespo vd., 2003). İnsan ve çevre sağlığını olumsuz etkileyen kıyı sularının kirlilik durumunun belirlenmesi için farklı bölgelerden çeşitli karides türlerinin biyomonitör özelliklerini inceleyen, organizmaların metal içeriklerini konu alan birçok araştırma mevcuttur. Tür, eşey ve dokulara göre karideslerde metal içeriklerinin değişkenlik göstermesi nedeniyle bu çalışmada aynı tür ve kas dokusunda tespit edilen metal konsantrasyonları üzerinde durulmuştur.

Sucul ekosistemlerle ilgili olan araştırmaların çoğu, dar bir boğazla birbirine bağlı Marmara Denizi ve Karadeniz’de kirliliğin önemli derecede arttığını belirtmektedir. İç denizlerin doğal süreçlerle kendi kendini temizleme potansiyeli olmasına karşın antropojenik aktivite nedeniyle bu süreç zorlaşmaktadır (Taşdemir, 2002; Ökmen, 2011). Marmara Denizi’nde biyomonitör olarak kullanılan üç türün (*P. adspersus*, *P. serratus*, *P.s longirostris*) ağır metal birikimi incelenmiştir. Araştırmacılar, Cu içeriğini *P. longirostris* dışındaki tüm örneklerde, Cd içeriğini *P. adspersus* dışındaki tüm örneklerde, Zn içeriğinin ise sadece bir lokalitede eşik değerlerin oldukça üstünde olduğunu tespit etmişlerdir (Kurun vd., 2007). Marmara Denizi’nde yapılan başka bir çalışmada ise *P. longirostris* örneklerinde makromineral ve mikromineral konsantrasyonları araştırılmıştır. Bu minerallerden Cd için ortalama olarak 0,007–0,098 mg/kg, Cu için 5,194–7,600 mg/kg, Zn için 11,090–17,707 mg/kg, Ni için 0,316–0,507 mg/kg değerleri kaydedilmiştir (Özden, 2010). Marmara Denizi’nin kıyısında yer alan Tekirdağ kıyısındaki *P. longirostris* türüne ait örneklerde, Cu seviyesinin (25,48±0,3 mg/kg) maksimum limitlerin üstünde bulunduğu belirtilmiştir (Dökmeci vd., 2014). Ayrıca Marmara Denizi’nde *P. longirostris* örneklerindeki Cu, Zn, Cd ve Ni konsantrasyonları, Akdeniz Antalya Körfezi’nden alınan örnekler göre daha yüksektir (Gökoğlu vd., 2008; Öksüz vd., 2009). Bu çalışmada da Marmara Denizi kıyısından alınan (Yalova) *P. longirostris* örneklerinde tespit edilen metal seviyeleri Akdeniz’den alınan *P. longirostris*’e göre daha yüksek değerlerdedir.

Karadeniz bölgesinden alınan *Palaemon* cinsine ait *P. serratus* örneklerinin kas dokusunda Cu konsantrasyonu TGK, (2002) tarafından belirlenen sınır değerleri aştığı tespit edilmiştir (Ergül ve Aksan, 2013). Bu çalışmada *P. adspersus* örneklerinde Cu değerleri sınır değerlerin altındadır. Kurun vd., (2007)’nin Marmara Denizi’nde *P. adspersus*’da belirledikleri Cu, Zn ve Ni değerleri, bu çalışmada Karadeniz’den alınan aynı tür örneklerin metal içeriklerine göre oldukça yüksek değerdedir. Ayrıca Karadeniz’e ait *P. adspersus* örneklerinin Cd değeri sınır değerlerin üzerinde tespit edilmiştir.

Akdeniz’den Aristeidae familyasına ait *A. antennatus* türü ile ilgili olarak ortalama Zn (9,953 ± 0,10 mg/kg) değerinin Cu (2,099 ± 0,01 mg/kg) değerinden fazla bulunduğu kaydedilmiştir. Cd ve Ni konsantrasyonlarının ise tespit edilmediği belirtilmiştir (Olgunoğlu, 2015). Bu çalışmada benzer olarak Akdeniz’e ait *A. antennatus* örneklerinin Zn değeri (6,94 ± 0,76 mg/kg) Cu değerinden (2,48 ± 0,27 mg/kg) fazladır. Ayrıca bu tür için Cd (0,3 ± 0,25 mg/kg) ve Ni (0,13 ± 0,10 mg/kg) konsantrasyonları kaydedilmiştir.

Elde edilen veriler dünyadaki diğer araştırmalarla kıyaslandığında ise Zn içeriklerinin Cu içeriklerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Kuzeydoğu Cezayir’de *A. antennatus* için Cu içeriği 139 mg/kg, Zn içeriği 105 mg/kg, Cd içeriğinin ise 0,83 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. *P. longirostris* türünde ise Cu değeri 134, Zn değeri 118, Cd değeri ise 0,89 mg/kg’ dır (Abdennour vd., 2000). Akdeniz’in güneydoğusunda İsrail kıyılarında yapılan bir başka çalışmada bu tür için verilen metal oranları Cu (21,8 mg/kg) > Zn (13,6 mg/kg) > Cd (0,06 mg/kg) olarak kaydedilmiştir (Kress vd., 1998). İspanya’nın Kanarya adalarında *P. adspersus*’ta Cu, Zn ve Ni’nin en yüksek ortalama değerleri *P. elegans* ve *P. serratus* türlerine göre daha yüksektir. Ortalama olarak Cu; 186,4 mg/kg, Zn; 124,7 mg/kg, Ni; 11,7 mg/kg olarak tespit edilmiştir (Lozano vd., 2010). Araştırmacıların verdiği metal seviyeleri bu çalışmada *P. adspersus* türü için tespit edilen ortalama değerlerden oldukça yüksektir. Araştırmalar deniz yaşam alanlarının antropojenik metal kirlenmesinden etkilendiğini ve karides türlerinin çevre kirliliğinin belirlenmesinde dikkate alınabilecek biyomonitörler olduğu kanaatinde (Lorenzon vd., 2001).

Sonuç olarak, Zn, Cu, Ni ve Cd metallerinin ortalamasına göre en yüksek konsantrasyonları Karadeniz ve Marmara Denizi’ne ait örneklerde (*P. adspersus*, *P. longirostris*) tespit edilmiştir. Akdeniz’den alınan *A. antennatus* örneklerinin metal içerikleri analizi yapılan diğer türlere göre daha düşük seviyededir. Önceki çalışmalarda da Karadeniz ve Marmara Denizi’nin kirlilik durumu bildirilmiştir. Karides türlerinin metal içerikleri değerlendirildiğinde alındıkları bölgelerin kirlilik durumunu yansıtabilmesi, metal kirliliği için uygun biyomonitör olduklarını göstermektedir. Araştırma

sonuçlarına göre, metal analizi yapılan türlerle ilgili olarak şimdilik insan sağlığı açısından bir tehlike bulunmadığı söylenebilir. Ancak Rize ve Yalova kıyılarında Cd değerinin ulusal ve uluslararası sınır değerlerin üzerinde bulunması, ileriki zamanlarda insan sağlığı ve çevre kirliliği açısından tehlike oluşturabilir. Bu nedenle Karadeniz ve Marmara Denizi'nin izlenmesi, toksisiteyi meydana getiren unsurların belirlenmesi ve önüne geçilmesi için farklı alanları ve diğer sucül türleri içeren çalışmaların artırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdenmour, C., Smith, B.D., Boulakoud, M.S., Samraoui, B., & Rainbow, P.S. (2000). Trace metals in marine, brackish and freshwater prawns (Crustacea, Decapoda) from northeast Algeria. *Hydrobiologia*, 432, 217–227.
- Altas, L., & Büyükgüngör, H. (2007). Heavy metal pollution in the Black Sea shore and offshore of Turkey. *Environmental Geology*, 52 (3), 469-476.
- Ateş, A.S., Kocataş, A., Katağan, T., & Özcan, T. (2010). An updated list of decapods crustaceans on the Turkish coast with a new record of the Mediterranean shrimp, *Processa acutirostris* Nouvel and Holthuis 1957 (Caridea Processidae). *North-Western Journal of Zoology*, 6, (2), 209-217.
- Baboli, M.J., & Velayatzadeh, M. (2013). Determination of heavy metals and trace elements in the muscles of marine shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* from persian gulf. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23 (3), 786.
- Balkıs, N., & Çağatay, M.N. (2001). Factors controlling metal distributions in the surface sediments of the Erdek Bay, Sea of Marmara, Turkey. *Environment International*, 27, 1–13.
- Bat, L., Şahin, F., Sezgin, M., Üstün, F., Baki, O.G., & Öztekin, H.C. (2013). Heavy metals in edible tissues of the brown shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) from the Southern Black Sea (Turkey). *Journal Black Sea/Mediterranean Environment*, 19 (1), 70-81.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., & Tomaro, L.M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 21–34.
- Burridge, L.E., Doe, K., Haya, K., Jackman, P.M., Lindsoy, G., & Zitko, V. (1999). Chemical analyses and toxicity tests on sediments under salmon net pens in the Bay of Fundy. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2291, 39.
- Çağlak, E., & Karlı, B. (2014). Beyşehir Gölü'ndeki Sudak (*Stizostedion lucioperca*, Linnaeus 1758) Balığı Kasında Bazı Ağır Metallerin Birikiminin Araştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 20, 203-214.
- Çelik, U., & Oehlenschläger, J. (2007). High contents of cadmium, lead, zinc and copper in popular fishery products sold in Turkish supermarkets. *Food Control*, 18, 258-26.
- Dökmeci, A.H., Yıldız, T., Ongen, A., & Sivri, N. (2014). Heavy metal concentration in deepwater rose shrimp species (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) collected from the Marmara Sea Coast in Tekirdağ. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 2449–2454.
- Ergül, H.A., & Aksan, S. (2013). Evaluation of non-essential element and micronutrient concentrations in seafood from the Marmara and Black Seas. *Journal Black Sea/Mediterranean Environment*, 19 (3), 312-331.
- FAO, (1983). Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products pp. 5–100, *FAO fishery circular*, p. 464.
- FAO, (2014). Fisheries and Aquaculture, Turkey. FAO of the United Nations. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_turkey. (Accessed on 21.11. 2014).
- FAO/WHO, (2004). Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956–2003), (First through sixtyfirst meetings). ILSI Press International Life Sciences Institute.
- Gökoğlu, N., Yerlikaya, P., & Gökoğlu, M. (2008). Trace elements in edible tissues of three shrimp species (*Penaeus semisulcatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Paleomon serratus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 175–178.
- Heath, A.G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology, CRC press, p. 245, Florida, USA.
- Kalay, M., & Canlı, M. (2000). Elimination of Essential (Cu, Zn) and Non-Essential (Cd, Pb) Metals from Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zilli*. *Turkish Journal of Zoology*, 24, 429-436.
- Kayhan, F.E., Muşlu, M.N., Çolak, S., Koç, N.D., & Çolak, A. (2010). Antalya Körfezi'nde Yetiştiriciliği Yapılan Mavi Yüzgeçli Orkinosların (*Thunnus thynnus*) Karaciğer ve Kas Dokularında Kurşun (Pb) Düzeyleri. *Ekoloji*, 19 (76), 65-70.
- Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D., & Apeti, D.A. (2008). An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74. Silver Spring, MD: NOAA.

- Kocataş, A., & Katağan, T. (2003). The Decapod Crustacean fauna of the Turkish Seas. *Zoology in the Middle East*, 29, 63-74.
- Kocataş, A., Katağan, T., & Üçal, O. (1991). Türkiye Karidesleri ve Karides Yetiştiriciliği. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, p.155, Bodrum, İzmir.
- Korkmaz, C., Ay, Ö., & Çolakfakıoğlu, Ç. (2016). Mersin İlinde Tüketime Sunulan Kabuklu ve Yumuşakça Türlerinin Kas Dokularında Ağır Metal Düzeyleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 12 (2),101-109.
- Kress, N., Hornung, H., & Herut, B. (1998). Concentrations of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in Deep Sea Benthic Fauna from the Southeastern Mediterranean Sea: A Comparison Study Between Fauna Collected at a Pristine Area and at Two Waste Disposal Sites. *Marine Pollution Bulletin*, 36 (2), 911-921.
- Kurun, A., Balkıs, H., & Balkıs, N. (2007). Accumulations of total metal in dominant shrimp species (*Palaemon adspersus*, *Palaemon serratus*, *Parapenaeus longirostris*) and bottom surface sediments obtained from the Northern Inner Shelf of the Sea of Marmara. *Environmental Monit Assess*, 135(1-3), 353-67.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V.J., & Ferrero, E.A. (2001). Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & shellfish immunology*, 11, 459-472.
- Lozano, G., Herraiz, E., Hardisson, A., Gutiérrez, A.J., González-Weller, D., & Rubio, C. (2010). Heavy and trace metal concentrations in three rockpool shrimp species (*Palaemon elegans*, *Palaemon adspersus* and *Palaemon serratus*) from Tenerife (Canary Islands). *Environmental Monit Assess*, 168, 451-460.
- Marra, A., Mona, S., Sà, R. M., D'Onghia, G., & Maiorano, P. (2015). Population genetic history of *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda) in the western and central Mediterranean Sea. *PLoS one*, 10(3), e0117272..
- Olgunoğlu, M.P. (2015). Heavy Metal Contents in Muscle Tissues of Three Deep-Seawater Mediterranean Shrimp Species (*Plesionika martia*, *Plesionika edwardsii*, *Aristeus antennatus*). *Polish Journal of Environmental Studies*, 24 (6), 2553-2557.
- Ökmen, M. (2011). Karadeniz'de Çevre Sorunları ve İşbirliğine Yönelik Yerel, Bölgesel Perspektifler. *Bilgi, Türk Dünyası Sosyal Bilimler Dergisi*, 53, 165-194.
- Öksüz, A., Özyılmaz, A., Aktaş, M., Gerçek, G., & Motte, J. (2009). A comparative study on proximate mineral and fatty acid compositions of deep seawater rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas 1846) and red shrimp (*Plesionika martia*, A. Milne Edwards, 1883). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8 (1), 183-189.
- Özden, Ö. (2010). Seasonal differences in the trace metal and macrominerals in shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from Marmara Sea. *Environmental Monit Assess*, 162,191-199.
- Pourang, N.J., Dennis, H., & Ghourchian, H. (2005). Distribution of heavy metals in *Penaeus semisulcatus* from Persian Gulf and possible role of metallothionein in their redistribution during storage. *Environmental Monit Assess*, 100, 71.
- Rainbow, P.S., & White, S.L. (1989). Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: Zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, 174, 245-262.
- Rainbow, P.S., & Phillips, D.J.H. (1993). Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (11), 593-601.
- Rakocevic, J., Sukovic, D., & Maric, D. (2018). Distribution and relationships of eleven trace elements in muscle of six fish species from Skadar Lake (Montenegro). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 647-657.
- Sanchez-Chardi, A., Marques, C.C., Nadal, J., & Mathias, M.L. (2007b). Metal bioaccumulation in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, inhabiting an abandoned pyrite mine site. *Chemosphere*, 67,121-130.
- Schüürman, G., & Markert, B. (1998). Ecotoxicology, ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, pp. 900.
- Sezgin, M., Aydemir, E., Ateş, A.S., Katağan, T., & Özcan, T. (2007). On the presence of the non-native estuarine shrimp, *Palaemon longirostris* H. Milne-Edwards, 1837 (Decapoda, Caridea), in the Black Sea. *Aquatic Invasions*, 2 (4), 464-465.
- Shue, M.F., Chen, W.D., Bellotindos, L.M., & Lu, M.C. (2014). Seasonal variations of heavy metals content in muscle and viscera of green-lipped mussel *Perna viridis* from Da-Peng Bay Lagoon in Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences, Part A*, 77(20), 1222-1228.
- Taşdemir, Y. (2002). Marmara Denizi: Kirleticiler ve çevre açısından alınabilecek tedbirler. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 7, 39-45.
- Türk Gıda Kodeksi, (2002). Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ 23.09.2002-24885 Sayılı Resmi Gazete.
- Türk Gıda Kodeksi, (2011). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 29 Aralık 2011-28157 Sayılı Resmi Gazete.

- Velayatzadeh, M., Sary, A.A., & Sahafi, H.H. (2014). Determination of mercury, cadmium, arsenic and lead in muscle and liver of *Liza dussumieri* from the Persian Gulf. *Iran Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5 (3), 227.
- Viegas-Crespo, A.M., Lopes, P.A., Pinheiro, M.T., Santos, M.C., Rodrigues, P.D., Nunes, A.C., & Mathias, M.L. (2003). Hepatic elemental contents and antioxidant enzyme activities in Algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal. *The Science of the Total Environment*, 311, 101–109.
- Yazkan, M., Özdemir, F., & Gölükçü, M. (2002). Antalya Körfezinde avlanan bazı balık türlerinde Cu, Zn, Pb ve Cd içeriği, *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 26, 1309-1313.

Effects of the Feeds Containing Different Amounts of Hazelnut Meal, Soybean Meal, Fish Meal and Phytase on the Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Juveniles

Orhan DEMİR^{1*}, Adil YILAYAZ²

¹Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Eğirdir Fisheries, Isparta, Turkey.

²Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Mediterranean Fisheries Research Institute, Antalya, Turkey.

*Corresponding Author: orhandemir@isparta.edu.tr

Research Article

Received 18 January 2019; Accepted 17 May 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Demir, O., & Yılayaz, A. (2019). Effects of the feeds containing different amounts of hazelnut meal, soybean meal, fish meal and phytase on the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 307-317. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.514764>

Abstract

This study aimed to examine the effects of six trial diets (containing different amounts of fish meal, hazelnut, and soybean meal protein, also without the enzyme phytase “0 FTU” and with “1000 FTU”) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. The study was conducted as three replicates. Live weight gain, feed consumption, feed conversion ratio (FCR), specific growth ratio (SGR) and the protein efficiency ratio (PER) of the trial groups were calculated as 52.8-64.3g, 64.1-72.1g/fish, 1.12-1.22, 1.42-1.6% and 1.79-2.0, respectively ($P<0.05$). The dietary factors did not produce a significant effect on the organ indexes, body chemical composition, digestibility ratios of diets in the fish ($P>0.05$). But phytase enzyme affected significantly the dietary phosphorus ratio and the digestible energy ratio ($P<0.05$). Dry matter, crude ash, crude lipid, crude protein and phosphorus components in the fish bodies were found to be 30.7-31.8%, 2.2-2.3%, 11.8-12.8%, 14.5-15.2% and 0.56-0.62%, respectively. In the trial groups fish, values of the total nitrogen and phosphorus consumption, gain and retention were calculated as 1139-1173 mg/kg versus 248-279 mg/kg, 315-350 mg/kg versus 73-82 mg/kg, and 27.2-30.6% versus 26-33%, based on the average daily weight. Generally, the interaction between factors was found to be statistically insignificant ($P>0.05$).

Keywords: Diet proteins, enzyme, retention, growth, trout.

Farklı Oranlarda Fındık, Soya Küspesi, Balık Unu ile Birlikte Fitaz İçeren Rasyonların Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularının Gelişimi Üzerine Etkileri.

Özet

Bu çalışmada, balık unu protein (BUP), fındık küspesi proteini(FKP) ve soya küspesi protein (SKP) ile birlikte fitaz enzimini 0 (-) ve 1000 FTU (+) farklı oranlarda içeren altı adet deneme rasyonunun gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularının ($27,82\pm 0,04$ g) büyüme parametrelerine, vücut kimyasal kompozisyonuna, organ indekslerine, yemindirilebilirliğine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Canlı ağırlık artışı 52,8-64,3g, yem tüketimi 64,1-72,1g/balık, yem dönüşüm oranı 1,12-1,22, spesifik büyüme oranı % 1,42-1,6 ve protein etkinlik oranı 1,79-2,0 arasında değişmiştir($P<0.05$).Denemede rasyon protein kaynağı ve fitaz enzim içeriği gökkuşluğu alabalığı yavrularının organ indeksleri, vücut kimyasal kompozisyonları ve rasyon sindirim oranları üzerine etkilerinin önemsiz, ancak rasyon fosfor ve enerjinin sindirilmesi oranı üzerine rasyon fitaz enzim seviyesi etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ($P<0,05$). Deneme sonu balık vücutlarının kuru madde (KM), ham kül (HK), ham yağ (HY), ham protein (HP) ve fosfor bileşenleri sırasıyla %30,7-31,8, %2,2-2,3, %11,8-12,8,%14,5-15,2 ve %0,56-0,62 olarak bulunmuştur. Deneme grubu balıkların toplam azot, tüketimi, kazancı ve tutumu günlük ortalama ağırlık üzerinden 1139-1173 mg/kg, 315-350 mg/kg, %27,2-30,6 ve toplam fosfor tüketimi, kazancı ve tutumu 248-279 mg/kg, 73-82 mg/kg ve %26-33 olarak hesaplanmıştır. Tüm hesaplamalarda (“rasyon protein kaynağı*Fitaz”) faktörleri arasında etkileşimin önemsiz olduğu bulunmuştur ($P>0,05$).

Anahtar kelimeler: Rasyon proteinleri, enzim, vucüta tutulma, büyüme, alabalık.

INTRODUCTION

Aquaculture is the fastest-growing sector among the agricultural and food fields (Granada et al., 2016). The growth of the fish farming sector has also led to an inevitable increase in the demand for the fish meal (Orisasona et al., 2017), and using higher amounts of plant-based raw materials in fish feeds (Ruohonen et al., 2007; Granada et al., 2016).

It is commonly reported that soybean protein and other vegetable protein may be used in the rainbow trout farming instead of a part of fish meal in the diet in order to reduce aquafeeds environmental pollution without compromising on live weight gain, feed conversion ratios, specific growth rate (Vielma et al., 2000; Morris et al., 2005; Dalsgaard et al., 2009; Pratoomyot et al., 2010; Harlıoğlu, 2011; Burr et al., 2012; Diler et al., 2012; Zhang et al., 2012; Orisasona et al., 2017). Atalayoğlu and Çakmak (2010) reported that hazelnut (10%) meal could be substituted for some parts of the fish meal without having a problem. Doğan and Bircan (2010) reported that the rate of hazelnut meal (increasing this ratio to 30%) in the feed of rainbow trout did not affect the feed conversion ratio, the protein efficiency ratio, the condition factor. Karabulut et al. (2017) reported that when the hazelnut meal was greater than 35%, the protein efficiency ratio decreased and the feed conversion ratio significantly reduced in angelfish (*Pterophyllum scalare*) juveniles. Important findings have been obtained from the use of hazelnut meal at certain ratios instead of fish meal (Emre et al., 2008a; Emre et al., 2008b; Sevgili et al., 2009a; Sevgili et al., 2009b). Harlıoğlu (2011) found that the feeds have significant effects on the phosphorus and nutrients digestibility rates of rainbow trout ($p < 0.05$).

The use of the enzyme phytase, for example, provided an increase in the digestion rate of minerals, protein-amino acid, and starch in the feeds and an improvement in feed conversion ratio, reducing the pollution from the metabolic waste and faeces (Cheng et al., 2004; Cao et al., 2007; Dalsgaard and Pedersen, 2011). The optimum level of phytase supplementation in rainbow trout diets was approximately 500 mU/kg diet (Cheng et al., 2004). The addition of fungal phytase diet could not increase nutrient digestibility in trout Orisasona et al. (2017). Phytase activity is defined as FTU, FTT, PU and U (Selle and Ravindran, 2007). The addition of fungal enzyme of phytase, as well as the increase in phosphorus level in feed, did not significantly affect the growth and feed conversion ratios (Dalsgaard et al., 2009). The use of microbial enzyme in biotechnological applications is promising to allow for higher availability (Chung, 2001; Maenz, 2001). Besides, use of 2000 FTU phytase enzyme in the diet significantly reduced the phosphorus waste output (Biswas et al., 2007).

Doğan and Bircan (2010) reported that the rate of hazelnut meal in the feed of rainbow trout did not affect the hepatosomatic index, and viserosomatic index. In all experimental groups, protein (90.93% - 9.176%) and fat (96.78% - 98.33%) digestibility rates were quite high, but no statistical difference was found between them. In another report, use of different ratios of canola meal instead of fish meal in *Lateolabrax japonicus* diets and the increase in this ratio negatively affected feed conversion ratio, specific growth rate slowed down digestive enzyme activity and significantly reduced the digestibility of dietary dry matter, protein, lipid and phosphorus (Cheng et al., 2010).

Özgür Yigit et al. (2018) reported that feeds containing protease and phytase did not produce a significant effect on the growth, feed conversion ratio, protein and lipid digestibility in the rainbow trout groups. Vielma et al. (1998) found that on the phosphorus utilization in rainbow trout had been reduced by feed containing phytase and cholecalciferol.

Hernandez et al. (2004) observed that the phosphorus retention efficiency of rainbow trout juveniles was higher than that of the group fed with the feed containing high level of fish meal, suggesting that nitrogen retention rates were similar for all experimental groups. In adult fish, phosphorus and nitrogen retention rates in the body were found to be lower than the juveniles.

In this study, it is aimed to investigate the effects of diets containing different amounts of soybean and hazelnut meal, fish meal, and phytase on the development, body chemical structure and the feed digestibility in rainbow trout (*O. mykiss*) juveniles. It is hypothesized that an increase in feed digestibility rate should improve the growth and feed conversion rate in the fishes, and more environmentally sustainable aquaculture practices are needed to be performed by sticking to the natural and economical principles.

MATERIAL and METHODS

Experiment location, duration, and fish species

In the study, 450 rainbow trout (*O. mykiss*) juveniles (27.82 ± 0.04 g as mean live weight) obtained from a private company were used. Trials were conducted at Kepez Trout Unit of the Mediterranean Fisheries Research, Production and Training Institute. The fish were used in the trial after being kept in quarantine for 15 days in order to ensure that they were in good health for the trials. Trial duration was considered as 75 days. In order to determine the feed digestibility after the trials, the fish were fed *ad libitum*. Fecal samples were collected twice a week for 3 weeks.

Experimental diets and design

The raw materials used in the trial diets were purchased from Kağsan Karadeniz Food and Agriculture Industry Inc. Trial diets used to feed rainbow trout juveniles contain different amounts of fish meal protein (FMP), hazelnut meal protein (HMP) and soybean meal protein (SMP), without the enzyme phytase “0 FTU” (-) and with “1000 FTU” (+). Six equally prepared trial diets (D) with 42% of isonitrogenous crude protein values (CPV) were formulated as follows (Table 1), (D₁₋, D₁₊ = 30% FMP+ 35% HMP+ 35% SMP; D₂₋, D₂₊ = 40% FMP+ 30% HMP+30% SMP; D₃₋, D₃₊ = 50% FMP+ 25% HMP+25% SMP).

The study was carried out in three replicates in 18 trial tanks (400 L). 25 juvenile fish were randomly allocated to each of the six groups (Table 1). The fish were fed with the feed corresponding to approximately 2% of their daily live weight in the morning and evening. Each tank was supplied with 12L water per minute. In the trials, water with a temperature of $17.5 \pm 0.52^\circ\text{C}$, dissolved oxygen of 9.2 ± 0.55 mg / L, and pH of 8.0 ± 0.08 was used. In addition, 0.5% of chromic oxide was added as an indicator in order to determine nutrient digestibility in the trial diets. Prepared trial diets were stored at $+4^\circ\text{C}$ until use.

Table1. Distribution of raw material and nutrient contents according to crude protein structure of trial diets (%).

Feed raw materials	Distributions of raw materials according to raw material contents of trial diets					
	D ₁	D ₁₊	D ₂	D ₂₊	D ₃	D ₃₊
	0(-)	1000(+)	0(-)	1000(+)	0(-)	1000(+)
Phytase (FTU)	0(-)	1000(+)	0(-)	1000(+)	0(-)	1000(+)
Fish meal	18		24		30	
Soybean meal	28.8		24.8		20.4	
Hazelnut meal	33		27.8		23	
Corn gluten	2.4		1.7		1	
Wheat meal	1.64		2.99		5.49	
Corn meal	0		3.85		7.05	
Vitamin mixture	0.5		0.5		0.5	
Mineral mixture	0.11		0.11		0.11	
Fish oil	14.4		13.1		11.3	
Carboxymethyle cellulose	0.5		0.5		0.5	
Choline chloride	0.15		0.15		0.15	
Chromic acid	0.5		0.5		0.5	
Unit feed	100		100		100	
Proximate analysis:						
Moisture	6.39	6.61	6.32	6.22	5.93	6.55
DM	93.1	93.39	93.68	93.78	94.07	93.45
CA	8.53	8.71	8.74	8.81	8.93	9.13
Diets by dry matter (%)						
L	17.64	21.09	14.32	18.79	15.04	18.72
CP	42.64	42.92	42.54	42.44	42.02	42.86
Total	68.80	72.72	65.60	70.04	65.99	70.71

Dry matter ‘DM’, Crude Ash ‘CA’, Crude Lipid ‘CL’, Crude protein ‘CP’, D₁ [%30 FMP+ (%35 SMP + %35 HMP)], D₂ [%40 FMP + (%30 SMP + %30 HMP)], D₃ [%50 FM + (%25 SMP + %25 HM)]. Phytase 0 FTU ‘-’, 1000 FTU ‘+’,

Analysis and calculations of growth parameters

This study investigated the effects of diets containing equal ratios of hazelnut meal and soybean meal and different ratios of fish meal and phytase on the growth parameters of rainbow trout juveniles and the digestibility of nitrogen and phosphorus in feeds. In periodical intervals (15 days), the fishes were anesthetized with 0.3 mL / L phenoxyethanol.

Then, their total length (mm) was measured with the aid of a caliper, and their live and internal organs weights (g) were measured with an electronic scale with 0.01 precision. Feed requirements were determined by calculating the feed conversion rates periodically. For the digestion analysis, the anesthetized fishes were dried with blotting paper. Then, the feces samples were collected by rubbing the abdominal area and pressing on it. This process was repeated every three days. All collected feces samples were combined in a way to represent the average, and then stored in the deep freeze until the analysis.

The analyses of dry matter (DM), crude protein (CP) and crude lipid (CL) (James, 1999), crude ash (CA) (AOAC, 2000), fecal chromium oxide (Furukawa and Tsukahara, 1966) and phosphorus amount (James, 1999), and the calculations of total energy (Henken et al., 1986), dry matter digestion (Cheng et al., 2004), nutrient digestion coefficient, retained nutrient rate (Vielma et al., 2002), nutrient gain, nutrient uptake and mean weight gain were performed in trial diets. Live weight gain (LWG), feed conversion ratio (FCR), condition factor (CF), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (Akpınar et al., 2012) and viscerosomatic index (VSI), hepatosomatic index (HSI), and carcass yield (CY) were calculated (Metailler, 1987).

Statistical Analysis

After the arcsin transformation, Shapiro-Wilk W test for data normality and Bartlett test for data homogeneity were performed. Then, all percentages were calculated. Differences between the averages of the trial group were analyzed with One Way Variance Analysis (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons. Two-way ANOVA was used to test whether the addition of phytase to the feed has an effect on the parameters included in the study. Tukey multiple comparisons were performed to determine whether there is any difference among groups, $P < 0.05$ was considered significant. Data were analyzed using the JMP 8.0 Statistical Package Program (SAS Institute and Inc., 2008) Analysis results are presented as the mean standard error (mean \pm SE).

RESULTS

Growth and feed conversion ratio

Trial diets (D₁, D₂ and D₃) contain fish meal protein (30%, 40% and 50% respectively) as the protein of animal origin and semi soybean meal protein+semi hazelnut meal protein, (70%, 60% and 50%, respectively) as plant-based protein, without the phytase enzyme (0FTU) and with the phytase enzyme (1000FTU) (Table 1).

The effects of trial diets, contents of which are given above, on the growth parameters, body chemical composition, organ indexes, and nutrient digestibility in rainbow trout juveniles are summarized in Table 2-6. The fishes having an initial weight of 27.85-27.88 g gained 80.63-92.20 g at the end of the experiment. The most live weight gain (LWG) was in the group fed with D₃-, while the least live weight gain was in the group fed with D₁+. Furthermore, phytase enzyme added to the feeds (D₁, D₂ and D₃) did not shown any significant difference ($P > 0.05$).

Table 2. Effects of trial feeds on the growth parameters and feed conversion ratio in rainbow trout juveniles (#).

Diets	IW(g/fish)	FW (g/fish)	LWG (g/fish)	F Con. g/fish)	FCR	SGR (%/day)	PER
D ₁ -	27.8±0.02	87.84±0.61 ^{abc}	59.96±0.62 ^{abc}	67.86±0.56 ^{abc}	1.13±0.02 ^{abc}	1.53±0.01 ^{ab}	1.94±0.04 ^{ab}
D ₁ +	27.8±0.04	80.63±3.16 ^c	52.80±3.19 ^c	64.12±1.67 ^c	1.22±0.05 ^c	1.42±0.05 ^b	1.79±0.07 ^b
D ₂ -	27.8±0.04	82.80±1.84 ^{bc}	54.97±1.88 ^{bc}	66.56±1.16 ^{bc}	1.21±0.02 ^{bc}	1.45±0.03 ^{ab}	1.82±0.03 ^{ab}
D ₂ +	27.8±0.05	83.86±2.37 ^{abc}	56.06±2.34 ^{abc}	67.87±1.62 ^{abc}	1.21±0.02 ^{abc}	1.47±0.04 ^{ab}	1.82±0.04 ^{ab}
D ₃ -	27.8±0.05	92.20±0.33 ^a	64.35±0.38 ^a	72.17±0.19 ^a	1.12±0.01 ^a	1.60±0.01 ^a	2.00±0.02 ^a
D ₃ +	27.8±0.03	90.20±1.10 ^{ab}	62.35±1.12 ^{ab}	70.29±0.44 ^{ab}	1.13±0.02 ^{ab}	1.57±0.02 ^a	1.93±0.03 ^{ab}
Two-way Anova							
DPS	0.002	0.002	0.001	0.016	0.004	0.048	
F	0.099	0.104	0.139	0.159	0.125	0.008↓	
DPS * F	0.121	0.125	0.111	0.205	0.139	0.165	

(#) Different letters in the same column indicate significant differences between group averages (P<0.05).

^a Diet 'D', Dietary protein source 'DPS', Phytase 'F', 0 FTU '-', 1000 FTU '+', Initial weight 'IW', Final weight 'FW', Live weight gain 'LWG', Feed consumption 'F Con', Feed conversion ration 'FCR', Specific growth ratio 'SGR', Protein efficiency ratio (PER).

'DPS*F' interaction was found to be non-significant on the feed consumption of trial groups (P>0.05). However, differences in the average feed consumption per fish at the end of the experiment were found significantly (P <0.05) depending on the trial diet with a protein of the plant-based or animal origin and on their rates (P<0.05). The most feed consumption was observed in the D₃- group where the growth was the most, while the least feed consumption was in the D₁+ having the least growth (Table 2).

The interaction between the 'DPS*F' factors on the specific growth rate of the trial groups was found to be non-significant (P>0.05). At the end of the experiment, the greatest SGR was in the D₃- group (1.60), whereas the least SGR was in the D₁+ group (1.42) (P<0.05).

In terms of FCR, D₃- group had the highest value with 1.12 while D₁+ group exhibited the lowest value with 1.22. In FCR, the difference between (D₂>D₃) = D₁ group was found significantly. At the end of the experiment, differences between FCR values in the groups were significantly (P <0.05), depending on the source and rates of plant- or animal-based proteins used in the trial diets (P<0.05). Increased amount of fish meal protein in diets positively affected FCR (P<0.05). However, the presence or absence of the phytase enzyme in the experimental diets presented no difference between the groups (P> 0.05).

The interaction between the 'DPS*P' factors on the protein efficiency ratio (PER) in the experimental groups was found non-significant (P> 0.05). At the end of the experiment, D₃- group had the highest PER value (2.00), while D₁+ displayed the lowest PER value (1.79). Diet protein source and phytase of the trial diets affected PER values of experimental groups (P<0.05). Adding phytase to the feeds reduced significantly PER.

Organ indexes

Values of viscerosomatic index (VSI), carcass yield (CY), condition factor (CF), and hepatosomatic index (HSI) of the experimental groups are given in Table 3. At the end of the experiment, interaction between 'DPS*F' factors on the VSI, CY, CF, and HSI and the effects of dietary protein source and phytase were found to be similar for all groups (P>0.05).

Table 3. Effects of trial diets on the organ indexes in rainbow trout juveniles.

Diets	Viscerosomatic index (%)	Hepatosomatic index (%)	Condition factor	Carcass Yield (%)
D ₁ -	13.28±0.27	1.26±0.02	1.40±0.02	85.10±0.28
D ₁ +	13.02±0.28	1.17±0.08	1.41±0.04	85.38±0.36
D ₂ -	13.39±0.63	1.34±0.16	1.40±0.06	85.07±0.70
D ₂ +	13.70±0.58	1.40±0.12	1.45±0.04	84.64±0.65
D ₃ -	14.09±0.13	1.27±0.01	1.43±0.01	83.98±0.13
D ₃ +	12.98±0.24	1.22±0.07	1.45±0.06	85.24±0.30

The lowest VSI (12.98%) was observed in D₃₊ group having a supplement of the lowest phytase, while the highest VSI (14.09%) was found in D₃₋ group without phytase. The lowest HSI was in D₁₊ with 1.17%, as the highest HSI was recorded in D₂₋ with 1.40%. In terms of condition factors, D₁₋ had the lowest value (1.40), whereas D₃₊ had the highest value (1.45). When the Table 3 is examined in terms of carcass yield, the lowest value was found in the D₃₋ group with 83.98%, as the highest value was recorded in D₁₊ with 85.38%.

Body composition

The initial and final body compositions of the groups are given in the Table 4. At the end of the experiment, interaction between ‘DPS*F’ factors on the dry matter, crude ash, crude lipid, crude protein and phosphor in rainbow trout juveniles and the effects of dietary protein source and phytase were similar for all groups (P>0.05). Selected factors also had no significant effects on the body composition, although there was a proportional difference between the initial and final body compositions.

Table4. Effects of trial diets on the body composition in rainbow trout juveniles (%).

Diets	Dry matter	Ash	Lipid	Protein	Phosphor
Before experiment	27.18	2.45	9.87	13.63	0.62
D₁₋	31.15±0.50	2.28±0.01	12.47±0.15	14.84±0.18	0.59±0.03
D₁₊	31.66±0.48	2.37±0.10	12.45±0.52	14.67±0.70	0.59±0.01
D₂₋	31.84±0.48	2.30±0.05	12.87±0.47	14.59±0.35	0.62±0.00
D₂₊	30.84±0.12	2.35±0.03	12.11±0.35	15.21±0.09	0.60±0.00
D₃₋	31.22±0.37	2.22±0.15	12.30±0.11	14.82±0.24	0.59±0.03
D₃₊	30.73±0.09	2.21±0.05	11.81±0.13	14.71±0.06	0.56±0.02

Digestibility rates of trial diets

Analysis results of digestion in the diets are given Table 5. It was found that the digestibility coefficients of dry matters in trial diets ranged from 50.83% to 62.34% and that the interaction between ‘DPS*F’ factors and the effects of dietary protein source and phytase were similar among the groups (P>0.05).

Digestion coefficients for dry matters were higher in those containing the phytase than in those without it among D₁, D₂ and D₃. It is most likely that the digestibility coefficients of dry matter were positively affected by the presence of phytase enzyme.

It was observed that the digestibility coefficients of dietary lipid varied from 93.23% to 96.33 % and that interaction between ‘DPS*F’ factors on digestibility coefficients of dietary lipid and the effects of dietary protein source were non-significant among the groups (P>0.05). However, phytase enzyme had an important effect on the digestibility rate of dietary lipid, suggesting that there was a statistically significant difference between the trial groups (D₃=D₁>D₂) (P<0.05).

Table5. Digestibility rates of diets in trial group fish (#).

Diets	DM	Lipid	Protein	Phosphor	Energy
D₁₋	60.90±3.87	95.22±0.93 ^a	83.07±1.43	64.43±2.85 ^{ab}	73.80±2.55 ^{ac}
D₁₊	62.34±3.57	94.79±0.53 ^a	84.37±1.12	74.38±1.19 ^a	74.99±2.35 ^{ac}
D₂₋	53.08±5.64	93.23±0.33 ^b	79.70±2.12	55.80±6.73 ^b	66.87±3.78 ^b
D₂₊	57.85±0.61	93.76±0.21 ^b	81.47±0.16	74.11±0.38 ^a	76.45±0.28 ^a
D₃₋	50.83±5.96	94.58±0.79 ^a	78.11±2.61	55.37±4.00 ^b	70.21±3.18 ^{bc}
D₃₊	60.73±2.98	96.33±0.16 ^a	82.40±1.19	64.99±2.74 ^{ab}	73.33±1.85 ^{ac}
Two-way ANOVA					
DPS	0.289	0.212	0.106	0.074	0.507
F	0.141	0.012	0.091	0.001↑	0.048↑
DPS*F	0.606	0.203	0.629	0.422	0.272

(#) Different letters in the same column indicate significant differences between group averages (P<0.05).

Digestibility coefficients of dietary protein in trial fishes ranged from 78.11% to 84.37% and interaction between ‘DPS*F’ factors and the effects of dietary protein source and phytase were similar among the groups ($P>0.05$).

Digestibility rate of dietary phosphorus varied from 55.37% to 74.38 %, and interaction between ‘DPS*F’ factors on digestibility coefficients of dietary phosphor and the effect of dietary protein source was non-significant among the groups ($P>0.05$). On the contrary, the phytase enzyme present in the feed had a positive effect on the digestibility rate of phosphorus in the experimental groups ($P<0.05$).

The digestible energy ratio varied between 66.87% and 76.45%. The interaction between ‘DPS*F’ factors on the digestible energy ration and the effect of dietary protein source were found to be statistically non-significant ($P >0.05$). However, phytase enzyme had a significant effect on the digestible energy ratio ($P<0.05$), suggesting that it positively affected the groups being fed with D₁₊, D₂₊ and D₃₊ diets containing the phytase.

Nitrogen and phosphor utilization

Table 6 indicates the values of nitrogen and phosphorus consumption, gain and retention in the diets used to feed the trial group fishes. The interaction between ‘DPS*F’ factors on consumption, gain and retention of dietary nitrogen, and the effect of dietary protein source and phytase were statistically non-significant among the groups ($P>0.05$).

The highest nitrogen consumption, gain and retention values were 1173.4 mg / kg average weight (AW) / day, 350.8 mg / kg AW / day and 30.63%, respectively, while the lowest nitrogen consumption, gain and retention values were 1139.8 mg / kg AW / day, 315.9 mg / kg AW / day, and 27.29%, respectively.

The highest phosphorus consumption, gain and retention values were 279.6±1.4 mg / kg average weight (AW) / day, 83.03 mg / kg AW / day, and 33.07%, respectively. While the lowest phosphorus consumption, gain and retention values were 248.8 mg / kg AW / day, 73.69 mg / kg AW / day, and 26.53%, respectively. While the interaction between ‘DPS*F’ factors on the dietary phosphorus consumption was statistically non-significant ($P>0.05$), the effects of feed protein source and phytase on dietary phosphorus consumption were found to be statistically significant ($P<0.05$).

The results of two-way ANOVA analysis showed statistically significant differences between the groups in terms of ‘dietary protein source’ ($P<0.05$). In addition, the interaction between ‘DPS*F’ factors and the effect of "dietary protein source" were statistically non-significant ($P>0.05$). The interaction between "DPS *F" factors on the phosphorus retention and the effect of ‘dietary protein source’ were found to be statistically non-significant ($P>0.05$). However, the results of two-way ANOVA analysis indicated that adding the phytase to the diets significantly affected the phosphorus retention, leading to a reduction in D₁, D₂, and D₃ groups ($P<0.05$).

Table6. Values of nitrogen and phosphorus consumption, gain and retention in the diets used to feed the trial group fishes ([#]).

Diets	N Con. (mg/kg OA/day)	P Con. (mg/kg OA/day)	N gain (mg/kg OA/day)	P gain (mg/kg OA/day)	N retention (%)	P retention (%)
D ₁	1139.8±15.0	248.9±3.3 ^b	340.4±6.3	80.15±6.38	29.88±0.83	32.27±2.99 ^a
D ₁₊	1159.5±11.0	277.7±2.6 ^a	315.9±3.2	73.69±2.13	27.29±2.79	26.53±0.70 ^b
D ₂	1165.5±2.5	252.9±0.6 ^b	319.4±5.8	83.03±1.58	27.41±0.54	32.82±0.59 ^a
D ₂₊	1173.4±5.8	279.6±1.4 ^a	342.5±9.4	79.81±1.75	29.19±0.76	28.55±0.67 ^b
D ₃	1145.6±5.3	248.8±1.2 ^b	350.8±8.2	82.33±5.61	30.63±0.83	33.07±2.11 ^a
D ₃₊	1165.3±8.2	272.4±1.9 ^a	342.2±4.9	74.40±4.14	29.37±0.57	27.33±1.61 ^b
Two-way ANOVA						
DPS	0.116	0.049	0.393	0.546	0.409	0.752
F	0.051	<0.001↑	0.776	0.103	0.532	0.003↓
DSP*F	0.756	0.461	0.259	0.841	0.271	0.884

([#]) Different letters in the same column indicate significant differences between group averages ($P<0.05$). Nitrogen ‘N’, Phosphorus ‘P’, Consumption ‘Con.’, Average weight/day ‘AW/d’.

DISCUSSION

Although the interaction between ‘dietary protein source (DPS) and phytase (F)’ on the final live weight, LWG, SGR and PER in the trial groups was statistically non-significant ($P > 0.05$), these parameters were affected by variations in the amount and rates of fish meal protein, hazelnut meal protein and soybean meal protein found in the diets.

In addition, the increased amount of fish meal in the diet had a positive effect on the final live weight and live weight gain, SGR and PER parameters improved depending on the increased amount. Improvement in FCR also seems to support these increases (Table 2, $P < 0.05$). These results are consistent with those of Cheng et al. (2004); Cao et al. (2007); Cheng et al. (2010); Pratoomyot et al. (2010); Doğan and Bircan (2010); Diler et al. (2012); Zhang et al. (2012); Karabulut et al. (2017); Orisasona et al. (2017) and Özgür Yigit et al. (2018). However, our findings are inconsistent with the results of Vielma et al. (2000); Ruohonen et al. (2007); Cheng et al. (2010); Pratoomyot et al. (2010); Burr et al. (2012); Zhang et al. (2012).

Presence or absence of phytase in diets containing the same rate of plant-protein did not create any marked difference in these characteristics of the groups ($P > 0.05$). These results are in line with those of Dalsgaard et al. (2009) and Özgür Yigit et al. (2018). However, our findings are inconsistent with the results of Vielma et al. (2000); Ruohonen et al. (2007); Burr et al. (2012). One of the possible reasons why phytase has no effect may be that water temperature is not optimal for the enzyme activity.

Moreover, it is understood from these results that feed structures inappropriate for the nutrient requirements of carnivorous fishes due to various concerns in terms of fish production and feed costs have a negative impact on the fish growth and feed digestibility. These results are consistent with those of Biswas et al. (2007); Cao et al. (2007); Cheng et al. (2010); Pratoomyot et al. (2010); Burr et al. (2012).

This study showed that the most feed consumption was in the group D_{3-} (72.17 ± 0.19 g) where the growth was the highest and our findings are inconsistent with the results of Cheng et al. (2010); Pratoomyot et al. (2010). Our study also revealed that the groups fed with D_{3-} and D_{3+} diets containing more amount of fish meal protein had higher final live weight, live weight gain, FCR, SGR, and PER values than the other groups (Table 2).

It can be inferred from the current data that the distribution of raw material contents and ratios of the D_{3-} and D_{3+} is relatively more important than the other diets in terms of biological fulfillment of fish nutrient requirements and fish welfare. Aquaculture should be performed appropriately for the fish biology. Therefore, its main objective should be to reduce the feed costs, improve the product quality, increase the biomass, and reduce the waste output released into a receiving environment.

It was found that the effects of factor levels on the final VSI, CY, CF, and HSI were similar for all groups, and there was no interaction between them ($P > 0.05$). These results are in line with those of Doğan and Bircan (2010). We think that the absence of difference between body indexes of fishes in the experimental groups maybe due to the fact that the trial diets were prepared suitably for the natural nutrient requirements of the fish, and feeding ratio and frequency were few.

It has been observed that the lowest ratio of HSI was in the D_{1+} with 1.17%, while the highest HSI value was in the D_{2+} with 1.40%. As the amount of plant-based raw materials in carnivorous diets increases, the value of HSI in living organism also increases.

While CF was the lowest in the D_{1-} group with 1.40, it was the highest in the D_{3+} group with 1.45. The fact that CF remains at this level also suggests that the feeding ratio is relatively low.

The carcass yield was found to be the lowest in the D_{3-} group with 83.98% and the highest in the D_{1+} group with 85.38%. It is believed that one reason for not being able to detect a difference between the final VSI, CY, CF and HSI values may be the trial duration. Values of final crude protein, crude lipid, and dry matter in the groups are increased slightly when compared to the baseline values (Table 4), suggesting that the final values are affected more positively by the present feeding regimes than the pre-trial feeding profiles. These results are consistent with those of Morris et al. (2005). Levels of dietary protein source and phytase did not produce a significant effect on the body phosphorus levels of fishes in the experimental group. Even it has been found that these values are relatively lower in the experimental groups. It is thought that this is similar to the level of pre-trial mineralization in the fish body, and joint evaluation of the calcium and phosphorus relationship would be useful.

The effects of dietary protein source on the digestibility of these nutrients present in the trial diets were found to be similar ($P>0.05$). These results are consistent with those reported by Cheng et al. (2004); Doğan and Bircan (2010); Özgür Yigit et al. (2018), despite being inconsistent with the results of Harlıoğlu (2011). Digestibility ratio of dietary protein in D₁, D₂ and D₃ fed with the diets containing phytase enzyme was found to be relatively higher than that of other groups.

The phytase enzyme present in the diets had a significant positive effect on the digestible energy, lipid and phosphorus digestibility ($P<0.05$). Our findings are inconsistent with the results of Cao et al. (2007). These values were shown to be higher in all the groups fed with D₁₊, D₂₊ and D₃₊ diets containing phytase enzyme. It is clear from the results shown in Table 5 that the aquaculture studies would contribute significantly to the reduction of the environmental impacts of organic phosphorus burden since phytase enzyme added to the diets improves the digestibility ration of dietary phosphorus ($P <0.05$). These results are also supported by those reported by Cheng et al. (2004); Biswas et al. (2007); Cao et al. (2007); and Dalsgaard and Pedersen (2011). We believe that the digestibility ratios of dietary dry matter used in terms of the relationship between fish production amount, unit cost per growth and environment should be further improved.

It was determined that the effects of factor levels on the dietary nitrogen consumption, gain, and retention in fishes of the experimental group were statistically non-significant ($P> 0.05$). These results are different from those of Chung (2001). The effects of DPS and F factor levels on consumption of dietary phosphorus were found to be statistically significant ($P <0.05$). These results are in line with those of Vielma et al. (1998); Maenz (2001); Chung (2001); Cheng et al. (2004); Hernandez et al. (2004) Biswas et al. 2007; Cao et al. 2007; Harlıoğlu (2011), despite being inconsistent with those of Dalsgaard et al. (2009). Regardless of which proportion plant-derived proteins are used in the diets, phytase-added diets provided a higher amount of phosphorus consumption than the phytase-free ones ($P<0.05$). These results are also supported by those reported by Biswas et al., 2007; Cao et al., 2007.

The two-way ANOVA analysis revealed statistically significant differences between the groups in terms of "dietary protein source" factor levels ($P<0.05$). The increase in the amount of fish meal protein in the trial diets also positively affected the quantity of phosphorus consumed by the fishes in the experimental group. These results vary depending on whether the diets contain dietary protein source and phytase enzyme ($P<0.05$). Effect of factor levels on dietary phosphorus gain was found to be statistically non-significant in experimental group fishes ($P>0.05$). A significant reduction was shown in the dietary phosphorus gain and retention in the groups fed with D₁₊, D₂₊ and D₃₊ containing the phytase enzyme. Biswas et al. (2007); Cao et al. (2007). This suggests that the parameter 'phosphor gain' would be more meaningful because the fishes are able to benefit from the dietary phosphorus more efficiently. These results are consistent with those of Biswas et al. (2007); Cao et al. (2007), despite being inconsistent with those of Vielma et al. (2000); Ruohonen et al. (2007); Zhang et al. (2012).

In conclusion, the decreased amount of plant-based hazelnut meal and soybean meal protein added to the six trial diets used for feeding rainbow trout juveniles had a positive effect on the growth parameters ($P<0.05$), but the level of phytase enzyme did not produce any effect on these parameters. D₃₋ and D₃₊ diets may be recommended for the fish biology and growth. It should also be noted that all diets produce similar effects on organ indexes and body chemical components of fish but they will be in the order of D₁>D₂>D₃ in terms of feed cost. Vegetable source protein ingredients contain anti-nutritional factors that reduce the uptake of nutrients and minerals, especially in carnivorous fish, by increasing the waste output in this way. The effect of dietary protein source on the digestibility ratios of dietary nutrients is insignificant, but the diets containing phytase achieve a significant effect in some groups. Depending on whether or not the diets contain the phytase enzyme, it produces an effect on dietary nitrogen and phosphorus consumption, gain and retention.

Acknowledgement: This study was supported by Scientific Research Projects Coordination Department of Süleyman Demirel University with the Project number: 4343-YL1-15.

REFERENCES

- Akpınar Z., Sevgili H., Demir A., Özgen T., Emre Y., & Tufan Eroldoğan O. (2012). Effects of dietary lipid levels on growth, nutrient utilization, and nitrogen and carbon balances in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture International*, 20 (1),131-143.

- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th ed., Assoc. off Anal., Chem., Arlington. VA.
- Atalayoğlu G., & Çakmak M.N. (2010). The Investigation possibilities of using hazelnut kernel meal in scale carp (*Cyprinus carpio* L. 1843) diets. *Firat University Journal of Science*, 22(2), 71-78.
- Biswas A.K., Kaku H., Cheol Ji S., Seoka M., & Takii K. (2007). Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 267, 284–291.
- Burr G.S., Wolters W.R., Barrows F.T., & Hardy R.W. (2012). Replacing fish meal with blends of alternative proteins on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and early or late stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 334-337, 110–116.
- Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., Luo Z., & Li D. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 497-507.
- Cheng Z.J., Hardy R.W., Verlhac V., & Gabaudan J. (2004). Effects of microbial phytase supplementation and dosage on apparent digestibility coefficients of nutrients and dry matter in soybean product-based diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 1-15. doi:10.1111/j.1749-7345.2004.tb01054.x
- Cheng Z., Ai Q., Mai K., Xu W., Ma H., Li Y., & Zhang J. (2010). Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass. *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 305, 102-108.
- Chung T.K. (2001). Sustaining livestock production and environment. *Food and Agriculture Asia Pacific Development*, Singapore. 52–54pp.
- Dalsgaard J., Ekmann K.S., Pedersen P.B., & Verlhac V. (2009). Effect of supplemented fungal phytase on performance and phosphorus availability by phosphorus-depleted juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on the magnitude and composition of phosphorus waste output. *Aquaculture*, 286, 105-112.
- Dalsgaard A.J.T., & Pedersen P.B. (2011). Solid and suspended/dissolved waste (N, P, O) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 313(1-4), 92-99.
- Diler İ., Sevgili H., Arabacı M., & Emre Y. (2012). Soya içerikli gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine ilave edilen enzimlerin büyüme performansı, sindirilebilirlik ve azot-fosfor ilişkisi. *Çevresel Ekoloji Dergisi*, 21(85), 89-97.
- Doğan G., & Bircan R. (2010). Use of hazelnut meal as an alternative protein source in fish feeds. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2, 49 -57.
- Emre Y., Sevgili H., & Sanli M. (2008a). Partial replacement of fishmeal with hazelnut meal in diets for juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh*, 60(3), 198-204.
- Emre Y., Sevgili H., & Şanlı M. (2008b). A preliminary study on the utilization of hazelnut meal as a substitute for fish meal in diets of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 39 (3), 324-328.
- Furukawa A., & Tsukahara H. (1966). On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 32, 502-506.
- Granada L., Sousa N., Lopes S., & Lemos M.F.L. (2016). Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? – a review. *Reviews in Aquaculture*, 8, 283–300.
- Harlıoğlu A.G. (2011). Gökkuşacağı alabalığı diyetlerinde balık ununun bir kısmı yerine soya küspesi ve tıyağı soya kullanımının fosfor sindirimi ve balık etindeki fosfor miktarına etkileri. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 26(2), 47-61.
- Henken A.M., Lucas H., Tijssen P.A.T., & Machiels M.A.M. (1986). A comparison between methods used to determine the energy content of feed, fish and faeces samples. *Aquaculture*, 58(3-4), 195-201. doi: 10.1111/raq.12093.
- Hernandez A., Satoh S., Kiron V., & Watanabe T. (2004). Phosphorus retention efficiency in rainbow trout fed diets with low fish meal and alternative protein ingredients. *Fisheries Science*, 70, 580-586.
- James C.S. (1999). *Analytical Chemistry of Foods an Apsen Publication*. Apsen Publishers. Inc. Maryland. 178pp.
- Karabulut H.A., Sonay F.D., Kırtan Y., & Könez H. (2017). Fındık küspesinin melek balığı (*Pterophyllum scalare*) yavrularının büyüme performansına ve yaşama oranına etkisi. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2, 115-124.
- Maenz D.D. (2001). *Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds*. In: Bedford M.R. Partridge G.G. editors. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. CAB International; Wallingford. UK. 61–83 pp.
- Metailler R. (1987). *Experiments in Nutrition*. In: Bruno.A. (Ed.). *Nutrition and Marine Aquaculture*, Tunise. Lisbon. 304-320 pp.
- Morris P.C., Gallimore P., Handley J., Hide G., Houghton P., & Black A. (2005). Full-fat soya for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater: Effects on performance, composition and flesh fatty acid profile in absence of hind-gut enteritis. *Aquaculture*, 248, 147–161.

- Orisasona O., Falaye A.E., Ajani E.K., & Kareem O.K. (2017). Effect of phytase supplementation on the growth, mineral composition and phosphorus digestibility of African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Animal Research International*, 14 (2), 2741-2750.
- Özgür Yigit N., Bahadır Koca S., Işıl Didinen B., & Diler İ. (2018). Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. *Journal of Applied Animal Research*. 46(1), 29–32. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1256292>
- Pratoomyot J., Bendiksen E.Å., Bell J.G., & Tocher D.R. (2010). Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 305, 124–132.
- Ruohonen K., Simpson S.J., & Raubenheimer D. (2007). A new approach to diet optimisation: A re-analysis using European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquaculture*, 267, 147-156.
- SAS Institute & Inc. (2008). JMP 8 introductory guide, Cary, NC.
- Selle P.H., & Ravindran V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135, 1-41.
- Sevgili, H., Emre, Y., & Dal, İ. (2011). Growth, nutrient utilization, and digestibility of mirror carp (*Cyprinus carpio*) fed diets containing graded levels of hazelnut meal in place of fishmeal. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 63, 557-567..
- Sevgili H., Emre Y., Kanyilmaz M. & Uysal R. (2009b). Effects of replacement of fishmeal with hazelnut meal on growth performance, body composition, and nutrient digestibility coefficients in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61(2), 103-113.
- Vielma J., Lall S.P., Koskela J., Schoner F.J., & Mattila P. (1998). Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 163, 309–323.
- Vielma J., Makinen T., Ekholm P., & Koskela J. (2000). Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture*, 183 (3-4), 349–362. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00299-9)
- Vielma J., Ruohonen K., & Peisker M. (2002). Dephytinization of two soy proteins increase phosphorus and protein utilization by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 204, 145-156.
- Zhang Y., Øverland M., Shearer K.D., Sørensen M., Mydland L.T., & Storebakken T. (2012). Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture*, 360–361, 25–36.

Contribution to the Knowledge of Freshwater Halacarid Mites (Acari: Halacaridae) from Turkey

Furkan DURUCAN^{1*} , Yunus Ömer BOYACI² 

¹İşıklar Caddesi No 16, 17 TR-07100 Antalya, Turkey

²Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Eğirdir Fisheries, Isparta, Turkey

*Corresponding Author: f_durucan@hotmail.com

Research Article

Received 21 January 2019; Accepted 14 February 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Durucan, F., & Boyacı, Y.Ö. (2019). Contribution to the knowledge of freshwater halacarid mites (Acari: Halacaridae) from Turkey. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 318-324. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.515607>

Abstract

Based on freshwater halacarid mites collected from four different provinces (Antalya, Denizli, Isparta and Muğla) of Turkey, two species of the genera *Halacarellus* and *Porohalacarus* are reported and illustrated in the present study. *Halacarellus hyrcanus* (Viets, 1928) was only recorded from Muğla, while *Porohalacarus alpinus* (Thor, 1910) is recorded from Isparta, Denizli and Antalya. *H. hyrcanus* is reported for the first time from Turkey in this study. Additionally, comparisons of the idiosoma lengths and localities of the two species are presented here.

Keywords: Halacaridae, Acari, *Halacarellus hyrcanus*, *Porohalacarus alpinus*.

Türkiye'nin Tatlısu Halacarid Kenelerine (Acari: Halacaridae) Katkılar

Özet

Bu çalışmada, Türkiye'nin 4 farklı ilinden (Antalya, Denizli, Isparta ve Muğla) toplanan örnekler üzerinden *Halacarellus hyrcanus* (Viets, 1928) ve *Porohalacarus alpinus* (Thor, 1910) türleri bildirilmiştir. *H. hyrcanus* sadece Muğla İli'nden kaydedilirken, *P. alpinus* türü Antalya, Denizli ve Isparta'dan kaydedilmiştir. *H. hyrcanus* türü Türkiye faunası için yeni kayıttır. Ayrıca, her iki türün vücut uzunlukları ve lokalite bilgileri de bu çalışmada sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Halacaridae, Acari, *Halacarellus hyrcanus*, *Porohalacarus alpinus*.

INTRODUCTION

Halacarid mites are relatively small benthic organisms, the adult body length is less than 1 mm and unable to swim. Although the majority are marine, some are found in freshwater streams, lakes and ponds. While the first marine halacarid mite recorded in 1758 by Baster, the first freshwater halacarid mite was described in 1879 by Kramer. Until now, the family Halacaridae includes more than 1000 marine and approximately 60 freshwater species all over the world (Bartsch, 2006, 2009; Durucan, 2018). In this study, illustrations of deutonymph and female of *P. alpinus*, and female, male of *H. hyrcanus* are given with their worldwide distributions and comparisons. The present materials from four different provinces (Antalya, Denizli, Isparta and Muğla) of Turkey adds new record of freshwater halacarid mites of Turkey.

MATERIAL and METHODS

Samples were collected by hand at localities in Turkey. Mites were extracted by washing the substrates. The meiofauna retained in the set of sieves (63µm, 500 µm, 1 mm) was sorted under binocular microscope (Nikon SMZ 10A). In the laboratory, mite specimens were cleared in lactic acid and mounted in Hoyers medium. Figures were drawn with the aid of a camera lucida (Nikon Eclipse E400). The specimens were kept in the first author's personal collection in Antalya. All measurements are given as micrometers (µm).

RESULTS

Family Halacaridae Murray, 1877

Genus *Halacarellus* Viets, 1927

Halacarellus hyrcanus (Viets, 1928) (Figure 1)

Material examined

1♀, 1♂, Kargı Stream, Fethiye, Muğla, 15 May 2016, Coll. Y. Ö. Boyacı.

Morphology and notes

Dorsal and ventral plates large. Setae ds-1 on AD, ds-2 to ds-4 (striated in integument), ds-5 on PD and ds-6 on anal plate. AE with 3 pairs of ventral setae. PE with 1 dorsal seta and 2 ventral setae. Anterior portion of GA broadly rounded. Female GA with 2 pairs of pgs and sgs. Genital acetabula external (Figure 1). Male with almost 100 pgs around GO (Figure 1). Gnathosoma 1.6 times longer than wide. Both pairs of maxillary setae on rostrum. Palps 4 segmented. Total palp length is 150 µm. P-2 with dorsal seta; P-3 with medial spur; P-4 with three setae (Figure 1). Leg-I chaetotaxy (from trochanter to tarsus): 1, 2, 8, 6, 10, 8; Leg I longer than leg II (Figure 1). The morphological characteristics of the our specimens reported here accord with the previously descriptions (Bartsch 1998, 2018; Viets 1928). The present finding constitutes first record of this species from Turkey. See Table 1 for measurements.

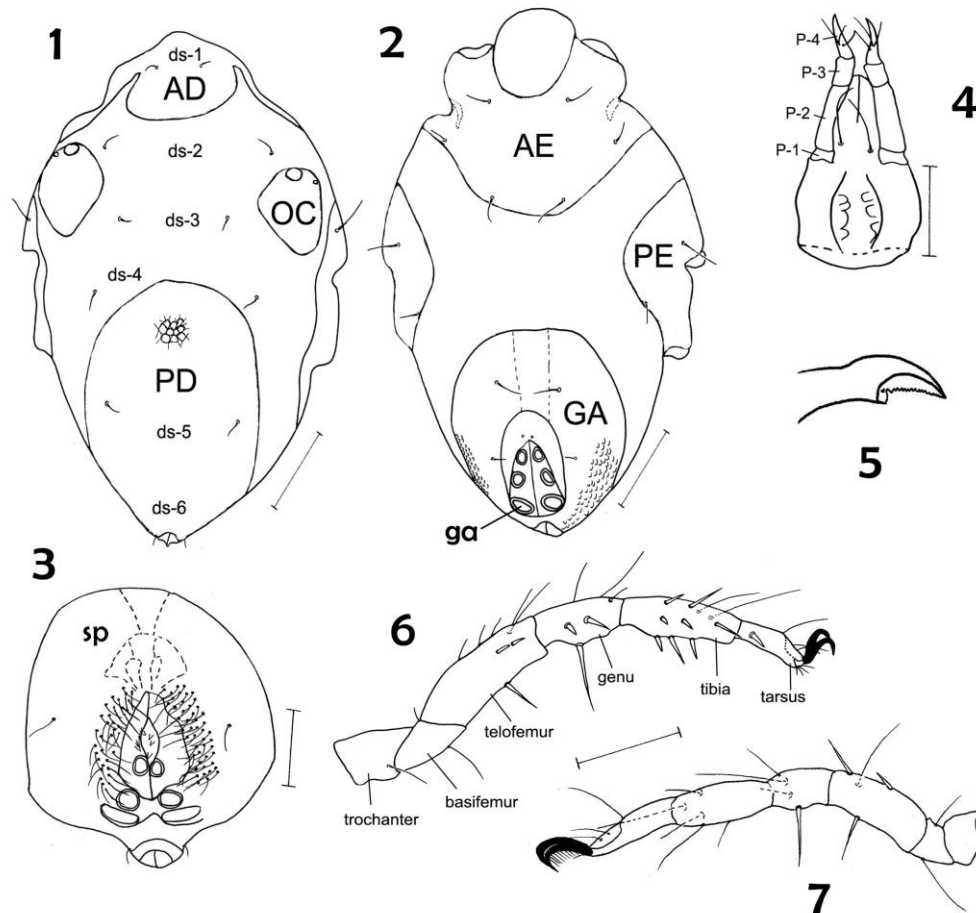


Figure 1. *H. hyrcanus* (Viets, 1928) 1 idiosoma, dorsal, ♀ 2 idiosoma, ventral, ♀ 3 GA, ♂ 4 gnathosoma, ventral, ♀ 5 chelicera, ♀ 6 leg I, lateral, ♀ 7 leg II, medial, ♀ (AD anterior dorsal plate AE anterior epimeral plate ds-1 to ds-6 dorsal setae numbered in sequence from anterior to posterior GA genitoanal plate ga genital acetabula OC ocular plate P-1 to P-4 palps from 1-4 PD posterior dorsal plate PE posterior epimeral plate sp spermatopositor) Scale bars: 100 µm.

Distribution

H. hyrcanus was found for the first time from Caspian Sea, Bakü-Azerbaijan by Viets (1928) and afterwards recorded from Rhine (France, Germany, Netherlands), Bulgaria (Lake Varna), Romania (Danube delta, Sfintul Gheorghe, Plavisevita, Sulina) (Bartsch, 1998; 2004; 2009) Present record: Kargı Stream, Fethiye (Muğla, Turkey) (Table 2).

Genus *Porohalacarus* Thor, 1922

Porohalacarus alpinus (Thor, 1910) (Figure 2-3)

Material examined

4 ♀♀, from *Cladophora* sp. on stone 50 cm depth (25 September 2016) (37°53'0.5202"N; 30°51'59.565"E) at coastal part of Lake Eğirdir, Isparta; 6 ♀♀, from macrophytes which in 1-2 m depth (30 October 2014) (38°15'48.0"N; 29°55'17.0"E) at Lake Işıklı, Denizli; 34 ♀♀ and 3 DN, from macrophytes which in 30-50 cm depth (27 August 2018) (36°51'35.2872"N; 30°43'48.9468"E) at Mehmet Manavoğlu Park, Antalya. Coll. F. Durucan.

Morphology and notes

Dorsal and ventral plates large. Dark spots of eye pigment underneath AD and OC. The characteristics features of *P. alpinus* are dorsal plates reticulated, anterior margin of AD and PD truncated, female GA has five pairs of pgs; each of genital sclerit with four genital acetabula (Figure 1). The first author also observed four females with an everted ovopositor (Figure 1).

Gnathosoma 1.6 times longer than wide. Both pairs of maxillary setae on rostrum. Palps 4 segmented. Total palp length is 87 µm. P-2 with dorsal seta; P-3 with medial spur; P-4 with 3 setae (Figure 1). Leg-I chaetotaxy (from trochanter to tarsus): 1, 2, 4, 5, 6, 8. Legs slender, tibia I ventrally with four bristles (Figure 2). The same author also has found three deutonymphs at Mehmet Manavoğlu Park, Antalya. The deutonymph specimens similar to the adult one. Dorsal and ventral plates smaller than adults. GA of the specimens have four pairs of genital acetabula (Figure 3). See Table 1 for measurements.

P. alpinus differs from *P. gallicus* by the following features: (1) OC as long as or longer than AD in *P. gallicus*, while OC distinctively shorter than AD in *P. alpinus* (2) ventral plates fused to a ventral shield in *P. gallicus* while ventral plates are separated in *P. alpinus* (Bartsch, 2006).

The morphological characteristics and idiosoma size of our specimens accord with the original description. Table 2 summarizes worldwide literature data on idiosoma size of the species. This is the first halacarid record from Lake Işıklı, Denizli, Turkey and constitutes the second record of this species from Sinop, Turkey, by Bartsch (2004) but the species not illustrated.

Distribution

P. alpinus was described (only one female) for the first time in Norway from littoral macrophytes by Thor (1910) and afterwards recorded from Europe (from Finland and Iceland to Italy), Black Sea (Turkey) North Africa, North America (United States and Canada), Australia and New Zealand (Bartsch, 2009); Madagascar (Bartsch, 2018) Present study records: Mehmet Manavoğlu Park (Antalya, Turkey), Lake Eğirdir (Isparta, Turkey) and Lake Işıklı (Denizli, Turkey).

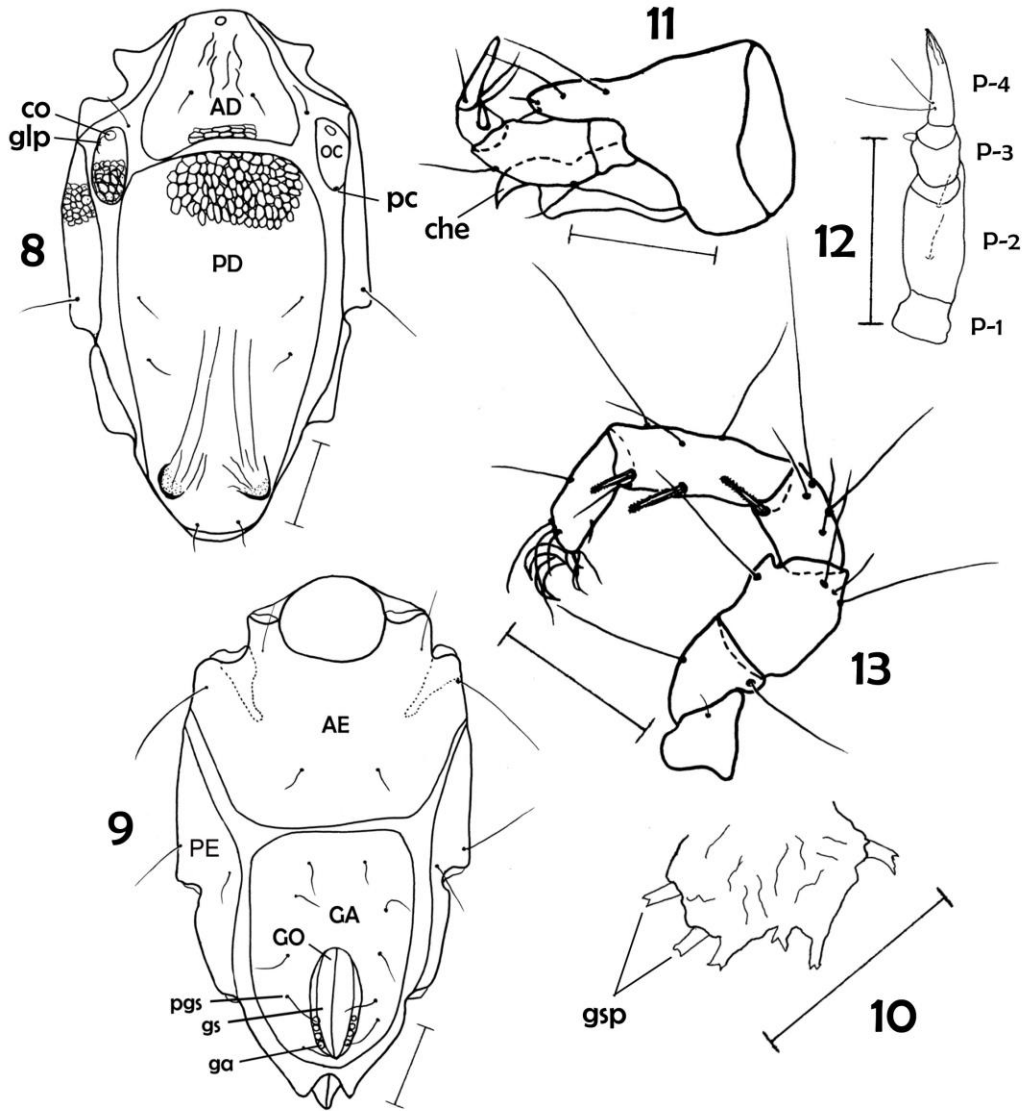


Figure 2. *P. alpinus* (Thor, 1910) female: **8** idiosoma, dorsal **9** idiosoma, ventral **10** everted ovopositor **11** gnathosoma, lateral **12** palp, ventro-lateral **13** leg I, lateral (AD anterior dorsal plate che chelicera co cornea AE anterior epimeral plate GA genitoanal plate ga genital acetabula glp gland pore GO genital opening gs genital sclerite gsp genital spine OC ocular plate P-1 to P-4 palps from 1-4 pc pore canaliculus PD posterior dorsal plate PE posterior epimeral plate pgs perigenital setae) Scale bars: 50 µm.

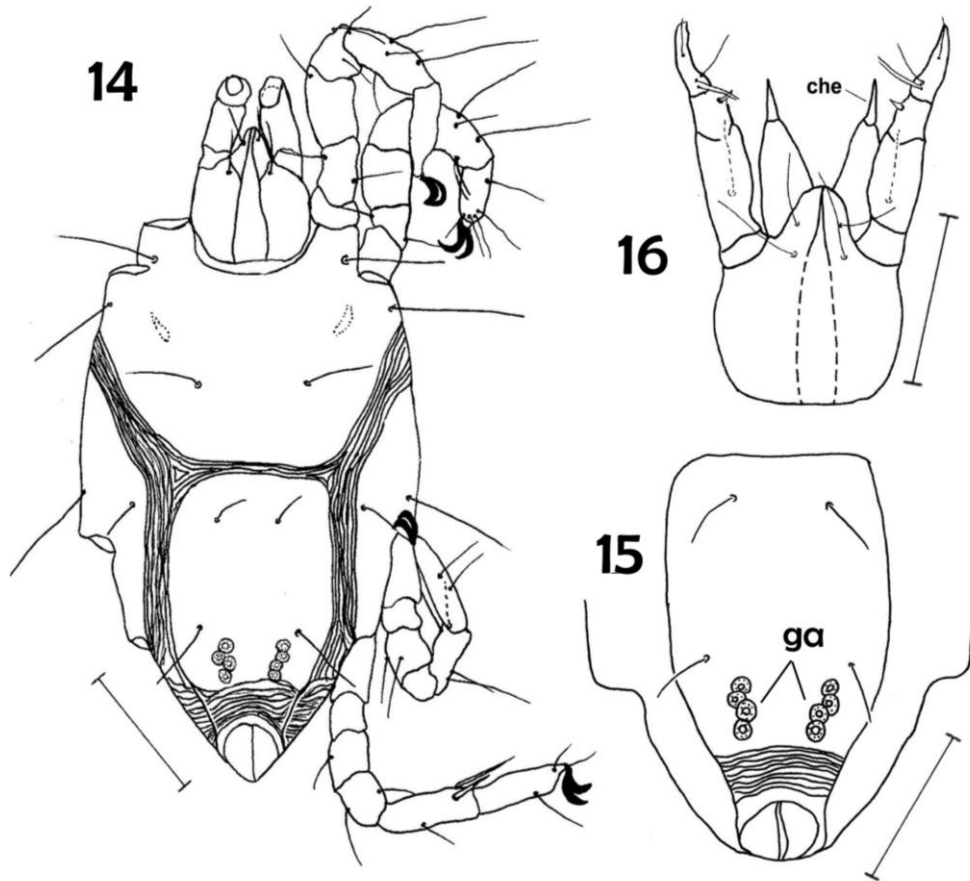


Figure 3. *P. alpinus* (Thor, 1910), DN: **14** Idiosoma with gnathosoma, ventral **15** deutonymph GA **16** gnathosoma, ventral (**che** chelicera **ga** genital acetabula) Scale bars: 50 μ m.

Table 1. Measurements (μ m) of *H. hyrcanus* and *P. alpinus*

Length/Width	<i>Halacarellus hyrcanus</i> (Viets, 1928)		<i>Porohalacarus alpinus</i> (Thor, 1910)	
	♀	♂	DN	♀
Idiosoma	575/400	550/375	235-240/135-137	255-312/160-186
Gnathosoma	200/110	162/75	55/50	85/60
AD	100/137	125/170	63/66	75/100
OC	100/75	125/100	37/25	50/23
PD	300/225	300/250	162/87	225/125
AE	137/287	150/250	75/125	89/175
PE	200/100	250/100	112/25	162/37
GA	237/225	250/225	77/65	135/100
GO	125/75	110/90	-	63/35
Total palp	150	125	70	87
Leg I	550	412	155	225

Table 2. List of globally recorded *H. hyrcanus* and *P. alpinus* with additional informations (*, gnathosoma included **n**, number of specimens **DN**, deutonymph **L**, larva **PN**, protonymph)

Species	Reference	Location	Length of idiosoma (μm)
<i>P. alpinus</i>	Thor, 1910	Norway	♀: 350*/200 (n=1)
	Walter, 1919	Lake Davos-Switzerland	?: 345/215 (n=1)
	Sokolov, 1952	Russia	♀: 320/200
	Bartsch, 1973	Hohwachter Bucht-Germany	♀: 343/265
			DN: 267-280 PN: 205-209
	Morselli & Mari, 1979	Parco della Repubblica, Modena-Italy	♀: 268-308/185-216 (n=7)
			DN:162, 234, 276, 318 (n=4) PN:142, 208, 240, 273 (n=4)
	Mari & Morselli, 1985	Tuscan-Emilian Apennines-Italy	♀: 290-300/176-203 (n=10)
	Benfatti et al., 1992	Lake Bolsena, Viterbo-Italy	♀: 314/180, 315/174 (n=2)
	Bartsch, 2018	North and Southern Madagascar	♀: 280-318 (n=10)
			♂: 286 (n=1)
			DN: 240-263 (n=6)
			PN: 186-210 (n=6)
L:140-185 (n=6)			
Present study	Lake Eğirdir, Isparta-Turkey Lake Işikli, Denizli-Turkey Mehmet Manavoğlu Park, Antalya-Turkey	♀: 250-287/162-175 (n=4)	
		♀: 255-312/160-186 (n=6)	
		♀: 250-300/135-188 (n=34)	
		DN: 210-232/130-135 (n=3)	
Viets, 1928	Caspian Sea, Bakü, Azerbaijan	♀: 495	
		♂: 455	
<i>H. hyrcanus</i>	Bartsch, 1998	♀: 478-527	
		♂: 447-459	
		DN: 402-459	
Present study	Kargı Stream, Fethiye, Muğla-Turkey	♀: 575 ♂: 550	

DISCUSSION

In Turkey, the first records of freshwater halacarids (*Copidognathus tectiporus* and *Porohalacarus alpinus*) were given by Bartsch (2004). Later, Durucan (2018) recorded and illustrated all life stages of *C. tectiporus* from Lake Eğirdir (Isparta, Turkey).

H. hyrcanus is for the first time recorded from Turkey (Kargı Stream, Muğla) in this study. Further studies aimed to improve our knowledge of Turkish freshwater halacarid mites should focus on unstudied areas and habitats in Turkey.

REFERENCES

- Bartsch, I. (1973). *Porohalacarus alpinus* (Thor) (Halacaridae, Acari), ein morphologischer Vergleich mit marinen Halacariden nebst Bemerkungen zur Biologie dieser Art. *Entomologisk Tidskrift*, 74, 116-123.
- Bartsch, I. (1998). Halacarinae (Acari, Halacaroidea) from the northwestern Black Sea: A review. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut*, 95, 143-178.
- Bartsch, I. (2004). The Black Sea halacarid fauna (Halacaridae, Acari): faunal comparison with the Mediterranean, eastern North Atlantic, North Sea, and Baltic and reflection on its origin. *Museum für Naturkunde in Berlin, Zoologische Reihe*, 80, 2, 143-158.
- Bartsch, I. (2006). 5. Acari: Halacaroidea. In: Gerecke R. (Ed.), Süßwasserfauna von Mitteleuropa 7/2-1, Chelicerata: Araneae, Acari I. Elsevier, Spektrum, Heidelberg, pp. 113-157.
- Bartsch, I. (2009). Checklist of marine and freshwater halacarid mite genera and species (Halacaridae: Acari) with notes on synonyms, habitats, distribution and descriptions of the taxa, *Zootaxa*, 1998, 1-170.
- Bartsch, I. (2018). Freshwater halacarid mites (Acari: Halacaridae) from Madagascar-new records, keys and notes on distribution and biology, *Bonn zoological Bulletin*, 67 (2), 79-99.
- Benfatti, D., Mari, M., & Morselli, I. (1992). Halacaroidea (Acari, Actinedida) from four lakes of volcanic origin in Lazio (Central Italy). *Bollettino di Zoologia*, 59, 105-111.
- Durucan, F. (2018). First record of *Copidognathus tectiporus* Viets, 1935 (Halacaridae, Acari) from the Lake Eğirdir, Isparta, Turkey. *Acta Biologica Turcica*, 31 (1), 1-5.

- Mari, M., & Morselli, I. (1985). Osservazioni su due Alacaridi (Acari, Prostigmata) dulciacquicoli raccolti in tre laghetti dell'Appennino. Tosco-Emiliano. *Atti della Societa dei Naturalisti e Matematici di Modena*, 116, 71-76.
- Morselli, I., & Mari, M. (1979). Sulla presenza di *Porohalacarus alpinus* (Thor) (Halacaridae, Acari) in un laghetto artificiale alla periferia di Modena. *Bollettino del Museo Civico Storia Naturale di Verona*, 6, 491-499.
- Sokolov, I. I. (1952). Vodjanye klešči. II. Halacarae. Fauna SSSR, 5, 201 pp. Izdatelstvo Akademii NAUK SSSR, Moskova, Leningrad.
- Thor, S. (1910). Die erste norwegische Süßwasserform der Halacariden. *Zoologischer Anzeiger*, 36, 348-351.
- Viets, K. (1928). Wassermilben aus dem Schwarzen Meer, dem Kaspischen Meer und dem Aral-See. *Abhandlungen Naturwissenschaftlicher Verein zu Bremen*, 27, 47-80.
- Walter, C. (1919). Schweizerische Süßwasserformen der Halacariden. *Revue de Suisse Zoologie*, 27, 235-242.

Propargite (Akarisit)'nin Sublethal Dozlarının *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758'da Biyokimyasal Kan Parametrelerine Etkisi

Arınç TULGAR^{1*}, Ekrem Şanver ÇELİK²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lapseki Meslek Yüksekokulu, , Lapseki, Çanakkale, Türkiye.

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale, Türkiye.

Sorumlu Yazar: arinc1717@gmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 15 Şubat 2019; Kabul 02 Nisan 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Tulgar, A., & Çelik, E.Ş. (2019). Propargite (Akarisit)'nin sublethal dozlarının *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758'da biyokimyasal kan parametrelerine etkisi. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 325-339. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.527373>

Özet

Bu araştırmada organosülfürlü bir pestisit olan propargite çalışılmış ve bu pestisitın sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) biyokimyasal kan parametreleri üzerine olan etkisine bakılmıştır. Bu parametreler serumda glikoz (GLU), toplam protein (TP), albümin (ALB), globulin (GLOB), laktat dehidrogenaz (LDH), alkale fosfataz (ALP), kreatin kinaz (CK), glutamik pirüvik transaminaz (GPT), glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), fosfor (P), demir (Fe), klor (Cl), trigliserit (TG), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve kolesterol (CHOL) şeklindedir. Bu değerlerin ölçümü için balıklar kontrol (Sadece dinlendirilmiş çeşme suyu), düşük (0,04125 mg L⁻¹), orta (0,0825 mg L⁻¹) ve yüksek (0,165 mg L⁻¹) doz propargite konsantrasyonlarına 14 gün süre ile maruz bırakılmışlardır. Deneme 3 tekerrürlü gerçekleştirilirken, örnek balıklar denemenin 0,7 ve 14. günlerinde alınmışlardır.

Anahtar kelimeler: Pestisit, propargite, Sazan balığı, biyokimya

Effect of Sublethal Doses of Propargite (Acaricide) to Biochemical Blood Parameters of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Abstract

In this research, an organosulfide pesticide propargite was studied and the effect of this pesticide on the biochemical blood parameters of carp fish (*Cyprinus carpio*) was investigated. These parameters can be listed as serum glucose (GLU), total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLOB), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK), glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphor (P), iron (Fe), chlor (Cl), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDH), high density lipoprotein (HDL) and cholesterol (CHOL). For analysing these parameters, fish were exposed to control (only rested fountain water), low (0.04125 ppm), medium (0.0825 ppm) and high (0.116 ppm) dose propargite concentrations for 14 days. While the experiment was carried out with 3 replications, sample fishes were taken on the days 0, 7 and 14 of the experiment.

Keywords: Pesticide, propargite, Common carp, biochemistry

GİRİŞ

Günümüzde giderek artan Dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak ve mevcut kaynaklardan en verimli şekilde faydalanabilmek için pestisit gibi çeşitli yardımcı maddelerin kullanımı yoluna gidilmektedir. Ancak, bu maddeler her ne kadar faydalı bir amaca hizmet etmek için kullanılsalar da, zamanla yağmur ve sel suları, kanalizasyon kaçakları, erozyon ve topraktan sızıntı gibi yollarla akuatik ortamlara kadar ulaşarak hedef dışı canlıların etkilenmesine yol açmakta ve bu şekilde de canlıların büyüme, üreme ve beslenme gibi çeşitli aktivitelerinde olumsuz yan etkiler oluşturmaktadırlar. Hatta besin zincirine girerek, giderek artan konsantrasyonlarda birikmekte ve insana kadar ulaşabilmektedirler (Adhikari vd., 2004, Ramesh ve Saravanan, 2008, Sahiti vd., 2018).

Bunun sebebi, balık ve suda yaşayan diğer organizmaların su ile olan doğrudan temasları nedeniyle çevresel değişimlere karşı oldukça hassas olmalarından kaynaklanmaktadır. Hatta bu bakımdan kirliliğin ölçülmesi çalışmalarında mükemmel birer indikatörlerdir (Ahmad, 2011; Chandrasekar ve Jayabalan, 1993; Satyanarayan vd., 2004; Giron Perez vd., 2006; Sevcikova vd., 2016; Tulgar ve Çelik, 2015).

Bu çalışmada kullanılmış olan propargite pestisiti, organosülfürlü pestisitler grubundan olup, çeşitli meyve ağaçları, sebzeler ve menşesi sera olan süs amaçlı bitkilerde kullanılan bir akarisit ve mitisiddir (EPA, 2001; Funk, 2013; Pal ve Das Gupta, 1994; PAN, 2013; PMP, 2013; Xu, 2001). İlk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde 1969 yılında kayıt altına alınmış ve Uniroyal Chemical Firması tarafından üretilip Omite® ve Comite® ticari adlarıyla tescillenmiştir (Tulgar, 2014). Propargitenin sudaki toksisitesi ise oldukça yüksektir ve sudaki yarılanma ömrü suyun pH'ı ile ters orantılıdır (Xu, 2001). Propargitenin *Cyprinus carpio* için lethal dozu (LC₅₀) 48 saat için 330 ppb olarak bildirilmiştir (Turner, 2002). Fakat bunun dışında propargite ve *C. carpio* ile ilgili fazla bir kaynak mevcut değildir. Yapılan bu çalışmanın literatüre büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada sazan türleri (*C. carpio*) kullanılmıştır. Balıklar, Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü Beymelek Tesisleri'nden (Antalya) getirilmiş ve adaptasyon için 30 gün süre ile fiberglas tanklar (80 L.) içerisinde muhafaza edilmişlerdir. Adaptasyon süresi bitiminde 180 adet balık seçilerek boy (ortalama boy: 14,25 ± 0,06 cm.) ve ağırlık (ortalama ağırlık: 43,75 ± 0,37 gr.) ölçümleri yapılmış, 12 adet akvaryuma (50 l.) her birinde 15 adet olacak şekilde bölünerek deneme dizaynı oluşturulmuştur. Deneye başlanmadan 1 gün önce yemleme kesilmiş ve deney boyunca balıklara vücut ağırlıklarının %2'si kadar yem, günde 2 defa verilmiştir. Denemede Sigma-Aldrich marka (Steinheim, Germany, % 99,5) propargite etken maddesi kullanılmıştır. Deneme 14 gün boyunca yapılmış ve bu zaman zarfında balıklar kontrol (K: sadece dinlendirilmiş çeşme suyu), düşük doz (DD: 0,04125 mg L⁻¹), orta doz (OD: 0,0825 mg L⁻¹) ve yüksek doz (YD: 0,165 mg L⁻¹) propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılmışlardır. Konsantrasyonların belirlenmesinde literatür bilgilerinden yararlanılmıştır (Turner, 2002). Belirlenen konsantrasyonlar aseton içerisinde propargite etken maddesi çözülerek hazırlanmış ve buradan da uygun seyreltmeler yapılarak deneme konsantrasyonları elde edilmiştir. Deneyde 0. gün (herhangi bir kimyasal uygulaması olmadan), 7. gün ve 14. günlerde olmak üzere 3 defa örnekleme yapılmıştır. 0. günde her akvaryumdan birer adet, 7. ve 14. günlerde ise yedişer adet balık alınmıştır. Balıklar, kan örneklerinin alınabilmesi amacıyla MS222 (150 mg/L) anestezi maddesi ile bayıltılmışlardır (Smith vd., 2007). Bu madde balıklardan acı çekmeden kan alınmasını sağlamaktadır ve kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplara uygulanmıştır. Kana mukoza karışmaması için alkolle anal yüzgecin hemen arka kısmı temizlendikten sonra, 5 ml.'lik plastik enjektörle kaudal venadan kan alınmıştır (Val vd., 1998). Alınan kan örnekleri potasyum trietilen diamin tetraasetik asit (K₃EDTA) ve jelli serum tüplerine konularak immünolojik ve biyokimyasal kan analizleri gerçekleştirilmiştir.

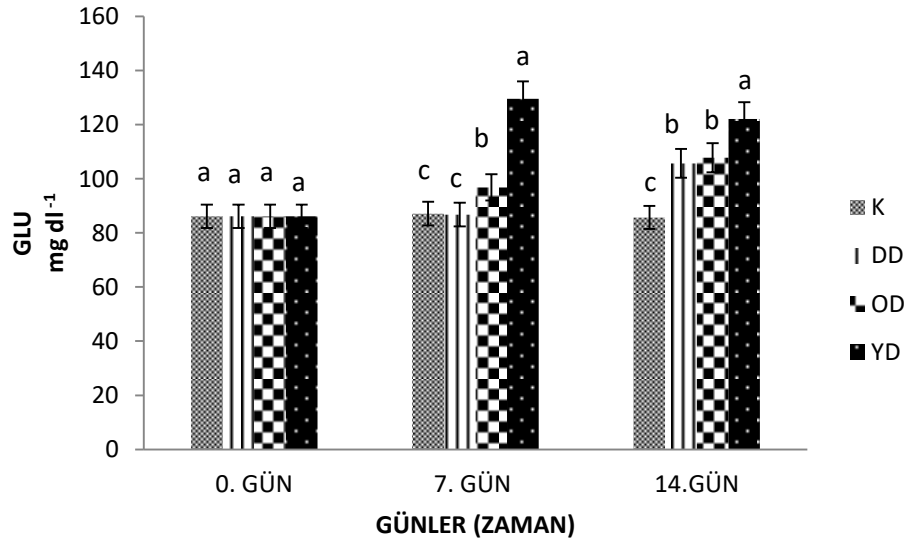
Biyokimyasal kan analizleri için kan örnekleri 4000 rpm devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş, kan serumu ayrılmıştır (Bricknell vd., 1999). Daha sonra bu serumların analizleri kit (Bioanalytic) kullanılarak spektrofotometrede yapılmıştır. Denemede biyokimyasal kan parametrelerinden GLU, ALB, GLOB, TP, GPT, GOT, ALP, CK, LDH, TG, CHOL, LDL, HDL, Ca, Mg, P, Fe, ve Cl seviyeleri ölçülmüştür..

Doz gruplarının ve deney sürelerinin kan parametreleri üzerine olan etkisini araştırmak için iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) yapılmıştır. İstatistik analizlerin değerlendirilmesi ise SPSS 17 paket programına göre yapılmıştır. Gruplar arası farklar p<0,05 olarak değerlendirilmiştir (Logan, 2010).

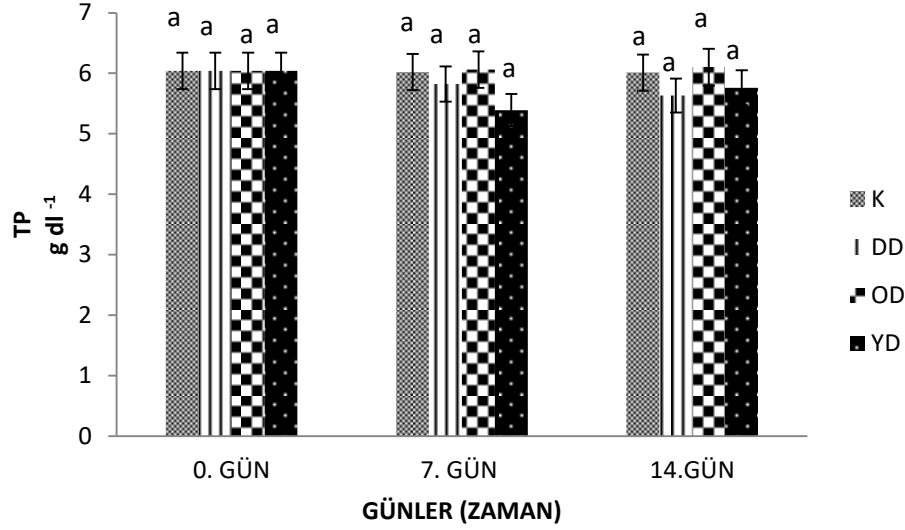
TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyokimyasal parametrelerden serum GLU, TP, ALB ve GLOB değerlerinde de çeşitli değişimler gözlenmiştir. GLU değeri orta ve yüksek dozlarda 7. günde, tüm doz gruplarında ise 14. günde kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştır (p<0,05) (Şekil 1). ALB değeri orta ve yüksek doz gruplarının 14. gününde kontrol grubuna göre önemli derecede artarken (p<0,05) (Şekil 3); GLOB değeri ise sadece yüksek dozun 14. gününde kontrol grubuna göre azalmıştır (p<0,05) (Şekil 4). GLU değerinde

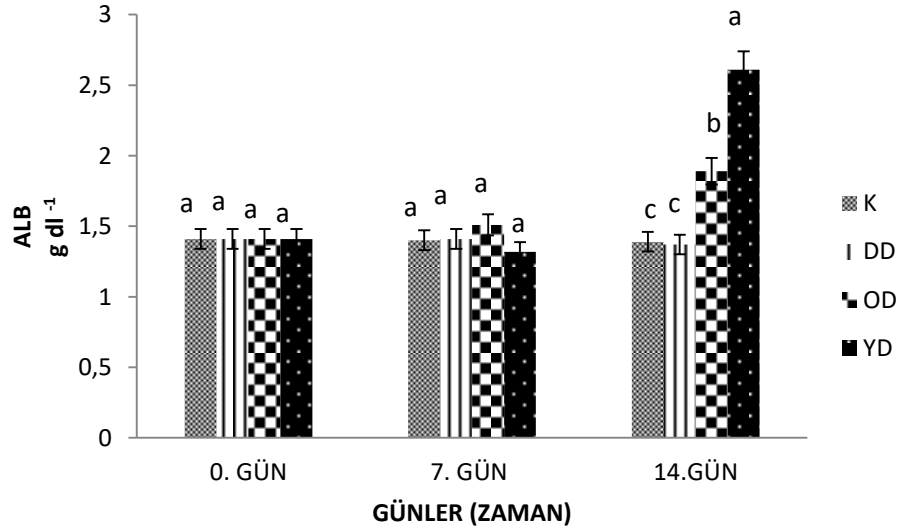
görülen artma endosülfan'a maruz bırakılan *C. carpio* (Chandrasekar ve Jayabalan, 1993) ve *Oreochromis mossambicus* balıklarında (Kumar vd., 2011); diazinon'a maruz bırakılan *Rutilus frisii* Kutum (Shamoushhaki vd., 2012) ve *C. carpio* balıklarında (Ahmad, 2011); sipermetrin'e maruz bırakılan *Rhamdia quelen* (Borges vd., 2007) ve *Cirrhinus mrigala* balıklarında (Vasantharaja vd., 2012), ana maddesi metribüzin olan Sencor 70 WG'ye maruz bırakılan *C. carpio* (Velisek vd., 2009a) ve lindan'a maruz bırakılan *C. carpio* (Saravanan vd., 2011) balıklarında da görülmüştür. GLOB değerinde görülen azalma ise endosülfan'a maruz bırakılan *Oreochromis mossambicus* (Kumar vd., 2011), diazinon'a maruz bırakılan *Oncorhynchus mykiss* (Banaee vd., 2011) balıklarında da görülmüştür. Kan GLU seviyesindeki artış hiperglisemik şartlara işaret edebilmektedir. Bununla beraber, pestisit oluşturduğu strese bağlı olarak balık metabolizmasının aşırı derecede enerjiye ihtiyaç duyuyor olabileceği de belirtilmiştir (Chandrasekar ve Jayabalan, 1993; Naveed vd., 2011). Diğer bir deyişle, GLU seviyesinde görülen yükselme propargiteye maruz bırakılan balıkta metabolik strese karşı verilen tepki olarak gösterilebilir (Velisek vd., 2006; Velisek vd., 2009a; Saravanan vd., 2011). Serum TP ve GLO seviyesindeki azalmalar ise karaciğerde fonksiyon bozukluğu olabileceğine veya pestisit metabolizma üzerindeki immunosüpresif etkisine işaret etmektedir (El-Sayed vd., 2007; Kumar vd., 2011). Dolayısıyla, çalışmamızdaki GLOB değerinin azalmasıyla ilişkili olarak karaciğerde bir takım problemler olabileceği söylenebilir. ALB değerindeki artma nedeninin ise dehidrasyon olabileceği düşünülmektedir (Medlineplus, 2014). Buna bağlı olarak ALB değerindeki artış, propargite pestisitinin etkisiyle balık vücudundaki su miktarının düşmesi ile ilişkilendirilebilir.



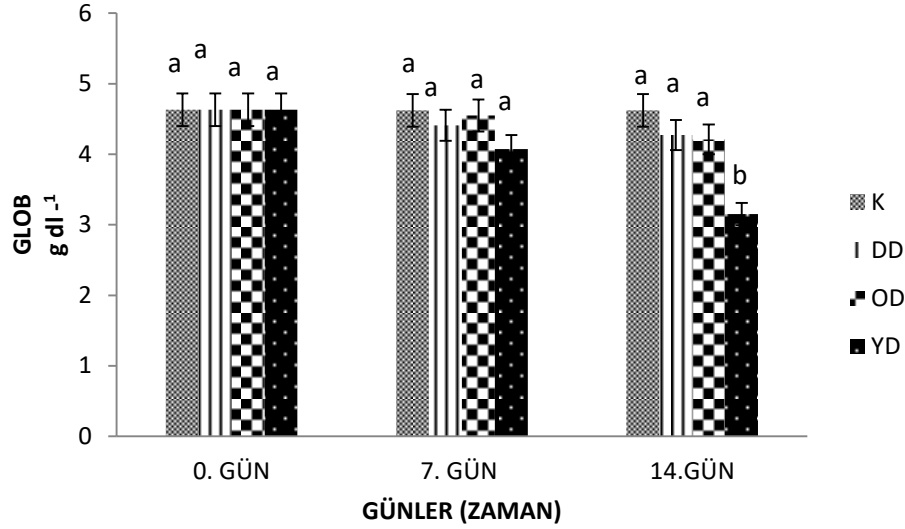
Şekil 1. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının GLU değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 2. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının TP değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

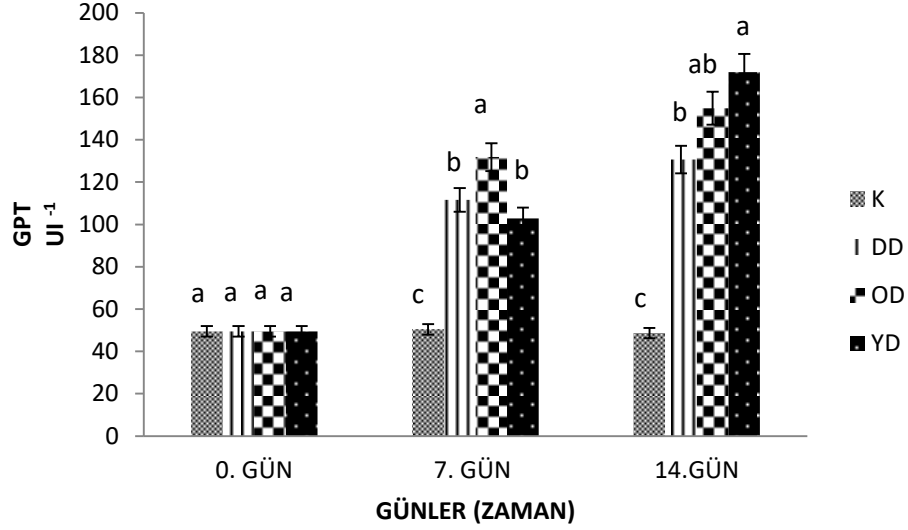


Şekil 3. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının ALB değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

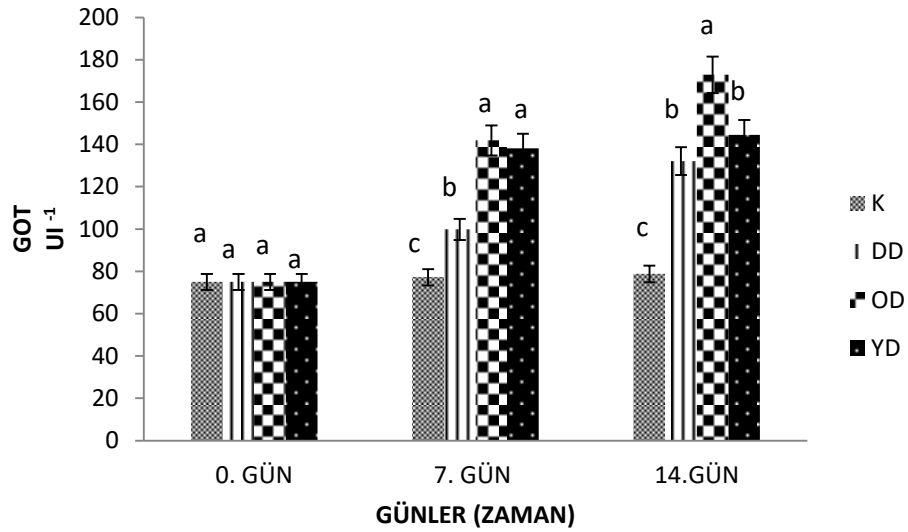


Şekil 4. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının GLOB değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

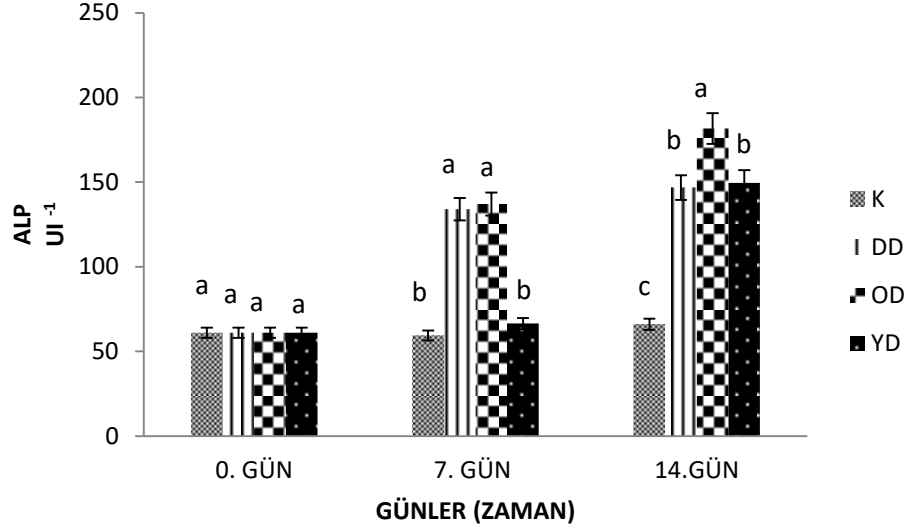
Çalışma sonunda serum enzim parametrelerinden GPT ve GOT enzimleri tüm doz gruplarının 7. ve 14. günlerinde (Şekil 5 ve 6); ALP enzimi düşük ve orta doz gruplarının 7. gününde ve tüm doz gruplarının 14. gününde (Şekil 7) kontrole göre önemli derecede artmıştır (p<0,05). CK enzimi ise tüm doz gruplarının 14. gününde kontrole göre artarken (Şekil 8), LDH enzimi de tüm doz gruplarının 7. gününde önemli derecede artmıştır (Şekil 9) (p<0,05). Diazinon'a maruz bırakılan *C. carpio* balıklarının GOT ve GPT değerlerinde (Ahmad, 2011), *Rutilus frisii* balıklarının ALP seviyesinde (Shamoushaki vd., 2012); triazofosun'a maruz bırakılan *Channa punctatus* balıklarının GPT, GOT ve ALP seviyelerinde (Naveed vd., 2011), Monokrotofos'a maruz bırakılan *C. punctatus* balıklarının GOT, ALP ve GPT değerlerinde (Agrahari vd., 2007); Roundup®'a maruz bırakılan *C. carpio* balıklarının LDH seviyesinde (Gholami vd., 2013); Sipermetrin'e maruz bırakılan *Rhamdia quelen* balıklarının ALP değerinde (Borges vd., 2007), *Oreochromis niloticus* türlerinin ALP ve LDH değerlerinde (Fırat vd., 2011); Deltametrin'e maruz bırakılan *O. niloticus* türünün ALP değerinde (El-Sayed vd., 2007); Karbaril ve Forat'a maruz bırakılan *Clarias batrachus* balıklarının ALP seviyesinde (Jyothi ve Narayan., 1999); Talstar EC 10'a maruz bırakılan *C. carpio* balığının CK seviyesinde (Velisek vd., 2009a) görülen artma bu çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Serumdaki GPT, GOT, ALP ve LDH gibi enzim aktivitelerinin artması bazı hücrel hasarlar olduğuna veya dokularda strese bağlı bozulmalar meydana geldiğine işaret etmektedir. Bununla beraber, karaciğerde oluşan hasara bağlı olarak da bu enzimlerin karaciğer sitosolundan sızdığı ve kana karışarak enzim aktivitelerini arttırabildiği belirlenmiştir (Fırat vd., 2011; El-Sayed vd., 2007; Velisek vd., 2009b; Naveed vd., 2011). Diğer yandan, serumdaki artan CK enzim değerleri kas lifleri veya diğer dokularda geçici bir hasar olabileceğine işaret etmektedir (Ozawa vd., 1999). Bu çalışmada tüm enzim aktivitelerinin yükselmesine bağlı olarak, propargiteye maruz bırakılan balıklarda karaciğerin olumsuz yönde etkilendiği sonucuna varılabilir.



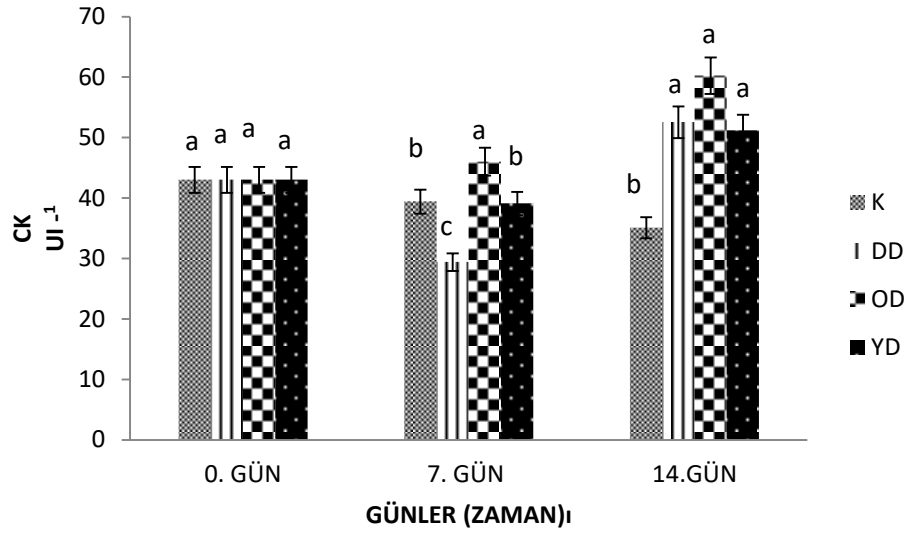
Şekil 5. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının GPT değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



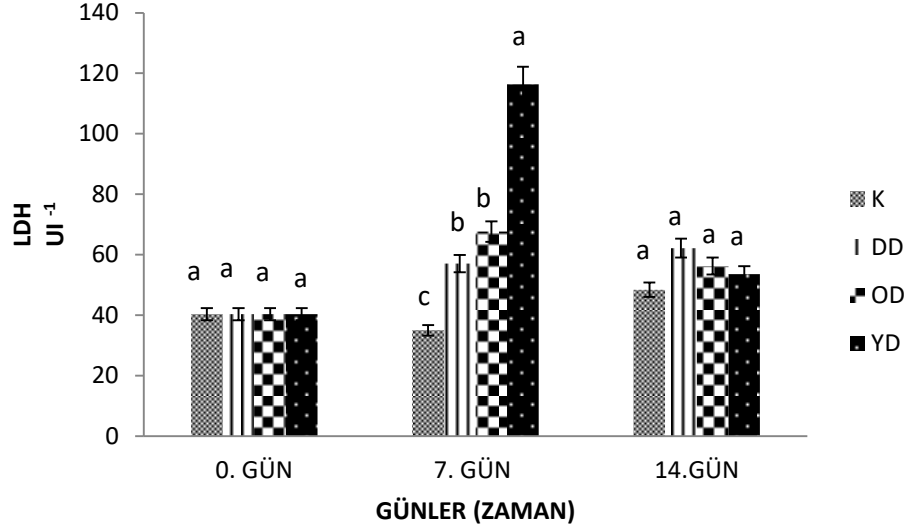
Şekil 6. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının GOT değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 7. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının ALP değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

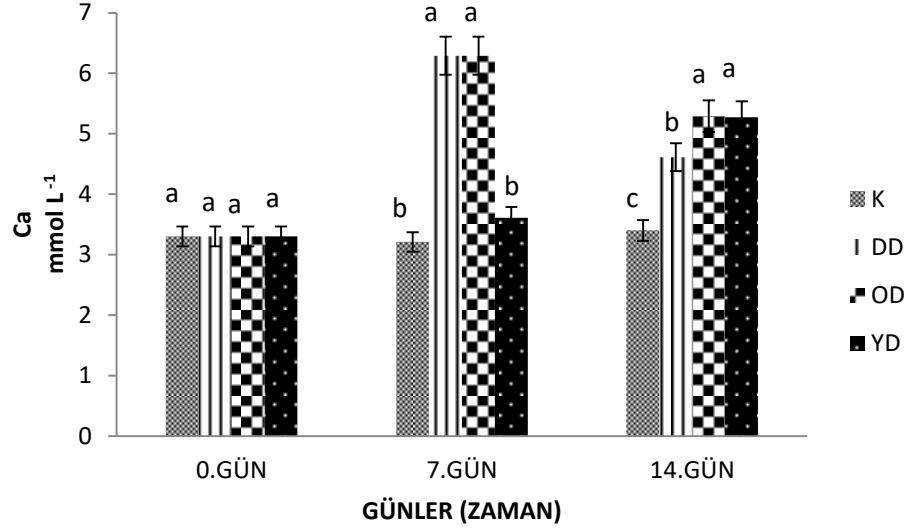


Şekil 8. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının CK değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

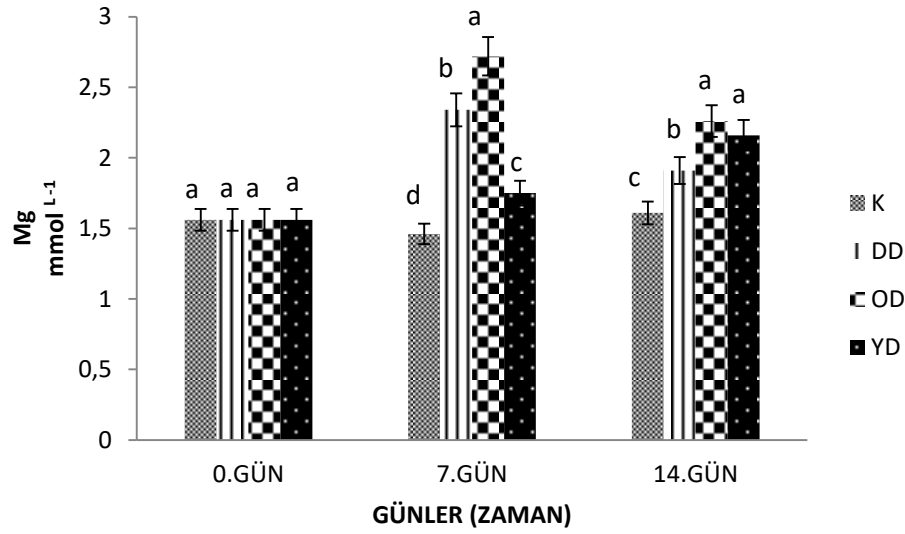


Şekil 9. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının LDH değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

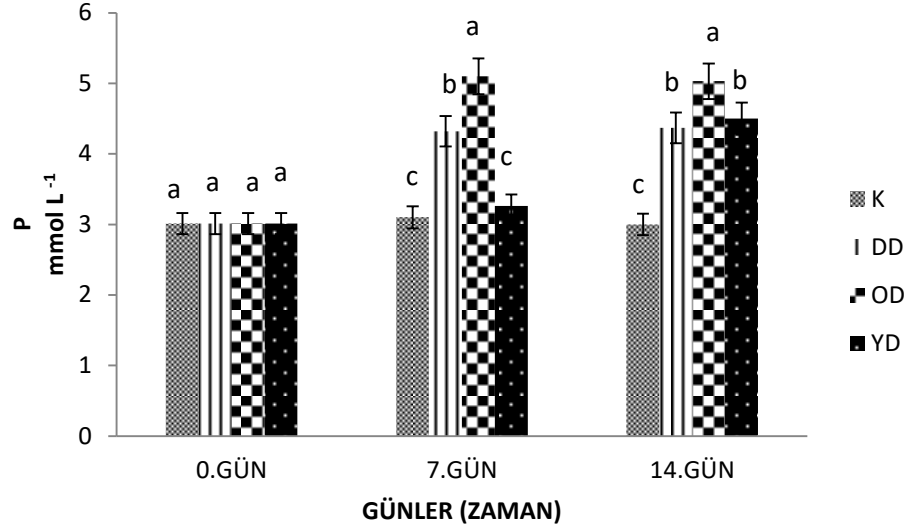
Çalışma sonrasında biyokimyasal parametrelerden olan serum elektrolit değerlerinde de bir takım değişimler meydana gelmiştir. Ca seviyesi 7. günde düşük ve orta doz gruplarında, 14. günde ise tüm doz gruplarında kontrole göre artış (Şekil 10) gösterirken Mg değeri 7. ve 14. günlerde tüm doz gruplarında (Şekil 11), P değeri düşük ve orta doz gruplarının 7. gününde, tüm doz gruplarının ise 14. gününde (Şekil 12), Cl seviyesi tüm doz gruplarının 7. gününde (Şekil 13) kontrole göre yükselme göstermiştir (p<0,05). Diğer yandan, Fe seviyesi düşük ve orta doz gruplarının 7. gününde, tüm doz gruplarının ise 14. gününde kontrole göre önemli bir azalma (Şekil 14) sergilemiştir (p<0,05). Benzer sonuçlar diazinon'a maruz bırakılan *R. frisii* balıklarının Fe değerinde (Shamoushaki vd., 2012), metribüzin'in ticari karışımı olan Sencor 70 WG maddesine maruz bırakılan *C. carpio* balıklarının Ca seviyesinde (Velisek vd., 2009b), sipermetrin'e maruz bırakılan *Rhamdia quelen* balıklarının Mg ve P değerlerinde (Borges vd., 2007), aldrin ve malathion'a maruz bırakılan *Heteropreustes fossilis* balıklarının Cl değerinde de görülmüştür. Ca seviyesindeki artışın bağırsak epitelyumu, karaciğer ve solungaçtaki histopatolojik hasara bağlı olarak gelişen sızıntı sonucu veya elektrolitlerin aktif atılım mekanizmasının zarar görmesi ile ilişkili olabileceği bildirilirken (Muralidharan, 2014), Mg ve P gibi serum elektrolitlerinde görülen artışın ise pestisitlerin böbrek, karaciğer ve kas yapılarında oluşturduğu hasarlar ile ilgili olabileceği rapor edilmiştir (Borges vd., 2007; Nieves-Puigdoller vd., 2007). İnhibe olmuş serum demir seviyeleri ise, fazla demirin karaciğere transfer edilmesi ve sonuç olarak kan birikiminde eksikliğe neden olması ile ilişkilendirilmektedir (Zhao vd., 2013). Cl seviyesindeki artma nedenine bakılacak olursa da bu durum genellikle dehidrasyonla açıklanmaktadır. Dolayısıyla pestisitlerin etkisine bağlı olarak balık vücudunda su kaybı olduğu da söylenebilir (Morrison, 1990).



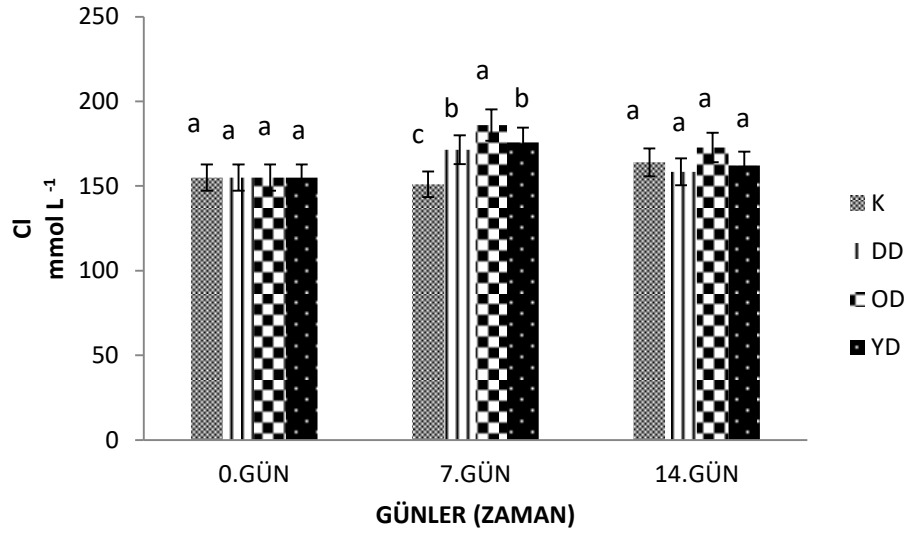
Şekil 10. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının Ca değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$).



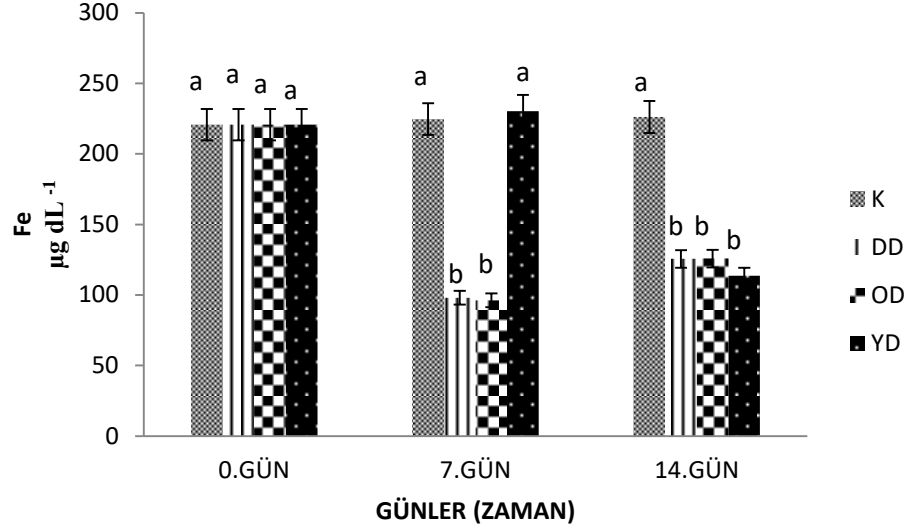
Şekil 11. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının Mg değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 12. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının P değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



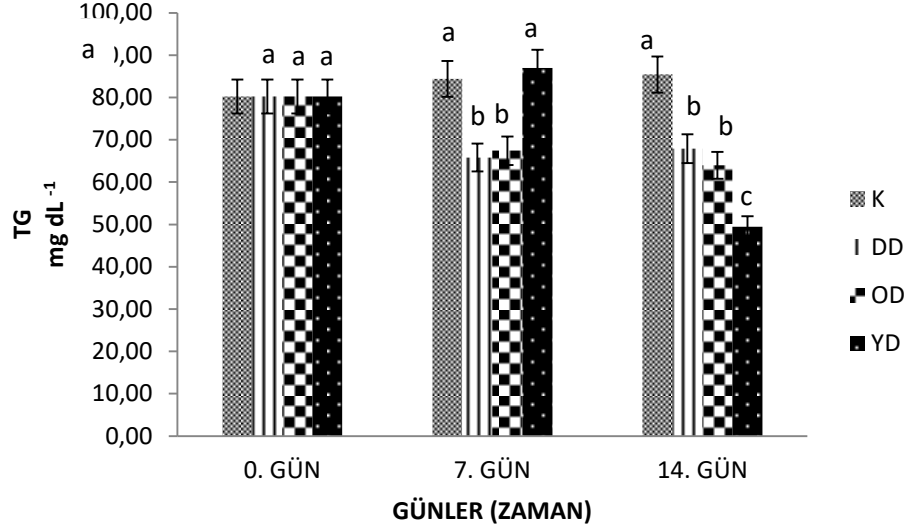
Şekil 13. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının Cl değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



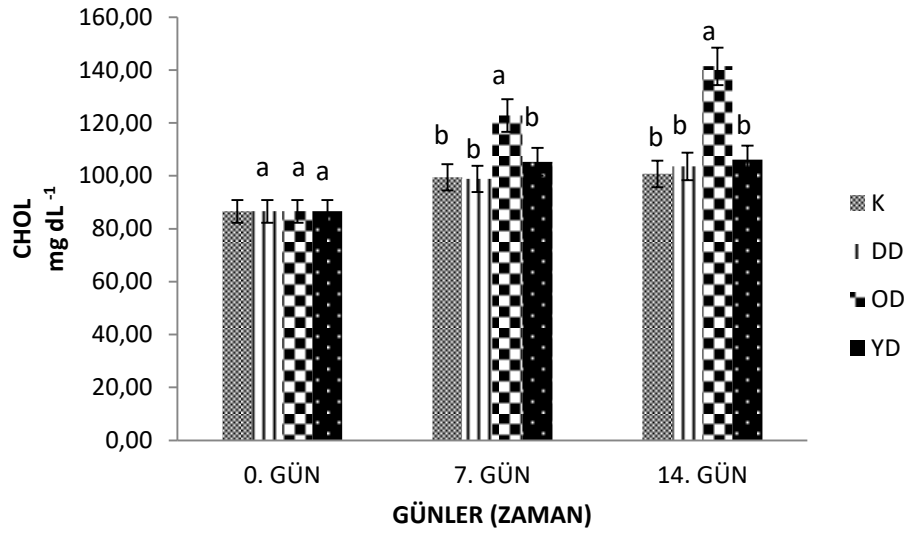
Şekil 14. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının Fe değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

Çalışma sonunda biyokimyasal parametrelerden serum yağ parametrelerinde de bir takım değişiklikler meydana gelmiştir. TG seviyesi düşük ve orta doz gruplarının 7. gününde, tüm doz gruplarının ise 14. gününde (Şekil 15) kontrol grubuna göre önemli derecede azalmıştır (p<0,05). CHOL seviyesi orta dozun 7. ve 14. günlerinde (Şekil 16) kontrole göre önemli derecede artmıştır (p<0,05). LDL değeri ise (Şekil 17) yüksek dozun 7. gününde kontrole göre azalırken (p<0,05), 14. günde orta ve yüksek doz gruplarında kontrole göre artmıştır (p<0,05). TG değerindeki azalma ve CHOL seviyesinde görülen artma sipermetrin'e maruz bırakılan *R. quelen* balıklarında da görülmüştür (Borges vd., 2007). Diğer yandan CHOL değerinde görülen artma deltametrin'e (El-Sayed vd., 2007) ve sipermetrin'e (Fırat vd., 2011) maruz bırakılan *O. niloticus* balıklarında da görülmüştür. TG değeri balığın beslenmesi ile ilgili durumunu ve lipid metabolizmasını değerlendirmek için kullanılmaktadır (Naveed vd., 2011). Diğer yandan, TG değerindeki azalmanın ve CHOL değerindeki artışın böbrek, karaciğer ve kas yapılarında oluşan fonksiyon bozukluklarının birer göstergesi olabileceği belirtilmiştir (Borges vd., 2007). Bununla beraber, CHOL değerinin balık büyüklüğü ile doğru orantılı bir biçimde yükseldiği rapor edilmiştir (Satheeshkumar vd., 2011). Bu çalışmada da benzer sonuçların elde edilmesine bağlı olarak sazan balıklarının böbrek, karaciğer ve kas dokularında bazı fonksiyon bozuklukları olabileceği düşünülmektedir.

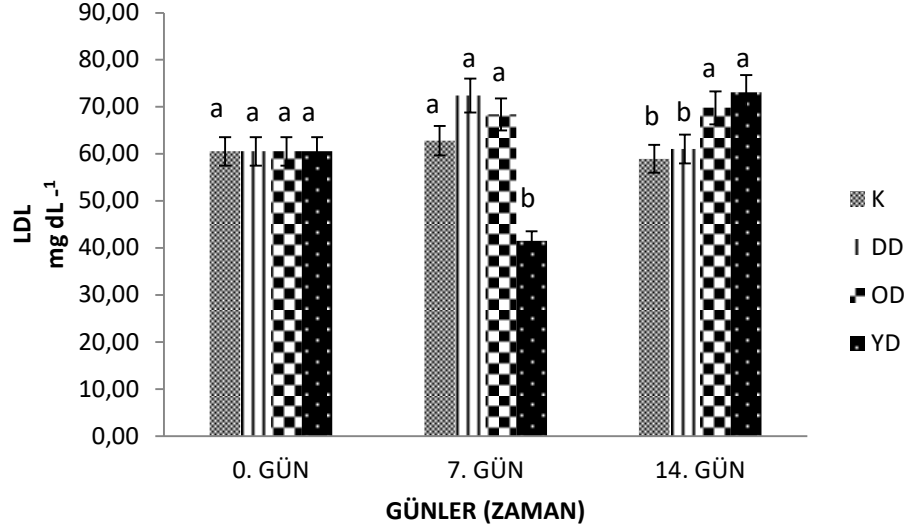
Son olarak propargite pestisitinin akuatik ortamlara topraktan sızma (yağmur, sel, erozyon vb.) ve havadan doğrudan püskürtülme yollarıyla bulaştığı düşünülmektedir. Bu çalışmayla beraber propargite pestisiti hakkında yeterli bilgi sunulduğu ve bu bilgiler ışığında ilgili kişilere faydalı olacağı düşünülmektedir.



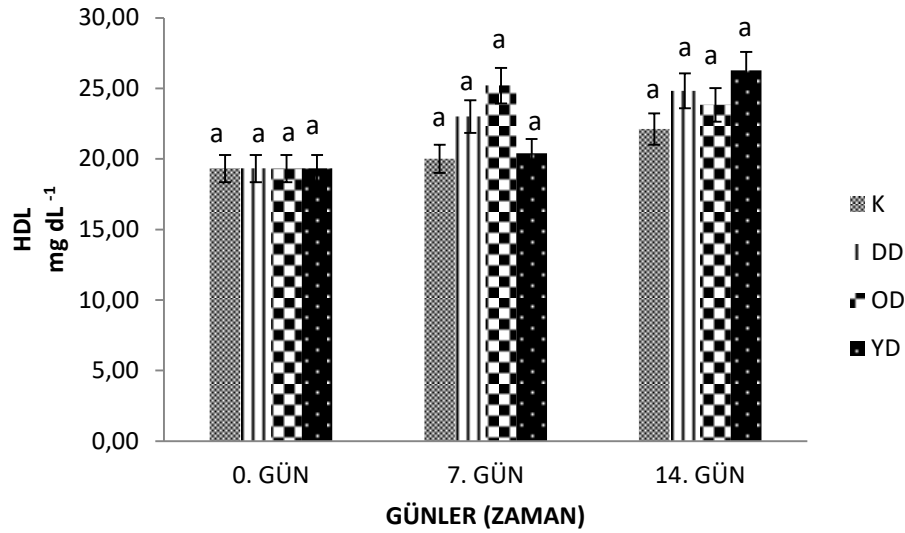
Şekil 15. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının TG değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 16. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının CHOL değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 17. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının LDL değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 18. Farklı propargite konsantrasyonlarına maruz bırakılan sazan balığının HDL değerleri. (K: 0, DD: 0,04125 mg L⁻¹, OD: 0,0825 mg L⁻¹, YD: 0,165 mg L⁻¹). Aynı parametre ve zamanda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

Teşekkürler: Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (BAP, 2011/072).

KAYNAKLAR

- Agrahari, S., Pandey, K.C., & Gopal, K. (2007). Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 268-272. doi: 10.1016/j.pestbp.2007.01.001
- Ahmad, Z. (2011). Acute toxicity and hematological change in common carp (*Cyprinus carpio*) caused by diazinon exposure. *African Journal of Biotechnology*, 10(63), 13852-13859. doi: 10.5897/ajb11.1247

- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., & Ahmadi, K. (2011). Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 1-6. doi: 10.1016/j.pestbp.2010.09.001
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Zanini, R., Amaral, F., Jurinitz, D.F., & Wassermann, G.F. (2007). Changes in hematological and serum biochemical values in jundia *Rhamdia quelen* due to sublethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere*, 69, 920-926. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.068
- Bricknell, I.R., Bowden, T.J., Bruno, D.W., MacLachlan, P., Johnstone, R., & Ellis, A.E. (1999). Susceptibility of atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). to infection with typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 175(1-2), 1-13. doi: 10.1016/s0044-8486(99)00025-3
- Chandrasekar, S., & N, Jayabalan. (1993). Hematological responses of the common Carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian Fisheries Science*, 6, 331-340.
- El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., & El-Bahr, S.M. (2007). Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24, 212-217. doi: j.etap.2007.05.006
- EPA. (2001). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Propargite. Alıntılanma Adresi, http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/propargite_red.pdf. (09.10.2015).
- Firat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F., & Kötemen, Y. (2011). A comparative study on the effects of a pesticide (Cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology Biochemistry*, 37, 657-666. doi: 10.1007/s10695-011-9466-3
- Funk, S. (2013). Propargite. Alıntılanma Adresi, [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation02\(propargiteevalij.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation02(propargiteevalij.pdf) (23.09.2014).
- Gholami-Seyedkolaei, S.J., Mirgavhefi, A., Farahmand, H., & Kosari, A.A. (2013). Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 135-141. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.011
- Giron-Perez, M.I., Barcelos-Garcia, R., Vidal-Charez, Z.G., Romero-Banuelos, C.A., & Robledo-Marengo, M.L. (2006). Effect of chlorpyrifos on the hematology and phagocytic activity of Nile tilapia cells (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16, 495-499. doi: 10.1080/15376510600751988
- Jyothi, B., & Narayan, G. (1999). Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn). *Food and Chemical Toxicology*, 37, 417-421. doi: 10.1016/s0278-6915(99)00020-4
- Kumar, N., Prabhu, P.A.J., Pal, A.K., Remya, S., Aklakur, Md., Rana, R.S., Gupta, S., Raman, R.P., & Jadhao, S.B. (2011). Anti-oxidative and immuno-hematological status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acute toxicity test of endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 45-52. doi: 10.1016/j.pestbp.2010.10.003
- Logan, M. (2010). *Biostatistical Design and Analysis Using r: A Practical Guide. A practical guide*. London: Wiley-Blackwell.
- Medlineplus. (2014). Albumin-blood (serum). Alıntılanma Adresi, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003480.htm> (07.08.2014).
- Morrison, G. (1990). Serum Chloride. Alıntılanma Adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK309/> (17.09.2014).
- Muralidharan, L. (2014). Impact of fenthion on ionic regulation in the blood of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linn). *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(1), 63-70. doi: 10.9790/2402-08116370
- Naveed, A., Venkaeshwarlu, P., & Janalah, C. (2011). Biochemical alteration induced by triazophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Annals of Biological Research*, 2(4), 31-37.
- Nieves-Puigdollor, K., Björnsson, B.T., & McCormick, S.D. (2007). Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquatic Research*, 2(4), 31-37. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.05.011
- Ozawa, E., Hagiwara, Y., & Yoshida, M. (1999). Creatine kinase, cell membrane and duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 190, 143-151. doi: 10.1007/978-1-4615-5543-8_18
- Pal, S.K., & Das Gupta, S.K. (1994). Pest Control, Alıntılanma Adresi, <http://www.icrisat.org/what-we-do/learning-opportunities/Isu-pdfs/sds.15.pdf> (12.08.2014).
- PAN. (2013). Propargite-Toxicity, Use, Water Pollution Potential. Ecological Toxicity and Regulatory Information. Alıntılanma Adresi, http://www.pesticideinfo.org/Detail_chemical.jsp?Rec_Id=PC34266#ChemID (14.02.2014).

- PMEP. (2013). Propargite (Omite, Comite) Chemical Fact Sheet 9/86. Alıntılanma Adresi, <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/Insect-mite/merinphos-propargite/propargite/insect-prof-propargite.html> (10.08.2014).
- Ramesh, M., & Saravanan, M. (2008). Haematological and biochemical responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to chlorpyrifos. *International Journal of Integrative Biology*, 3(1), 80-83.
- Sahiti, H., Bislimi, K., Dalo E., & Murati, K. (2018). Effect of water quality in hematological and biochemical parameters in blood of common carp, (*Cyprinus carpio*) in two lakes of Kosova. *Natural and Engineering Sciences*, 3(3), 323-332. doi: 10.28978/nessciences.468987
- Saravanan, M., Kumar, K.P., & Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 206-211. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.04.002
- Satyanarayan, S., Bejankimar, R.S., Chaudhan, P.R., Kotangale, J.P., & Satyanarayan, A. (2004). Impact of some chlorinated pesticides on the haematology of the fish *Cyprinus carpio* and *Puntius ticto*. *Journal of Environmental Sciences*, 16(4), 631-634.
- Sevcikova, M., Modra, H., Blahova, J., Dobsikova, R., Plhalova, L., Zitka, O., Hynek, D., Kizek, R., Skoric, M., & Svobodova, Z. (2016). Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. *Veterinari Medicina*, 61(1), 35-50. doi:10.17221/881-VETMED
- Shamoushaki, M.N., Soltani, M., Kamali, A., Imanpoor, M.R., Sharifpour, I., & Khara, H. (2012). Effects of organophosphate on some haematological and biochemical changes in *Rutilus frisii* Kutum (Kamensky, 1901) male brood stocks. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11(1), 105-117.
- Smith, C.J., Shaw, B.J., & Handy, R.D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82, 94-109. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.02.003
- Tulgar, A. (2014). Propargite (Akarisit)'nin Sublethal Dozlarının Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758)'nda Kan Parameterelerine Etkisi ve Kas Dokusundaki Birikimi. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye.
- Tulgar, A., & Çelik, E.Ş. (2015). Effects of sublethal concentrations of propargite to White blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). *Marine Science and Technology Bulletin*, 4(1), 13-17.
- Turner, L. (2002). Propargite Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Alıntılanma Adresi, <http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/Propargite-an-alysis.pdf> (25.10.2014).
- Val, A.L., De Menezes, G.C., & Wood, C.M. (1998). Red blood cell adrenergic responses in amazonian teleost. *Journal of Fish Biology*, 52, 83-93. doi: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb01554.x
- Vasantharaja, C., Pugazhendy, K., & Meenambal, M. (2012). Protective role of *Cardiospermum halicacabum* against the cypermethrin toxicity on the selected biochemical indices in serum activity in *Cirrhinus mrigala* (Hemilton). *Journal of Pharmacy Research*, 5(5), 2595-2598.
- Velisek, J., Dobsikova, R., Svobodova, Z., Modra, H., & Luskova, V. (2006). Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 76, 992-998. doi: 10.1007/s00128-006-1016-9
- Velisek, J., Svobodova, Z., & Machova, J. (2009a). Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 583-590. doi: 10.1007/s10695-008-9258-6
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., & Sudova, E. (2009b). Effects of acute exposure to metribuzin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 82, 492-495. doi: 10.1007/s00128-009-9648-1
- Xu, S. (2001). Environmental Fate of Propargite. Alıntılanma Adresi, <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/propargite.pdf> (08.07.2013).
- Zhao, Z., Zhang, L., Wu, J., & Fan, C. (2013). Residual levels, tissue distribution and risk assessment of organochlorine pesticides (OCPs) in edible fishes from Taihu Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 9265-9277. doi: 10.1007/s10661-013-3249-5

The Effects of Dietary Administration with High Level Red Pepper (*Capsicum annuum*) on Growth Performance, Coloration, Histology and Protection Against *Aeromonas sobria* in Yellow Tail Cichlid, *Pseudotropheus acei*

Nalan Özgür YİĞİT¹, Seval BAHADIR KOCA¹, Özlem ÖZMEN², Behire Işıl DİDİNEN¹, Seçil METİN^{1*}

¹Isparta Applied Sciences University, Eğirdir Fisheries Faculty, Isparta, Turkey

²Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Burdur, Turkey

Corresponding Author: secil_ekici@yahoo.com

Research Article

Received 19 February 2019; Accepted 24 April 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Yiğit, N. Ö., Bahadır Koca, S., Özmen, Ö., Didinen, B. I., & Metin, S. (2019). The effects of dietary administration with high level red pepper (*Capsicum annuum*) on growth performance, coloration, histology and protection against *Aeromonas sobria* in yellow tail cichlid, *Pseudotropheus acei*. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 340-346. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.529007>

Abstract

The present study was conducted to determine the effects of high level red pepper supplementation to diet on the growth performance, coloration, histology, intestinal microflora and protection against *Aeromonas sobria* in yellow tail cichlid (*Pseudotropheus acei*). Two isonitrogenous (37% crude protein) and isocaloric (3831 kcal/kg Gross energy) experimental diets were prepared by adding of 15% pepper meal to control diet. The feeding trial was conducted in triplicate for 90 day in aquariums (80 L). At the beginning of the experiment, twenty fish (initial weight 0.06 g) were stocked into each aquarium. The end of the experiment, fish fed red pepper supplemented to diets did not have any marked effect on the weight gain, feed conversion ratio, specific growth rate and survival. However, tail of fish fed diet containing red pepper was showed increase significantly in pigmentation. High level red pepper addition to diet caused no pathological findings in any organs. Red pepper didn't observed significant differences for protection to *A. sobria* infection. However, *Aeromonas* and *Pseudomonas* counts in red pepper group were significantly lower than control groups.

Keywords: *Pseudotropheusacei*, red pepper, growth performance, coloration, histology, disease resistance, *Aeromonas sobria*

Sarı Kuyruk Çiklit balığı, *Pseudotropheus acei*, Yemlerine Yüksek Seviyede Kırmızı Biber İlavesinin Büyüme Performansı, Renklenme, Histoloji ve *Aeromonas sobria*'ya Karşı Korunma Üzerine Etkileri

Özet

Bu çalışma, sarı kuyruk ciklit, *Pseudotropheus acei*, balıklarının yemlerine yüksek seviyede kırmızı biber ilavesinin büyüme performansı, renklenme, histoloji, bağırsak mikroflorası ve *Aeromonas sobria*'ya karşı hastalık direnci üzerine etkilerini belirlemek için yürütülmüştür. Kontrol yemine % 15 oranında biber unu eklenerek İki izonitrojenik (% 37 ham protein) ve izokalorik (3831kcall / kg toplam enerji) deneme yemleri hazırlanmıştır. Besleme denemesi, akvaryumlarda (80 L) üç tekrerrir olacak şekilde 90 gün beslenerek yürütülmüştür. Denemenin başında, her akvaryuma yirmi balık (başlangıç ağırlığı 0.06 g) stoklanmıştır. Deneme sonunda,yemlere kırmızı biber ilavesi ile beslenen balıkların ağırlık kazancı, yem dönüşüm oranı, spesifik büyüme oranı ve yaşama oranı üzerine önemli bir etkisi olmamıştır. Ancak, kırmızı biber içeren yemlerle beslenen balıkların kuyruğunda pigmentasyonun önemli derecede arttığı görülmüştür. Yemlere yüksek seviyede kırmızı biber eklenmesi hiçbir organda patolojik bir bulguya neden olmamıştır. Kırmızı biber, *A. sobria* enfeksiyonuna karşı korumada önemli bir farklılık göstermemiştir. Kırmızı biber grubunda *Aeromonas* ve *Pseudomonas* sayıları kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Pseudotropheus acei*, kırmızı biber, büyüme performansı, renklenme, histoloji, hastalık direnci, *Aeromonas sobria*

INTRODUCTION

Ornamental fish keeping is one of the most popular hobbies in the world today. The growing interest in aquarium fishes has resulted in steady increase in aquarium fish trade globally. The cichlid fish (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840) is one of the most preferred species in the world. *Pseudotropheus acei*, also known as yellow tail cichlid of Lake Malawi in Africa, is popular among ornamental fish hobbyists, due to its vibrant coloring (Smith, 2000).

Coloration in the aquarium fish is one of major factors which determine the price of fish in the market. In addition, pigmentation of aquatic fish may also directly indicate its healthiness and quality. Fish can't synthesize pigment substances by themselves, and must obtain from their diet. Hence, there is a direct relationship between coloration of fish and carotenoids in the diet (Halten et al., 1997).

Aeromonas species is the most common bacterial disease in freshwater aquarium fish (Lewbart, 2001). Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) is associated with infections caused by *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, and *A. caviae*. *A. hydrophila* is the predominant causative agent of MAS. These pathogens exist worldwide in fresh and brackish waters and occasionally in salt water and they have a diverse host range. Motile *Aeromonas* spp. is considered as opportunistic pathogens and could easily found in organically rich waters. Thus, stress and poor water quality play a key role in occurrence (Öztürk and Altınok, 2014).

Red pepper is plant sources which are cheap, abundant in market and carotenoids rich. Red pepper contains the xanthophylls, capsanthin and capsorbin which make up the largest pigments percentage (Curl, 1962, Gregory et al., 1987, Rizk and Tolba, 2002). In the study, one of the most promising alternatives fish pigmentation is red pepper (Harpaz and Padowicz 2007; Kop et al., 2010, Lee et al., 2010, Yılmaz and Ergün 2011).

The aim of this study is to determine the effect of red pepper on growth and coloration, resistance against *A. sobria* and histology in yellow tail cichlid, *P. acei*.

MATERIALS and METHODS

Experimental diets and feeding trial

Experiment diets were prepared by adding of %15 red pepper to control diet (without red pepper). Diet ingredients and nutrient compositions used in the experiment are shown in Table 1. Diets were isonitrogenous (37% crude protein) and isocaloric (3831kcall/kg Gross energy). Red pepper was obtained from local market. Red pepper flour is prepared by drying and grinding at room temperature of red pepper. Flour and other ingredients were ground to a small particle size in a mill. All ingredients homogenous were mixed. Water was added to obtain a 25% moisture level. Diets were passed through a mincer with a 1.5 mm sieve. Then, diets were dried for 24 h in room temperature. After drying, the diets were broken into 1.5 mm granules. All granule diets were stored at +4°C until used. Protein content was determined by the Kjeldahl method, fat by the chloroform-methanol extraction method (Bligh and Dyer, 1956), and ash and moisture by standard methods (AOAC, 1990).

Table 1. Diet ingredients and nutrient compositions of diet used in the experiment

	Control	15 % red pepper
Fish meal	35	35
soybean meal	20	20
Wheat flour	35	20
Red pepper	0	15
Oil	7	7
Vitamin ¹	2	2
Mineral ²	1	1
Chemical analysis		
Crude protein (%)	37.13	37.21
Crude fiber (%)	1.81	2.36
Crude fat (%)	10.91	11.95
Crude ash (%)	9.61	9.76
Total carotenoid	0.00	120.30
Gross Energy (kcal/kg)	3831	3831

¹Vitamin premix contained the following per kilogram; 4 000 000 IU vitamin A, vitamin D3 480 000 IU, 2400 mg vitamin E, 2400 mg vitamin K3, 4000 mg vitamin B1, 6000 mg vitamin B2, 4000 mg Niacin, 10 000 mg Cal. D. Pantothenate, 4000 vitamin B6, 10 mg vitamin B12, 100 mg D-Biotin, 1200 mg folic acid, 40 000 mg vitamin C, 60 000 mg inositol.² Mineral premix contained the following per kilogram; 23 750 mg manganese, 75 000 mg zinc, copper 5000 mg, cobalt 2000 mg, iodine 2750 mg, selenium 100 mg, magnesium 200 000 mg.

Fish and experimental conditions

The feeding trial was conducted in aquarium (80L), for 90 days. Twenty fish (0.06 g weight) were stocked in separate aquarium as 3 replicates for each experimental feed. Experimental groups were fed by hand, *ad libitum* twice daily. The aquariums were cleaned by siphoning out the residual feed and feces. The water temperature ranged between 23 - 25 °C. The dissolved oxygen rate ranged from 5 to 7 mg L⁻¹.

Colour assessment

Tail and skin colour assessment was performed by minolta chroma meter CR-300 calibrated towards a white standard; L: lightness, 100 L: white, 0 L: black, a: red, -a: green, b: yellow, -b: blue (Sharma, 2003). Skin and tail color was measured under anesthesia (40 mg L clove oil) from fish in each aquarium.

Histopathological examination

All visceral organ specimens were collected and fixed in 10% neutral formalin during the necropsy. After routine processing by automatic tissue processing equipment (Leica ASP300S, Leica Microsystem, Nussloch, Germany), samples embedded in paraffin and 5µm sections were taken by a Leica RM 2155 rotary microtome (Leica Microsystem, Nussloch, Germany). Then sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under the 40X objective of an Olympus CX41 light microscope. Morphometric evaluation and microphotography was performed using the Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Bacterial challenge

Pathogen *A. sobria* strain was isolated from in yellow tail cichlid during the previous study. *A. sobria*, was grown for 24 hr at 25°C in Tryptic Soy Agar. After incubation, the cells were harvested by centrifugation (2,000 × g), washed with PBS and re-suspended in the same buffer. The number of bacteria was standardized at 600 nm absorbance. After 90 days of feeding, 10 fish (0.4g) from experimental group and control group fish were challenged with *A. sobria* resulting in a dose of 10⁷ cfu ml⁻¹ by immersion bath at 1 h. Mortality recorded for a period of 15 days. Cumulative mortalities were calculated on the last day of the trial. *A. sobria* were reisolated from the kidney, liver and spleen of freshly dead fish after the mortalities.

Intersinal microflora

Collections of samples for intestinal microflora determination of yellow tail were done at the end of the experiment. Eight fish randomly collected from each groups were used for total bacteria, *Aeromonas* and *Pseudomonas* counts in fish intestine. Individual fish was scooped out of the holding vessel, euthanized by MS222. The external areas of each fish were then thoroughly disinfected with 70 % ethyl alcohol before the intestine of fish were aseptically dissected and separately homogenized in 9 volumes of sterile peptone water. Each of the homogenates were serially diluted (up to 10⁻⁷) and each diluted sample (100 µl) was spread in duplicate on Plate count agar for total bacteria count, *Aeromonas* Medium Base for *Aeromonas* count and *Pseudomonas* medium for *Pseudomonas* count. Then plates were incubated at 30 °C for 48 h for total bacteria count and 25 °C for 48 h for *Aeromonas* and *Pseudomonas* counts. The colonies were counted and the colony forming units (CFU) per gram of intestinal content were calculated.

Statistical analyses

Trial result of fish fed red pepper in diet are presented as mean±SE and subjected to independent-samples t-test for determining significant differences between treatment means (SPSS, 2000).

RESULTS

Growth parameters and FCR displayed no significant differences with addition of red pepper (Table 2). Growth performance and FCR with the addition of red pepper to the diet did not show any significant difference (P > 0,05).when compared to the control group (Table 2). No mortality was associated with experimental treatments.

Table 2. Growth performance, FCR, specific growth rate, weight gain and survival rate of *P. acei* fed diets containing red pepper

	Control	Red pepper	P
Initial mean weight (g)	0.064±0.005	0.067±0.004	0.328
Final mean weight (g)	0.401±0.002	0.403±0.001	1.00
Weight gain	0.337±0.005	0.336±0.003	0.12
SGR(% day ⁻¹)	1.627±0.067	1.595±0.049	0.189
FCR	1.80±0.025	1.79±0.007	0.267
Total length	3.08±0.11 ^a	3.38±0.83 ^b	0.027
Condition factor	1.32±0.05	1.11±0.04	0.123
Survival rate (%)	100	100	

^{a-b}: Values in the line having the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).

Skin and tail color measurements of fish fed diets containing red pepper is shown in Table 3. and figure 1. The end of the experiment, L* (lightness), b* (yellow color) and -b* (blue color) values on tail and skin of fish with addition red pepper to diet did not show any statistically significant difference. The a* (red color) values on tail of fish fed red pepper were significantly higher than those of the control. The a* values only showed statistically significant different on the body coloration of fish.



Figure 1. fish fed with control and pepper.
Left: fish fed with control, right: fish fed with pepper

Table 3. Skin and tail color measurements of fish fed diets containing pepper for 90days.

		Control	Red pepper
Tail	L	72,39±1,41	73,96±3,23
	a	1,43±0,17 ^a	6,26±0,29 ^b
	b	11,82±0,84	13,05±1,27
Skin	L	54,59±1,69	52,06±2,42
	a	2,00±0,27 ^a	3,61±0,37 ^b
	b	-2,00±0,32	-3,32±0,77

^{a-b}: Values in the line having the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).

Histopathological examination of the hepatopancreases revealed that while moderate lipidosis observed in control group, pepper addition decreased the lipidosis (Figure. 1). At the histopathological examination of the ovaries, there were no differences observed between the groups (Figure.2). No marked differences were also noticed between the groups. Red pepper addition on fish diet caused no pathological findings in any organs. Only decrease in lipidosis was seen in hepatopancreases of red pepper added group.

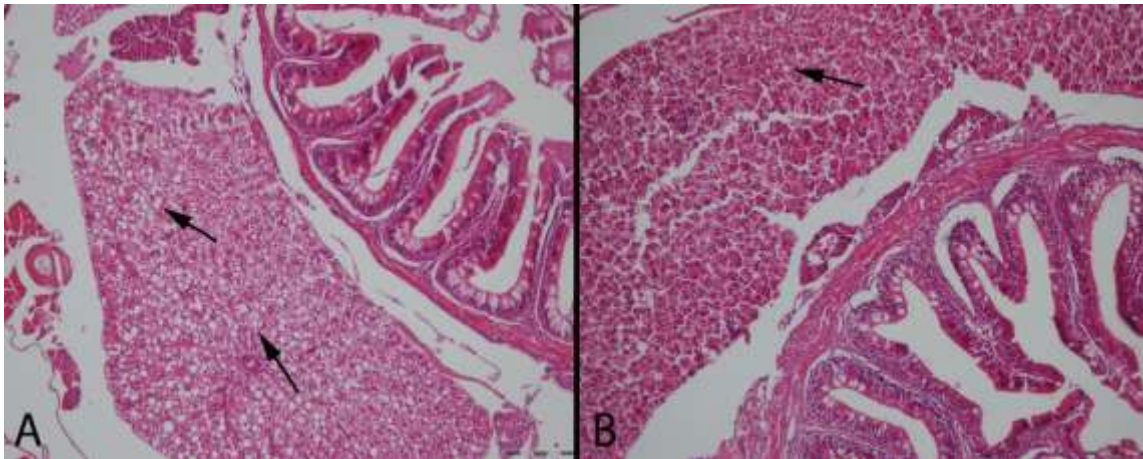


Figure 1. Microscopical appearance of the hepatopancreases between the groups. (A) Moderate lipidosis in control group and (B) only slight lipidosis in pepper group. HE, Bars= 100µm.

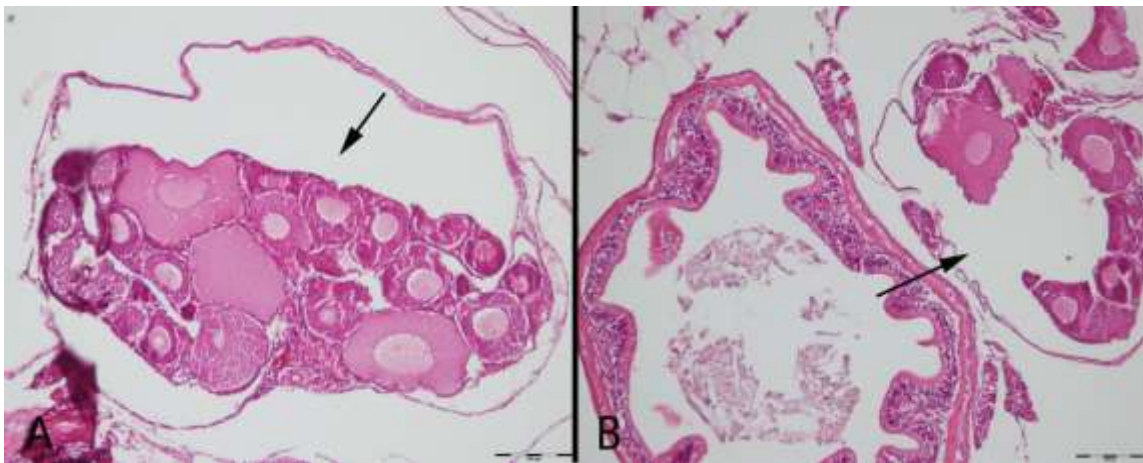


Figure 2. Histopathological appearance of the ovaries (A) control and (B) Pepper group. Similar activity and appearance between the groups (arrows), HE, Bars= 100µm.

Cumulative mortalities after challenging with *A. sobria* were 60 and 55 % in fish fed red pepper and control group, respectively. However, no significant differences ($p > 0.05$) were observed among mortalities in groups.

Total bacteria counts in intestinal microflora were found similar between red pepper and control groups. However, *Aeromonas* and *Pseudomonas* counts in red pepper group were significantly lower than control groups (Table 4).

Table 4. Intestinal microflora in yellow tail cichlid fed with red pepper and control (cfu/gx10⁵)

	Control	Red pepper	P
Total bacterial counts	0,61±0,01 ^a	1,90±0,58 ^b	0.04
Aeromonas counts	1,15±0,15 ^a	0,25±0,05 ^b	0.00
Pseudomonas counts	1,15±0,05 ^a	0,15±0,05 ^b	0.00

^{a-b}. Values in the line having the same superscript are not significantly different ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Addition of red pepper meal to diet of *P. acei* did not affect growth performance and FCR. Similarly, addition of red pepper and carrot to diet of cichlid (*Cichlasomaseverum*) did not exhibit any distinctions in FCR and growth (Kop et al., 2010). Sea bream fed with diet containing 3% red pepper did not affect growth and feed utilization (Wassef et al., 2010). In contrast, growth performance was

significantly improved in *O. mossambicus* fed 1.5% sweet pepper (paprika) extracted from *Capsicum annuum* (Yılmaz et al., 2013). Addition of 3.8% and 7.6% red pepper to diet improved growth performance of rainbow trout (Diler et al., 2005). Büyükçapar et al. (2007) informed that addition level of 6.6% or higher red pepper into the rainbow trout diet had negative effects on growth performance.

Tail color of fish increased as visually with addition of 15 % red pepper to diet in the present study. However, the addition of red peppers to diet affected on red color in body coloration of fish. But, this effect was understood from statistically data detected by device. This red color change was not observed as visually in blue areas of fish body. Similar findings were obtained in studies conducted in different species. Yılmaz and Ergün (2011) informed that 2% and 5% red pepper (*C. annuum*) in diet is an appropriate dietary level to ensure good pigmentation in blue streak hap. Harpaz and Padowicz (2007) noted that addition of 60 mg pepper (capsicum) extract per kg to diet is sufficient to obtain good coloration in dwarf cichlid, *M. ramirezi*. Kop et al. (2010) informed that addition of red pepper and carrot to provide 50 mg (5 %) of total pigments kg⁻¹ in diet have an impact on coloration of cichlid (*Cichlasoma severum*) diet. Pale chub fed with diet containing 8% paprika could improve skin pigmentation without any adverse effect on growth performance (Lee et al., 2010). Büyükçapar et al. (2007) showed that most appropriate dietary doses of red pepper for pigmentation of rainbow trout are 4.4%

This study showed that high level red pepper addition to fish diet caused no pathological findings in any organs. So far as we know, effect on organs histopathology of red pepper use in fish diet has not been studied. So far as we know, there is no study effect on organs histopathology of red pepper use for fish. Nwaopar et al., (2008) observed that there was no effect on the kidney of rabbit fed red pepper. Again, Nwaopara et al., (2007) show that the excessive consumption of red pepper in rat can cause necrosis of liver hepatocytes and therefore acute hepatitis.

In the present study, red pepper did not effect on survival rates in yellow tail cichlid after experimental *A. sobria* infection. However, the aqueous *Azadirachta indica* leaf extract has been tested against *A. hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio* and the results showed that this plant could effectively control *A. hydrophila* infection in *C. carpio* (Harikrishnan et al., 2003). Similar results were reported in *Labeo rohita* fingerlings fed with *Magnifera indica* (Sahu et al., 2007); in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with dry leaf powder and ethanol extract of *Psidium guajava* leaf (Pachanawan et al., 2008) and fed with two Chinese medicine herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) (Ardo et al., 2008); in Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) fed with stinging nettle (*Urtica dioica*) (Ngugi, et al., 2015).

In this study can be concluded that high level of red pepper in diet is suitable use for increases coloration in tail of fish without adversely affecting growth and health of *P. acei*. However, red pepper administration did not provide protection against *A. sobria* infection.

REFERENCES

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Assoc. Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., & Jeney, G. (2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275(1-4), 26-33.
- Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959). Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Büyükçapar, H. M., Yanar, M., & Yanar, Y. (2007). Pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with carotenoids from Marigold flower (*Tagetes erecta*) and red pepper (*Capsicum annuum*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(1), 7-12.
- Curl, A. L. (1962). Red pepper carotenoids, the carotenoids of red bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10(6), 504-509.
- Diler, I., Hossu, B., Dilek, K., Emre, Y., & Sevgili, H. (2005). Effects of natural and synthetic pigments in diets on flesh coloration and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). 57(3), *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 175-184.
- Gregory, G.K., Chen, T.S., & Philip, T. (1987). Quantitative analysis of carotenoids and carotenoid esters in fruits by HPLC: Red bell pepper. *Journal of Food Sciences*, 52 (4), 1071–1073.

- Halten, B., Armmesan, A., Jobling, M., & Bjerkgeng, B. (1997). Carotenoid pigmentation in relation to feed intake, growth and social integration in Arctic char, *Salvelinus alpinus*(L.), from two anadromous strains. *Aquaculture Nutrition*, 3, 189–199.
- Harpaz, S., & Padowicz, D. (2007). Color enhancement in the ornamental dwarf cichlid *Microgeophagusramirezi* by addition of plant carotenoids to the fish diet. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 59(4), 195-200.
- Harikrishnan, R., Rani, M. N., & Balasundaram, C. (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*, 221(1-4), 41-50.
- Kop, A., Durmaz, Y., & Hekimoglu, M. (2010). Effect of natural pigment sources on colouration of cichlid. *Journal of Animal and Veterinary, Advances*, 9, 566-569.
- Lee, C. R., Pham, M. A., Lee, S. M., Lee, C. R., & Pham, M. A. (2010). Effects of dietary paprika and lipid levels on growth and skin pigmentation of pale chub (*Zacco platypus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(6), 724.
- Lewbart, G.A., (2001) Bacteria and ornamental fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10, 48–56
- Ngugi, C. C., Oyoo-Okoth, E., Mugo-Bundi, J., Orina, P. S., Chemoiwa, E. J., & Aloo, P. A. (2015). Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 44(2), 533-541.
- Nwaopara, A. O., Odike, M. A. C., Inegbenebor, U., & Adoye, M. I. (2007). The combined effects of excessive consumption of ginger, clove, red pepper and black pepper on the histology of the liver. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(6), 524-527.
- Nwaopara, A. O., Odike, M. A. C., Inegbenebor, U., Nwaopara, S. O., & Ewere, G. I. (2008). A comparative study on the effects of excessive consumption of ginger, clove, red pepper and black pepper on the histology of the Kidney. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(2), 287-291.
- Öztürk, R. Ç., & Altınok, İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 275-297.
- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., & Rattanachaikunsopon, P. (2008). Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of bioscience and bioengineering*, 106(5), 419-424.
- Rizk, E.M., & Tolba, K.H. (2002). Isolation and stabilization of carotenoids from sweet red pepper and utilization as food colorants. *Arab Universities Journal of Agricultural Science*, 10 (1), 221–234.
- Sahu, S., Das, B. K., Pradhan, J., Mohapatra, B. C., Mishra, B. K., & Sarangi, N. (2007). Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish & shellfish immunology*, 23(1), 109-118.
- Sharma G., 2003. *Digital Color Imaging Handbook*. CRC Press LLC, FL. 764 pp.
- SPSS. 2000. *SPSS for Windows Base System User's Guide*, release 10.0. Chicago,
- Smith M.P., (2000) *Lake Malawi Cichlids*. Barron's Educational Series, Inc., New York, 95 p.
- Wassef, E. A., Chatzifotis, S., Sakr, E. M., & Saleh, N. E. (2010). Effect of two natural carotenoid sources in diets for gilthead seabream, *Sparus aurata*, on growth and skin coloration. *Journal of Applied Aquaculture*, 22(3), 216-229.
- Yılmaz, S., & Ergün, S. (2011). Effect of red pepper (*Capsicum annum*) on pigmentation of blue streak hap (*Labidochromis caeruleus*). *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 63,1-6.
- Yılmaz, S., Ergün, S., & Soytaş, N. (2013). Enhancement of growth performance and pigmentation in red *Oreochromis mossambicus* associated with dietary intake of astaxanthin, paprika, or capsicum. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 65,1-6.

Edremit Körfezi'nde Dağılım Gösteren Beş Kırlangıç Balığı (Triglidae) Türünün Besin Tercihleri

Dilek İLHAN 

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İzmir.

Sorumlu Yazar: dilek.ilhan@ege.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 20 Şubat 2019; Kabul 22 Mayıs 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: İlhan, D. (2019). Edremit Körfezi'nde dağılım gösteren beş kırlangıç balığı (Triglidae) türünün besin tercihleri. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 347-353. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.529907>

Özet

Bu çalışmada, Eylül 1999-Ağustos 2000 tarihleri arasında Edremit Körfezi (Ege Denizi)'nden trol örneklemeleri ile toplanan beş kırlangıç balığı türünün (*Chelidonichthys lucerna*, *Chelidonichthys lastoviza*, *Eutrigla gurnardus*, *Lepidotrigla cavillone*, *Trigla lyra*) besin kompozisyonu araştırılmıştır. Toplamda 1205 adet bireye ait mide içeriği (262 *C. lucerna*, 300 *C. lastoviza*, 300 *E. gurnardus*, 300 *L. cavillone* ve 43 *T. lyra*) incelenmiştir. Mide içeriklerindeki besin maddeleri yüzde sayısal varlık (%n), yüzde bulunış frekansı (%f), ve yüzde baskınlık (%d) olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta, tüm türlerin diyetinde toplam 19 besin çeşidi belirlenmiş olup, Polychaeta, Crustacea, Mollusca, Echinodermata ve Teleostei olmak üzere beş temel besin grubu içinde sınıflandırılmıştır. Mide içeriği incelemeleri, tüm türler için genel besin tercihinin Crustacea'ler olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Triglidae, mide içeriği, beslenme, Edremit Körfezi.

Food Preferences of the five gurnard species (Triglidae) in Edremit Bay

Abstract

In this study, the food composition of the five gurnard species (*Chelidonichthys lucerna*, *Chelidonichthys lastoviza*, *Eutrigla gurnardus*, *Lepidotrigla cavillone*, *Trigla lyra*) from Edremit Bay (Aegean Sea), collected by trawl surveys in September 1999-August 2000, were investigated. A total of 1205 stomach contents (262 *C. lucerna*, 300 *C. lastoviza*, 300 *E. gurnardus*, 300 *L. cavillone* and 43 *T. lyra*) were analyzed. The percentage numerical abundance (n%), percentage frequency of occurrence (f%), and percentage dominance (d%) prey types in the stomach contents were evaluated. Consequently, 19 food items were identified in the diet of all species and classified into five main categories: Polychaeta, Crustacea, Mollusca, Echinodermata and Teleostei. Stomach content analysis revealed that a common dietary preference for all species is Crustaceans.

Keywords: Triglidae, stomach contents, feeding, Edremit Bay.

GİRİŞ

Trofik ilişkiler hayvan topluluklarındaki biyolojik etkileşimleri anlamının temelini oluşturur (Carrassón ve Cartes, 2002). Dolayısıyla, türlerin beslenmeleri ile ilgili bilgiler gerek balıkçılık yönetimi gerekse ekolojik ilişkilerin anlaşılması açısından son derece önemlidir.

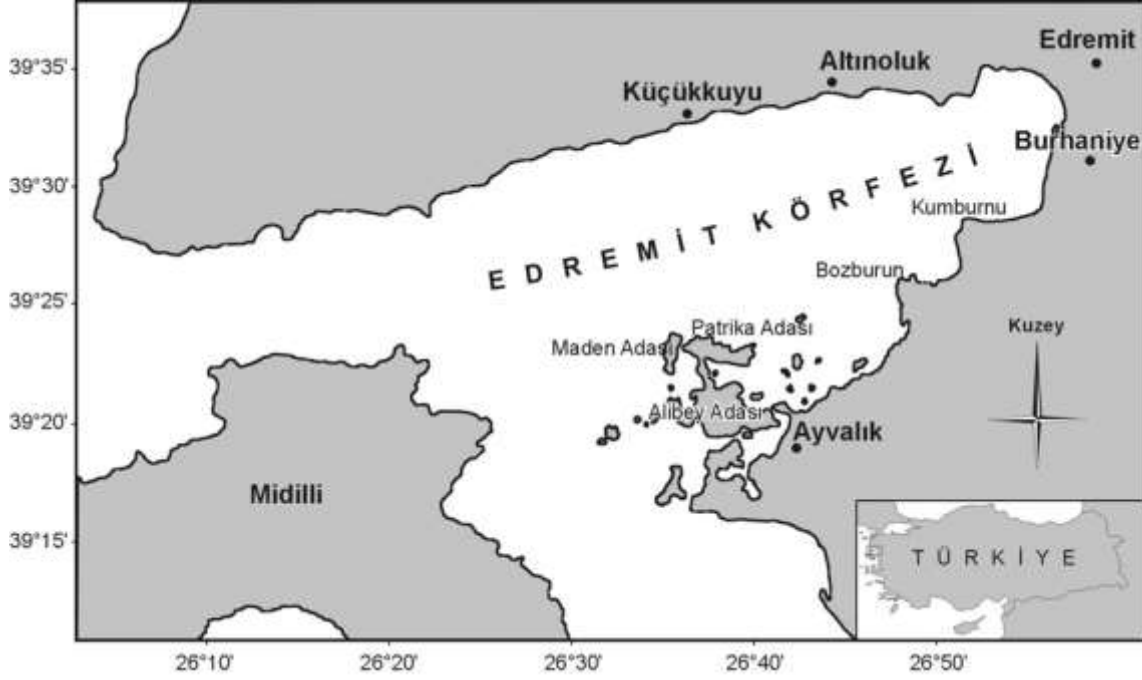
Araştırma materyalimizi oluşturan Triglidae familyası dünya denizleri ve ülkemizde farklı araştırmalara konu olmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda bu familyaya ait Akdeniz'de sekiz (Ben-Tuvia, 1953; Tortonese, 1975; Hureau, 1986; Fischer vd., 1987) Karadeniz'de ise üç (Slastenenko, 1955-1956) türün bulunduğu tespit edilmiştir.

Kırlangıç balıklarının biyolojisi üzerine yapılan çok sayıda çalışmanın yanı sıra, familya üyelerinin beslenme özelliklerini içeren özellikle Akdeniz'de yapılmış çalışmalar mevcuttur (Frogli, 1976; Moreno ve Matallanas, 1983; Jardas ve Zupanovic, 1983; Caragitsou ve Papaconstantinou, 1990; de Gee ve Kikkert, 1993; Moreno-Amich, 1994; Caragitsou ve Papaconstantinou, 1994; Colloca vd., 1994; Morte vd., 1997; Labropoulou ve Machias, 1998; Serena vd., 1998; Tetrats vd., 2000; Weinert vd., 2010; Vallisneri vd., 2011; Stagioni vd., 2012; Vinogradov vd., 2014; Montanini vd., 2017).

Ülkemiz denizlerinde ise bu familya türlerinin beslenme özellikleri ile ilgili çok az sayıda çalışma yer almaktadır (Toğulga vd., 2000; İçemer vd., 2002). Dolayısıyla, bu konudaki eksikliği gidermek ve Triglidae familyasının üçü ekonomik öneme sahip beş türünün (*Chelidonichthys lucerna*, *Chelidonichthys lastoviza*, *Eutrigla gurnarduss*, *Lepidotrigla cavillone*, *Trigla lyra*) Edremit Körfezi'ndeki besin kompozisyonlarını tespit etmek amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Araştırma materyalimizi oluşturan Triglidae familyasının 5 türüne ait örnekler, Edremit Körfezi'nden (39° 23' 25" N ve 39° 33' 00" N ile 26° 36' 05" E ve 26° 55' 01" E) Eylül 1999-Ağustos 2000 tarihleri arasında, bir yıl boyunca, aylık olarak yapılan trol çekimleri ile elde edilmiştir.



Şekil 1. Araştırma bölgesi

Yakalanan örneklerin çatal boy ölçümleri 1 mm hassasiyetli balık ölçme cetveli, vücut ve gonad ağırlığı ölçümleri ise 0,01 g hassasiyetli elektronik terazi ile yapılmıştır. Balıkların beslenme özelliklerini belirlemek amacıyla çıkarılan midelerden elde edilen içerikler, stereo mikroskop altında grup düzeyinde incelenmiştir. Midelerdeki organizmaların sayım işlemi sindirilmeyen vücut parçalarından yararlanılmıştır (Katağan vd., 1990).

Mide içeriklerinin değerlendirilmesinde, Sayısal Analiz Yöntemi (Sayısal Varlık (n), Bulunış Frekansı (f) ve Baskınlık (d)) kullanılmıştır (Holden ve Raitt, 1974).

Sayısal Varlık Yöntemi: $(\%)n = n_i / \Sigma n \cdot 100$

(n_i = i besin grubunun sayısı, Σn = Tüm besin gruplarının toplam sayısı).

Bulunış Frekansı Yöntemi: $(\%)f = f_i / \Sigma f \cdot 100$

(f_i = i besin grubunun frekansı, Σf = Toplam dolu mide sayısı).

Baskınlık Yöntemi: $(\%)d = s_i / \Sigma s \cdot 100$

(s_i = i besin grubu bulunan mide sayısı, Σs = Boş mideler de dahil olmak üzere toplam mide sayısı).

İncelenen türler arasında, besin kompozisyonu açısından benzerlik olup olmadığını tespit etmek amacıyla, "Biodiversity" programı kullanılarak, örneklerin mide içeriklerinde tespit edilen 6 temel besin maddesinin bulunış frekansına göre "Bray-Curtis Benzerlik Katsayısı Matrisi" belirlenmiş ve elde edilen verilerle "Kümeleme Analizi" yapılmıştır (Washington, 1984).

BULGULAR

Edremit Körfezi'nden örneklenen Triglidae familyasına ait beş türün (*C. lucerna*, *C. lastoviza*, *E. gurnarduss*, *L. cavillone*, *T. lyra*) çatal boy ve total ağırlık dağılımı değerleri ile incelenen mide ve boş mide sayıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Edremit Körfezi'nden örneklenen *C. lucerna*, *C. lastoviza*, *E. gurnarduss*, *L. cavillone* ve *T.lyra*'ya ait bazı biyolojik parametreler

	<i>C. lucerna</i>	<i>C. lastoviza</i>	<i>E. urnardus</i>	<i>L. cavillone</i>	<i>T. lyra</i>
Çatal boy(cm)	11,3-36,4	10,1-22,1	8,5-22,4	5,8-14,1	19,7-29,8
Ağırlık (g)	12,10-522,00	11,39-147,23	6,1-98,0	2,32-40,09	61,24-218,03
İncelenen mide	262	300	300	300	43
Boş mide	23	16	14	29	3
% boş mide	8,78	5,34	4,67	9,67	6,98

Mide içeriği incelenen türlerin avladığı ana taksonlara ait besin analizleri ise Tablo 2'de özetlenmiştir. Buna göre, araştırma bölgesinden elde edilen 262 adet *C. lucerna*'nın mide içeriğinin incelenmesi sonucunda Crustacea'lerin bu türün temel besin grubunu oluşturduğu ve Teleostei'nin de 2. sırada yer aldığı tespit edilmiştir. Mollusca, Echinodermata ve Polychaeta da besin olarak tüketilen diğer gruplar olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Edremit Körfezi'nden elde edilen *C. lastoviza*, *E. gurnardus* ve *L. cavillone* örneklerinden rastgele seçilen 300 adedinin mide içeriklerinin incelenmesi ile bu üç türün de temel besin grubunu yine Crustacea'lerin oluşturduğu tespit edilmiştir. Mollusca, Teleostei ve Polychaeta ise alınan diğer besin grupları olarak saptanmıştır. Bu besin grupları *L. cavillone* türü için düşük oranlarda tercih edilen gruplar olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *C. lucerna*, *C. lastoviza*, *E. gurnarduss*, *L. cavillone* ve *T. lyra*'nın mide içeriklerinde saptanan besin gruplarının sayısal varlık (%n), bulunuş frekansı (%f), ve baskınlık (%d) oranları (n; incelenen toplam mide sayısı)

Besin Grupları	<i>C. lucerna</i> (n=262)			<i>C. lastoviza</i> (n=300)			<i>E. gurnardus</i> (n=300)			<i>L. cavillone</i> (n=300)			<i>T. lyra</i> (n=43)		
	%n	%f	%d	%n	%f	%d	%n	%f	%d	%n	%f	%d	%n	%f	%d
Polychaeta	0,19	0,44	0,38	0,42	3,24	3,01	0,10	1,01	1,00	0,02	0,34	0,33	5,79	45,24	44,19
Crustacea															
Mysidacea	5,97	6,99	6,08	47,75	80,94	75,01	74,23	71,04	70,33	71,38	97,26	93,73	2,2	9,52	9,3
Cumacea	-	-	-	0,29	2,52	2,33	0,10	1,35	1,33	3,01	20,89	20,13	-	-	-
Isopoda	0,19	0,44	0,38	0,23	1,44	1,33	-	-	-	0,11	1,71	1,65	-	-	-
Amphipoda	0,19	0,44	0,38	4,89	22,30	20,67	6,19	18,52	18,33	10,21	57,88	55,78	-	-	-
Decapoda	0,58	1,31	1,14	7,19	32,01	29,67	11,83	40,74	40,33	8,11	38,36	36,96	0,28	2,38	2,33
Anomura	-	-	-	9,08	30,22	28,00	0,38	3,03	3,00	0,36	3,42	3,30	3,86	19,05	18,6
Brachyura	55,69	62,45	54,37	16,20	57,55	53,33	2,29	16,84	16,67	2,13	16,10	15,51	18,46	47,62	46,51
Stomatopoda	-	-	-	0,16	1,44	1,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mollusca															
Gastropoda	3,08	6,11	5,32	0,45	2,88	2,67	0,21	2,69	2,67	0,02	0,34	0,33	56,75	71,43	69,77
Cephalopoda	0,19	0,44	0,38	1,11	6,83	6,33	0,16	1,68	1,67	-	-	-	-	-	-
Scaphopoda	0,19	0,44	0,38	0,01	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bivalvia	6,94	10,92	9,51	0,98	5,76	5,33	0,34	2,02	2,00	0,02	0,34	0,33	0,83	7,14	6,98
Echinodermata															
Asteroidea	0,19	0,44	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55	4,76	4,65
Ophiuroidea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,44	38,1	37,21
Teleostei															
Tanımlanamayan Balık	19,08	38,43	33,46	0,62	5,04	4,67	1,04	9,76	9,67	0,42	6,51	6,27	0,55	4,76	4,65
Balık larvası	0,58	1,31	1,14	0,01	0,36	0,33	0,05	0,67	0,67	-	-	-	-	-	-
Balık yumurtası	-	-	-	2,88	2,52	2,33	1,55	2,36	2,33	-	-	-	-	-	-
Tanımlanamayan organizma	6,94	8,30	7,22	7,93	1,80	1,67	1,53	11,11	11,00	4,21	3,42	3,30	3,31	28,57	27,91

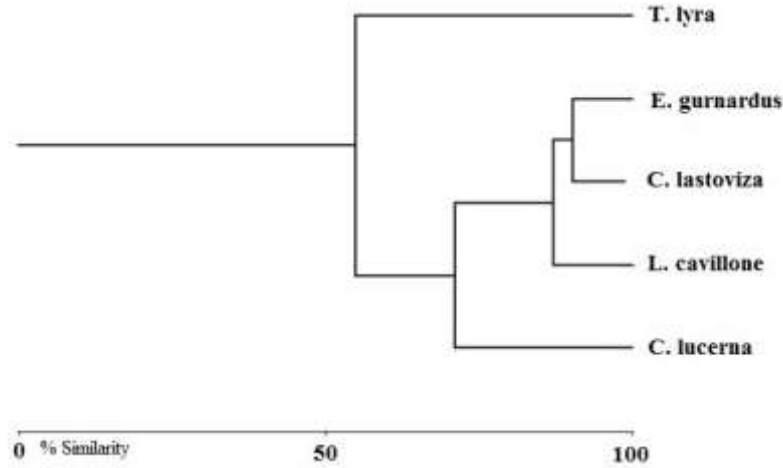
Araştırma periyodu süresince körfezden *T. lyra* türüne ait sadece 43 birey yakalanabilmiş ve mide içerikleri incelenmiştir. Bu verilere göre, *T. lyra*'nın besininin büyük bölümünü sayısal varlık açısından Mollusca oluştururken, bulunuş frekansı ve baskınlık açısından Crustacea'nin de Mollusca

ile eşit oranlarda tüketildiği saptanmıştır. Echinodermata, Polychaeta ve Teleostei’de besin olarak alınan diğer gruplar olarak tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 3. Beslenme açısından türler arasındaki “Bray-Curtis Benzerlik Katsayısı Matrisi”

	<i>C. lucerna</i>	<i>T. lyra</i>	<i>L. cavillone</i>	<i>C. lastoviza</i>	<i>E. gurnardus</i>
<i>C. lucerna</i>	-	54,87	65,73	67,93	71,17
<i>T. lyra</i>	-	-	46,97	54,20	50,44
<i>L. cavillone</i>	-	-	-	87,15	84,90
<i>C. lastoviza</i>	-	-	-	-	90,23
<i>E. gurnardus</i>	-	-	-	-	-

Beslenme rejimleri ayrı ayrı incelenen beş kırlangıç türü arasında besin kompozisyonu açısından benzerlik olup olmadığını belirlemek amacıyla “Bray-Curtis Benzerlik Katsayısı Matrisi” belirlenmiş ve bu verilere “Kümelenme Analizi” uygulanmıştır (Tablo 3 ve Şekil 2). İncelenen mide içeriklerinde tespit edilen 6 temel besin maddesinin midelerdeki bulunuş frekanslarına göre yapılan bu analiz sonucunda, araştırma bölgesindeki tüm Triglidae familyası türlerinin, Crustacea ilk sırada olmak üzere, benzer besin grupları üzerinden beslendiği saptanmıştır.



Şekil 2. Bray-Curtis Benzerlik Katsayısı Matrisi’ne göre beslenme açısından türler arasındaki “Kümelenme Analizi”

Özellikle *E. gurnardus* ile *C. lastoviza* türlerinin besin kompozisyonlarındaki benzerliğin çok yüksek olduğu (% 90,23), *T. lyra* ve *C. lucerna*’nın ise diğer türlerden biraz farklı bir beslenme rejimi sergilediği gözlenmiştir. Bu iki tür, diğerlerine göre çok daha büyük boyutlara ulaşabilen türler olup, besin olarak tükettikleri organizmaların boyutları da, artan boylarına paralel olarak büyümektedir. Dolayısıyla, artan boyla birlikte, *C. lucerna*’da Teleostei’nin, *T. lyra*’da ise Mollusca ve Polychaeta tüketiminin artması, bu iki türün beslenme modelini, diğer türlerden farklılaştırmaktadır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırma bölgemizden elde edilen toplam 1205 kırlangıç balığının mide içeriğinin incelenmesi sonucunda, Crustacea’lerin en fazla tüketilen besin grubunu oluşturduğu saptanmıştır. Crustacea’lerin kırlangıçların diyetindeki baskın rolü, farklı bölgelerde bu türlerin beslenmesini inceleyen birçok araştırı tarafından da rapor edilmiştir (Tablo 4).

Ayrıca çalışmamız sırasında, özellikle *C. lastoviza* ve *E. gurnardus* bireylerinin mide içeriklerinde bol miktarda Nematod (Aschelminthes) tespit edilmiştir. Ancak bu filum üyeleri parazit formlar olmaları sebebiyle, tüketilen besin grupları içerisine dahil edilmemiştir. Mide içeriklerinde çok miktarda Nematod’a rastlanılmasının, kırlangıç balıklarının parazitli balıklarla beslenmiş olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüm bu çalışmalara ait verilerde, sadece tüketilen besin gruplarının sıralamalarında değişimler gözlenmiştir. Bu da büyük olasılıkla, bu türler tarafından en çok tüketilen besin gruplarının farklı denizlerdeki genel dağılımları ve o bölgede bol olarak bulunmaları sebebiyledir.

Bu araştırma sonucuna göre Triglidae familyasına ait türlerin beslenme özelliklerinde gözlenen küçük değişimlerin, muhtemelen mevsimsel ve ortam farklılıkları ile tür içi veya türler arası ilişkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Genel olarak bakıldığında, beş türe ait bireylerin bölgede yeterli besini bularak iyi bir şekilde beslendiği tespit edilmiştir.

Tablo 4. *C. lucerna*, *C. lastoviza*, *E. gurnardus*, *L. cavillone* ve *T. lyra* bireylerinin farklı bölgelere ait besin tercihleri

Tür ismi	Besin tercihi	Araştırma bölgesi	Araştırmacı
<i>C. lucerna</i>	Crustacea	Orta Adriatik	Frogliia (1976)
	Decapoda, Mysidacea, Balık, Amphipoda	Portekiz Kıyıları	Costa (1988)
	Balık, Decapoda	Portekiz Kıyıları	Mareira vd. (1992)
	Mysid	Güney Batı Hollanda Kıyıları	Hostens ve Mees (1999)
	Decapoda, Mysidacea, Balık, Mollusca	Valencia Körfezi (Batı Akdeniz)	Morte vd. (1997)
	Mysidacea, Decapoda, Balık, Cephalopoda, Crustacea, Teleostei, Mollusca, Anellida,	Tiren Denizi (İtalya)	Collaco vd. (1994)
	Crustacea (Brachyura, Mysidacea), Teleostei, Mollusca (Bivalvia)	Edremit Körfezi	Bu çalışma
<i>C. lastoviza</i>	Decapoda, Brachyura, Amphipoda, Balık	Fransa (Marsilya) Kıyıları	Bell ve Harmelin-Vivien (1983)
	Decapoda	Girit Adası Kıyıları	Labropoulou ve Plaitis (1995)
	Decapoda, Crustacea Mysidacea	Girit Adası Kıyıları	Labropoulou ve Machias (1998)
	Mysidacea Decapoda	Cyclades ve Dodecanese Adaları	Tetrats vd. (2000)
	Crustacea (Mysid ve Decapod)	Gabes Körfezi (Tunus)	Boudaya vd. (2007)
Crustacea (Mysidacea, Brachyura, Anomura, Decapoda)	Edremit Körfezi	Bu çalışma	
<i>E. gurnardus</i>	Decapoda Natantia	Kuzey Denizi ve İngiltere Kıyıları	Smith (1888, 1891, 1892)*
	Decapoda Natantia	Kuzey Denizi ve İngiltere Kıyıları	Steven (1930)*
	Crustacea	Kuzey Denizi	De Gee ve Kikkert (1993)
	Crustacea	Kuzeybatı Akdeniz	Moreno-Amich (1994)
	Crustacea, Balık	Kuzey Denizi	Weinert vd. (2010)
	Crustacea, Balık		
	Cephalopoda, Ctenophora	Büyük Britanya Kıyıları	Vinogradov vd. (2014)
	Crustacea, Teleostei, Mollusca, Nematoda, Echinodermata	Orta Adriatik	Montanini vd. (2017)
	Crustacea (Mysidacea, Decapoda, Amphipoda)	Edremit Körfezi	Bu çalışma
	<i>L. cavillone</i>	Crustacea (Mysidacea)	Ege Denizi
Crustacea, Amphipoda		Katalan Denizi	Moreno ve Matallans (1983)
Crustacea (Mysidacea)		Akdeniz	Colloca vd. (1994)
Mysidacea, Decapoda		Girit Adası Kıyıları	Labropoulou ve Machias (1998)
Crustacea (Mysidacea) Decapoda		Tiren Denizi (İtalya)	Voliani vd. (2000)
Mysidacea, Decapoda		Cyclades ve Dodecanese Adaları	Tetrats vd. (2000)
Crustacea (Mysidacea, Amphipoda, Decapoda, Isopoda)		Gülbahçe Körfezi	Toğulga vd. (2000)
Crustacea (Mysidacea,		Edremit Körfezi	Bu çalışma

Amphipoda, Decapoda)			
	Crustacea, Echinodermata	Güney Adriatik	Jardas ve Zuponovic (1983)
	Mysidacea, Brachyura, Decapoda	Saronikos Körfezi	Caragitsou ve Papaconstantinou (1994)
T. lyra	Crustacea, Mollusca, Echinodermata, Balık, Polychaeta	Ege Denizi	İçemer vd. (2002)
	Mollusca (Gastropoda), Crustacea (Brachyura)	Edremit Körfezi	Bu çalışma

* Moreno-Amich, (1994)*ten

Teşekkür: Bu araştırma “Edremit Körfezi’nde Triglidae Familyasının (Kırlangıç Balıkları) Biyo-ekolojik Özelliklerinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi’nin bir bölümünü içermektedir.

KAYNAKLAR

- Bell, J.D., & Harmelin-Vivien, M.L. (1983). Fish Fauna of French Mediterranean Posidonia Oceanica Seagrass Meadows. 2. Feeding Habits. *Tethys*, 11(1), 1-14.
- Ben-Tuvia, A. (1953). Mediterranean fishes of Israel. *Bulletin of the Sea Fisheries Research Station, Haifa*, 8, 1-40.
- Boudaya, L., Neifar, L., Taktak, A., Ghorbel, M., & Bouain, A. (2007). Diet of *Chelidonichthys obscurus* and *Chelidonichthys lastoviza* (Pisces:Triglidae) from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Journal of Applied Ichthyology*, 23(6), 646-653. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00861.x
- Caragitsou, E., & Papaconstantinou, C. (1990). Food and feeding habits of large scale gurnard, *Lepidotrigla cavillone* (Triglidae) in Greek Seas. *Cybius*, 14(2), 95-104.
- Caragitsou, E., & Papaconstantinou, C. (1994). Feeding habits of piper *Trigla lyra* in the Saronikos Gulf (Greece). *Journal of Applied Ichthyology*, 10 (2-3), 104-113. doi:10.1111/j.1439-0426.1994.tb00149.x
- Carrassón, M., & Cartes, J.E. (2002). Trophic relationships in a Mediterranean deep-sea fish community: Partition of food resources, dietary overlap and connections within the benthic boundary layer. *Marine Ecology Progress Series*, 241, 41-55. doi:10.3354/meps241041
- Colloca, F., Ardizzone, G.D., & Gravina, M.F. (1994). Trophic ecology of gurnards (Pisces:Triglidae) in the Central Mediterranean Sea. *Marine Life*, 4(2), 45-57.
- Costa, M.J. (1988). The Tagus and the Mira estuaries (Portugal) and their role as spawning and nursery areas. *Journal of Fish Biology*, 33, 249-250.
- De Gee, A., & Kikkert, A.H. (1993). Analysis of the grey gurnard (*Eutrigla gurnardus*) samples collected during the 1991 International Stomach Sampling Project. ICES C.M. 1993/G:14. 25 p.
- Fischer, W., Scheider, M., & Bauchot, M.L. (1987). Fiches FAO d’Identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire, (Zone de pêche 37), Vertèbres, Vol. 2. FAO CEE, Rome, pp. 1406-1417.
- Frogliia, C. (1976). Osservazioni sull’alimentazione dei giovani di *Trigla lucerna* della classe di età nel Medio Adriatico (Pisces,Triglidae). *Archive of Oceanography and Limnology*, 8, 365-373.
- Hostens, K., & Mees, J. (1999). The mysid-feeding guild of demersal fishes in the brackish zone of the Westerschelde estuary. *Journal of Fish Biology*, 55, 704-719.
- Holden, M.J., & Raitt, D.F.S. (eds.) (1974). Manual of fisheries science. Part 2: Methods of resource investigation and their application. *FAO Fisheries Technical Report 115*(Rev.1), Rome, Italy.
- Hureau, J.C. (1986). Triglidae. In: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J., Tortonese, E. (eds.) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Vol. 3, UNESCO, Paris, pp. 1230-1238.
- İçemer, A., Özyayın, O., Benli, H.A., & Katağan, T. (2002). Feeding habits of Piper *Trigla lyra* (Linnaeus, 1758) inhabiting the Aegean Sea. *Acta Adriatica*, 43(2), 77-78.
- Jardas, I., & Zupanovic, S. (1983). Ishrana i neke druge karakteristike populacije lastavice, *T. lyra*, L., 1758, (Pisces: Triglidae) u području juznojadranske kotline (crnogorsko primorje). *Studia Marina*, 13-14, 167-187.
- Katağan, T., Kaya, M., Ergen, Z., & Önen, M. (1990). İzmir Körfezi’nde yaşayan *Mullus barbatus* Linnaeus, 1758 türünün beslenme rejimi. *Turkish Journal of Zoology*, 14(2), 179-187.
- Labropoulou, M., & Plaitis, W. (1995). Selective predation on small crustaceans by six demersal fish species in Iraklion Bay (Cretan Sea, North-eastern Mediterranean). In: Eleftheriou, A., Ansel, A.D. & Smith, C.J. (eds.) *Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters*. Olsen and Olsen, Denmark, pp. 351-358.
- Labropoulou, M., & Machias, A. (1998). Effects of habitat selection on the dietary patterns of two triglid species. *Marine Ecology Progress Series*, 173, 275-288.
- Mareira, F., Assis, C.A., Almeida, P., Costa, R., & Costa, M.J., 1992, Trophic Relationships in the Community of the Upper Tagus Estuary (Portugal): a Preliminary Approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 34, 617-623.

- Montanini, S., Stagioni, M., Benni, E., & Vallisneri, M. (2017). Feeding strategy and ontogenetic changes in diet of gurnards (Teleostea: Scorpaeniformes: Triglidae) from the Adriatic Sea. *The European Zoological Journal*, 84, 356-367. doi:10.1080/24750263.2017.1335357
- Moreno, R., & Matallanas, J. (1983). Etude du regime alimentaire de *Lepidotrigla cavillone* (Lacepede, 1801) (Pisces: Triglidae) dans la Mer Catalane. *Cybium*, 7(3), 93-103.
- Moreno-Amich, R. (1994). Feeding habits of grey gurnard, *Eutrigla gurnardus* (L., 1758), along the Catalan Coast (Northwestern Mediterranean). *Hydrobiologia*, 273, 57-66.
- Morte, M.S., Redon, M.J., & Sanz-Brau, A. (1997). Trophic relationships between two gurnards *Trigla lucerna* and *Aspitrigla obscura* from the Western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 77, 527-537.
- Serena, F., Voliani, A., & Auteri, R. (1998). Nursery Areas and Some Biological Information of Tub Gurnard (*Trigla lucerna* L., 1758) off Tuscany Coasts (Italy). *Rapp. Comm. Int. Mer. Me'dit.*, 35, 482-483.
- Slastenenko, E. (1955-1956). Karadeniz Havzası Balıkları. Et Balık Kurumu Umum Müdürlüğü Yayınları, Cilt: I, İstanbul, 711 s.
- Stagioni, M., Montanini, S., & Vallisneri, M. (2012). Feeding of tub gurnard *Chelidonichthys lucerna* (Scorpaeniformes: Triglidae) in the north-east Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(3), 605-612. doi:10.1017/S0025315411000671
- Stergiou, K.I., & Karpouzi, V.S. (2002). Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. *Review in Fish Biology and Fisheries*, 11, 217-254.
- Tetrats, A., Petrakis, G., & Papaconstantinou, C. (2000). Feeding habits of *A. cuculus* (L., 1758) (red gurnard), *L. cavillone* (Lac., 1802) (large scale gurnard) and *T. lastoviza* (Brunn., 1768) (rock gurnard) around Cyclades and Dodecanese Islands (E. Mediterranean). *Mediterranean Marine Science*, 1(1), 91-104.
- Toğulga, M., Katağan, T., Akalın, S., & Uçkun, D. (2000). Gülbahçe Körfezi'nde Kırlangıç Balığının (*Lepidotrigla cavillone*) (Lacepède, 1801) Beslenme Rejimi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 17(3-4), 49-57.
- Tortonese, E. (1975). Osteichthyes (Pesci Ossei). Parte Seconda. Fauna d'Italia. Calderini Bologna. 636 p.
- Vallisneri, M., Stagioni, M., Montanini, S., & Tommasini, S. (2011). Body size, sexual maturity and diet in *Chelidonichthys lucerna* (Osteichthyes: Triglidae) from the Adriatic Sea, north eastern Mediterranean. *Acta Adriatica*, 51(1), 141-148.
- Vinogradov, V.I., Arkhipov, A.G., & Kozlov, D.A. (2014). Feeding of Grey Gurnard *Eutrigla gurnardus* (Triglidae) in the Area of the Rockall Seamount. ISSN 0032_9452. *Journal of Ichthyology*, 54(3), 243-248 (Original Russian Text).
- Weinert, M., Floeter, J., Kröncke I., & Sell, A.F. (2010). The role of prey composition for the condition of grey gurnard (*Eutrigla gurnardus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 26(1), 75-84.
- Washington, H.G. (1984). Diversity, biotic and similarity indices: a review with special reference to aquatic systems. *Water Resources*, 18, 653-694.
- Voliani, A., Manini, P., & Auteri, R. (2000). Distribuzione e Biologia di *L. cavillone* (Lacepede, 1802) e *L. dieuzeidei* (Audoin in Blanc & Hureau) Nell'arcipelago Toscano. *Biologia Marina Mediterranea*, 7(1), 844-849.

Some Population Parameters of the *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838) in the Sombreiro River of Niger Delta, NigeriaOlaniyi Alaba OLOPADE^{1*}, Henry Eyina DIENYE¹, Nathanael Akinsafe BAMIDELE²¹Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Port Harcourt, Nigeria.²Institute of Food Security, Environmental Resources Agricultural Research Federal University of Agriculture, Abeokuta, Nigeria.*Corresponding Author: olaniyi.olopade@uniport.edu.ng**Research Article**

Received 26 February 2019; Accepted 09 April 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Olopade, O.A., Dienye, H.E., & Bamidele, N.A. (2019). Some population parameters of the *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838) in the Sombreiro River of Niger Delta, Nigeria. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 354-364. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.532284>**Abstract**

A study was conducted to estimate the growth and stock characteristics of the *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838) from Sombreiro River of Niger Delta, Nigeria. Results obtained revealed that mean total length and the mean weight of *S. maderensis* ranged between 4.1cm to 18.5 cm and 5g to 55.5g respectively. The b value of the length-weight relationship was 2.58 thus, the species could be categorized as displaying allometric negative growth and condition factor was very high, it ranged from 3.04 to 4.43. The estimated von Bertalanffy growth parameters (VBGP) of L_{∞} , growth coefficient (k) and age at zero length (t_0) were 23.31cm, 0.54 and -0.03/year respectively. The species showed year round recruitment patterns having two peak periods during April and July. The total mortality (Z) was 2.74 year⁻¹, the natural mortality rate (M) and fishing mortality (F) were 1.32 and 1.42 respectively. The estimated fishing mortality (Z-M=F) stood at 0.518. The length-based index of growth performance (ϕ' - phi prime) for *S. maderensis* was estimated at 2.46. The length at first capture L_{50} was 27.31 cm. The exploitation rate (E_{max}) was 0.421 whereas ($E_{0.1}$) was observed to be 0.355 indicating that that the level of exploitation is already high and to obtain the maximum sustainable yield, the present level of fishing effort should be reduced through appropriate fishing regulation techniques..

Keywords: Length- weight relationship, condition factor, population parameters, *Sardinella maderensis*, Sombreiro River, Nigeria

Sombreiro Nehri'ndeki (Nijer Deltası, Nijerya) *Sardinella maderensis*'in (Lowe, 1838) Bazı Popölasyon Parametreleri**Özet**

Bu çalışma, Nijerya'daki Nijer Deltası'nın Sombreiro Nehri'ndeki *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838), popölasyonlarının bazı büyüme ve stok özelliklerini belirlemek için yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *S. maderensis*'in ortalama toplam uzunluk ve ortalama ağırlığının sırasıyla 4,1 cm ile 18,5 cm ile 5 g ile 55,5 g arasında olduğunu göstermiştir. Uzunluk-ağırlık ilişkisinin b değeri 2,58 olarak tespit edilmiştir, bu nedenle türler, allometrik negatif büyüme gösteriyor şeklinde kategorize edilebilir. Bu türün durum faktörü 3,04 ile 4,43 arasında çok yüksek olarak belirlenmiştir. Tahmini L_{∞} , von Bertalanffy büyüme parametreleri (VBGP), büyüme katsayısı (k) ve sıfır uzunluktaki yaş (t_0) sırasıyla 23,31cm, 0,54 ve -0,03 / yıl olarak belirlenmiştir. Türler, Nisan ve Temmuz aylarında iki tepe periyodu olmak üzere yıl boyunca dağılım göstermektedir. Toplam mortalite (Z) 2,74 yıl, doğal ölüm oranı (M) ve balıkçılık ölümleri (F) sırasıyla 1,32 ve 1,42 olarak bulunmuştur. Tahmini balık ölümü (Z-M = F) 0,518 seviyesinde gerçekleşmiştir. *S. maderensis* için uzunluk temelli büyüme performansı endeksi (ϕ' - phi prime) 2,46 olarak hesaplanmıştır. İlk yakalama L_{50} 'deki uzunluk 27,31 cm olarak bulunmuştur. E_{max} (0,421) ve $E_{0,1}$ (0,355) değerleri türden maksimum verim alınabilmesi için uygun balıkçılık düzenlemeleri ile mevcut avlanma baskısının azaltılması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Uzunluk-ağırlık ilişkisi, durum faktörü, popölasyon parametreleri, *Sardinella maderensis*, Sombreiro Nehri, Nijerya

INTRODUCTION

Clupeids are chiefly marine coastal and schooling fishes; some freshwater and anadromous (Gaudant, 1991) widely distributed in the tropical and subtropical region (Riede, 2004) including the entire Mediterranean and the Black sea (Froese and Pauly, 2017). These are small, silvery fishes with fusiform, or strong compressed body. Three genera consisting of six species have been identified in Nigerian freshwaters Adesulu and Sydenham (2007). *Sardinella maderensis* belonging to family clupidae. *S. maderensis* resembles *Sardinella aurita*, but pelvic fin with 1 unbranched and 7 branched rays and no black spot on hind part of gill cover, but a faint gold or black area just behind gill opening (Tous et al., 2015). The species has maturity mean length of 13.4 cm and common length 25 cm (Whitehead, 1985).

The population of the *S. maderensis* is declining due to overfishing, with the average size of fish in the catch reducing and as a result, the International Union for Conservation of Nature has rated its conservation status as "vulnerable (Tous et al., 2015). The fish species is considered as one of the most important fishery resources in marine and brackish water in Nigeria because of its abundance in the landings. In Nigeria, *S. maderensis* accounts for 15,115 tonnes of fish production by species in 2015 (NBS, 2017). In spite of its economic importance, there is paucity of information on population parameters and biology of *S. maderensis* in Nigerian water bodies.

An approach towards conservation and management of the population of this particular fish species demands the generation of information on the stock or population structure. Stock assessment generally aims to estimate the current stock size and its potential for increased in size (de Graaf, 2015). Generally the size of the total stock of a race, species, (or) group of species vary from year to year and from one region of the world to the other. These fluctuations in abundance are caused by natural factors and also by man's activity. The estimation of stock abundance is important in determining the effects of fishing and environmental disturbances as well as in estimating parameters such as length-weight relationships, recruitment variability, mortality and stock status. These information are required for consideration of management measures of the species in the future. As there is currently no knowledge of *S. maderensis* stock structure in the Sombreiro River. Therefore, this study was carried out to estimate population parameters, yield per recruit, biomass and MSY on *S. maderensis* in order to formulate management and conservation policies.

MATERIALS and METHODS

Sombreiro River system (between latitude $6^{\circ} 30'$ and $7^{\circ} 0'$ E, and longitude $4^{\circ} 12'$ N and $60^{\circ} 17'$ N) is located in Rivers State in the Niger Delta region of Nigeria (Figure 1). It has its source from the Niger River, runs downwards into the Southern tip of the Niger Delta basin and empties into the Atlantic Ocean (Ezekiel et al., 2011). The middle reach of the Sombreiro River is brackish and appears turbid during the raining season. The extent of brackish in this river is between 117-132 km² Ssentongo et al. (1983) and Nduaguba (1983). Two distinct seasons is usually observed in a year. They include the rainy and dry season. The maximum temperature is between 26-28°C and mean annual rainfall is 362.5 mm. The climate presents two distinct seasons; a rainy season (April - October) and a dry season, (November - March).

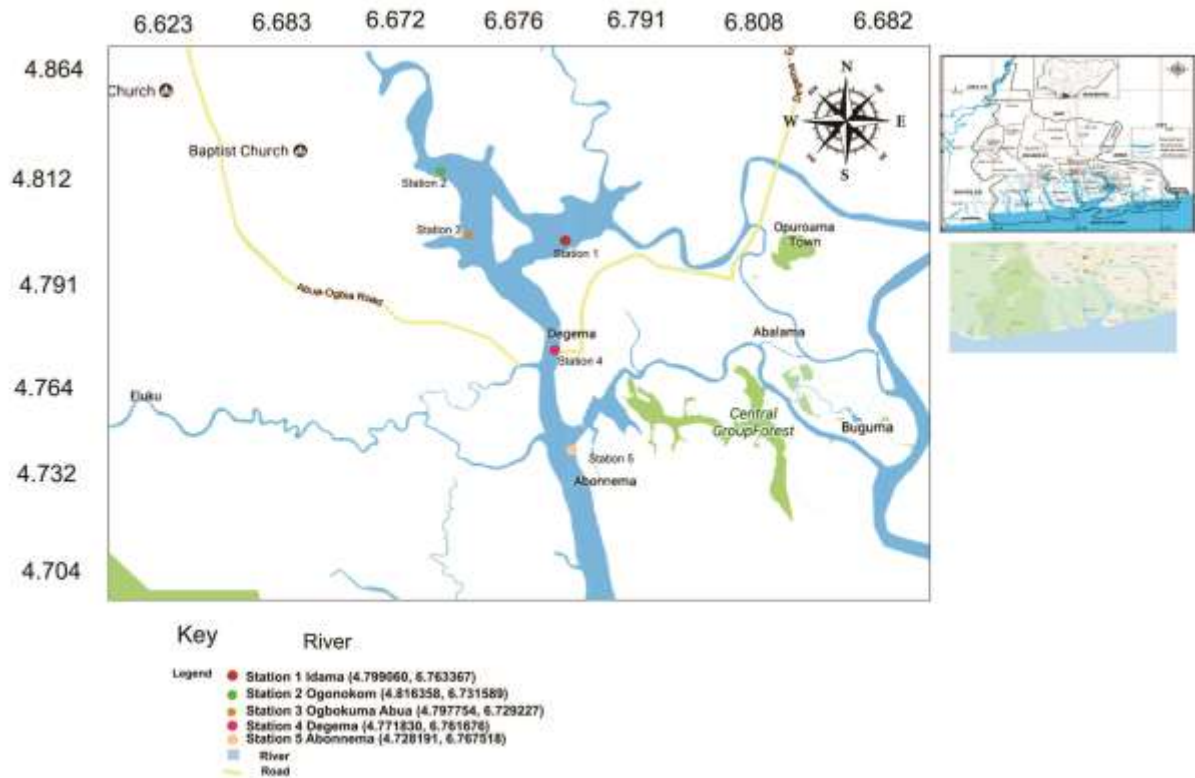


Figure 1. Map of Sombreiro River showing the study area

A total of 531 *S. maderensis* were collected monthly the period from January to December 2017 at five different stations (Degema, Ogonokomi, Ogbokuma Abua, and Abonnema) within the Sombreiro River.

These sites were chosen because they are the fishing and landing grounds of fishermen. Fishes were identified to species level based on Schneider (1990). Samples were transported to the laboratory for further evaluation. Total Length (TL) and Standard Length (SL) were measured to the nearest 0.01 cm using digital slide calipers and graduated plastic measuring board and total Body Weight (BW) was weighed by an electronic balance with 0.01 g accuracy for each individual.

The length/weight relationship of the fish was described by the equation: $W = aL^b$, where W= weight in grams, L= total length in centimetres, and a and b are regression constants. This can be expressed in logarithmic form as $\text{Log } W = \log a + b (\log L)$ suggested by Le Cren (1951). Length and weight data were used to calculate the Fulton condition factor, 'k' from the equation: $k = 100 W/L^3$, where W = weight in grams, and L = length in centimetres.

The growth parameters were estimated by fitting length frequency data into the von Bertalanffy growth function (VBGF) was used to describe the fish growth; $L_t = L_\infty (1 - \exp(-k(t-t_0)))$

where L_t was the predicted length in the cm at age t, L_∞ is the asymptotic length, K is the growth coefficient and t_0 was the hypothetical age at which length of the fish is equal to zero (usually negative), (Haddon, 2011) which can be estimated from the empirical equation of Pauly (1983) as:

$$\log_{10} (-t_0) = -0.3922 - 0.275 \log_{10} L_\infty - 1.038 \log_{10} K$$

The total mortality coefficient (Z) was estimated by using Beverton and Holt's (1956) equation $Z = K ((L_\infty - L_-) / (L_\infty - L'))$ where Z is the instantaneous total mortality coefficient, L_- is the mean length and L' is the length for which all fish of that length and longer are under full exploitation. Natural mortality coefficient (M) was calculated by using Pauly empirical formula (1980): $\text{Log } M = -0.0066 - 0.279 \text{Log } L_\infty + 0.6543 \text{Log } K + 0.4634 \text{Log } T$; where T is the annual mean temperature. The fishing mortality coefficient (F) was computed as $F = Z - M$.

The recruitment pattern of the stock was determined by backward projection on the length axis of the set of available length frequency data as described in FiSAT II (Pauly and Caddy, 1985).

Growth performance index (Φ') was calculated by the equation given by Pauly and Munro (1984): $10 \log 2 \log k L \Phi' \infty = +$

Probability of capture against mid-length a resultant curve was used to compute the length at first capture (L_{C50}). Length at first maturity (L_{m50}) was estimated as: $L_{m50} = (2 * L_{\infty}) / 3$ (Hoggarth et al., 2006)

Relative yield per recruit (Y/R) and relative biomass per recruit (B/R) were estimated using the model of Beverton and Holt (1959) as modified by Pauly and Soriano (1986) and incorporated in the FiSAT software.

RESULTS

Length-weight relationship and condition factor

As indicated in Table (1), the mean total length and mean weight of *S. maderensis* ranged between 4.1cm to 18.5 cm and 5g to 55.5g respectively. The weight of the fish strongly correlated with the total length (TL) with r^2 value of 0.89. The b value of the length-weight relationship was 2.58 thus, species could be categorized as displaying allometric negative growth. The value of (K) of the under study species was very high, it ranged from 0.52 to 7.82 and with mean value of 4.43 ± 0.07 (Table 1).

Table 1. Length-weight relationship and condition factor of *S. maderensis* from Sombreiro River

Species	N	Total weight (g)		Total length (cm)		a	B	r^2	K	
		Mean±SE	Range	Mean±SE	Range				Mean±SE	Range
<i>S. maderensis</i>	531	24.27±0.40	5 - 55	8.29±0.08	4.1 - 18.5	-2.25	2.58	0.89	4.43±0.07	0.52-7.82

Growth parameters

Parameters of von Bertalanffy's equations were estimated as shown in Table 2. Asymptotic length stood at 23.31cm, growth coefficient (k) was estimated at 0.54 and age at zero length (t_0) stood at -0.03 year⁻¹ in the restructured form of the length-frequency data is presented as output of ELEFAN I in Figure 4.

Table 2. Growth parameters of *S. maderensis* from Sombreiro River

Von Bertalanffy's Growth parameters	ELEFAN-I
Asymptotic length (cm)	23.21
Growth coefficient (k)	0.54
Age at zero length (t_0) (yr)	-0.03
Growth Performance index (Φ)	2.46

Mortality parameters and exploitation ratio

The mortality parameters and exploitation ratio are shown in Table 3. Total mortality (Z) was found to be 2.74 year⁻¹. Fishing mortality was computed as 1.42 year⁻¹ and Natural mortality was 1.32 at an annual average sea surface temperature of 29.7° Figure 4. The estimated fishing mortality (Z-M=F) stood at 0.518.

Table 3. Mortality parameters and exploitation ratio of *S. maderensis* from Sombreiro River

Fishing mortality (F)	1.42
Natural mortality(M)	1.32
Total mortality (Z)	2.74
Exploitation ratio (E = F/Z)	0.518

The length-based index of growth performance (ϕ' – phi prime) for *S. maderensis* was estimated at 2.46 (Table1 and Figure 2).

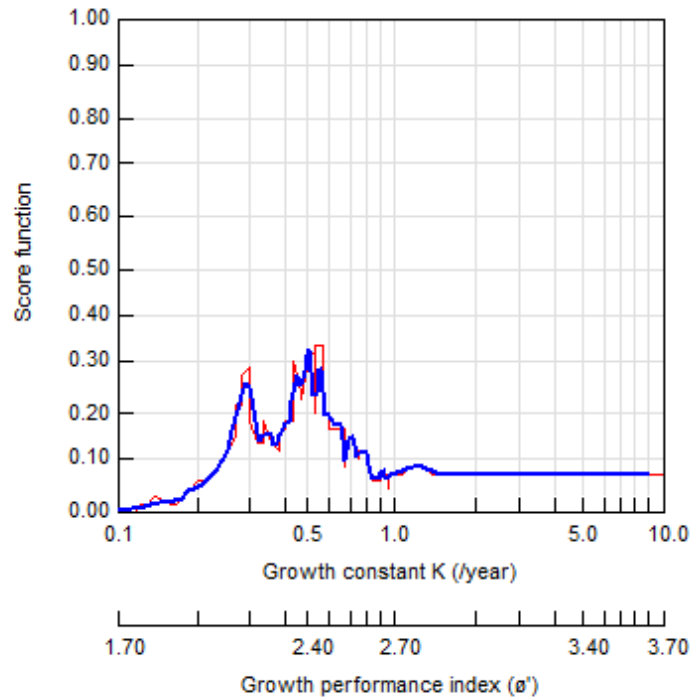


Figure 2. Growth Performance index of *S. maderensis* from Sombreiro River

Recruitment patterns

The recruitment patterns for *S. maderensis* is shown in Figure 3. Spawning capable individuals were recorded throughout the entire fishing period and the species showed year round recruitment patterns having two peak periods which occur in two nearly equal pulses. The minor peak during April and major peak during July.

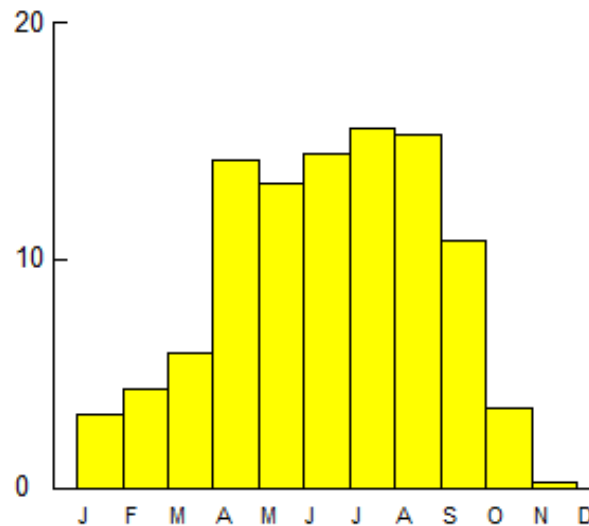


Figure 3. Recruitment patterns of *S. maderensis* from Sombreiro River

Figure 4 below showed the restructured length frequency with superimposed growth curves with bimodal population structure, indicating probably the existence of six cohorts within the population.

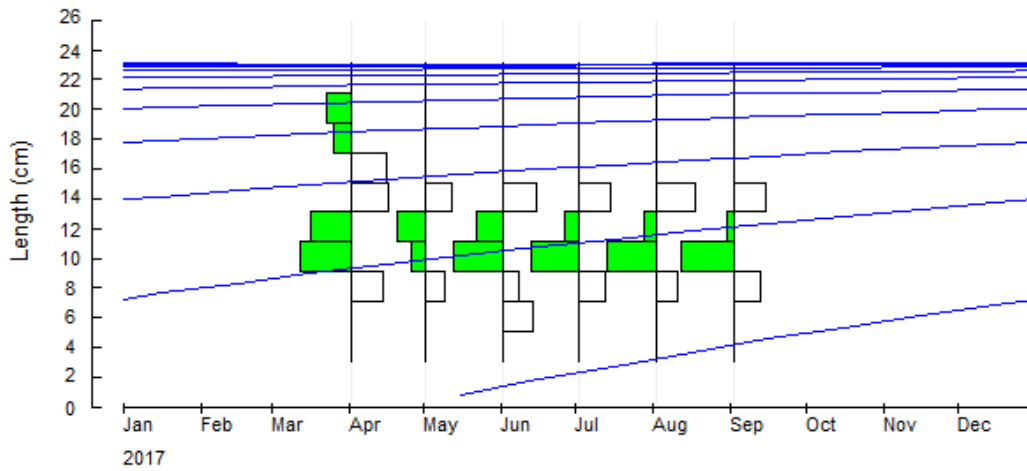


Figure 4. Length frequency distribution data and growth curve parameters using ELEFAN for *S. maderensis* from Sombreiro River

Figure 5 revealed the length at first capture L_{50} was 27.31cm, L_{25} estimated at 14.88cm and the length at which 75% fish are retained in the gear was estimated as 39.75cm.

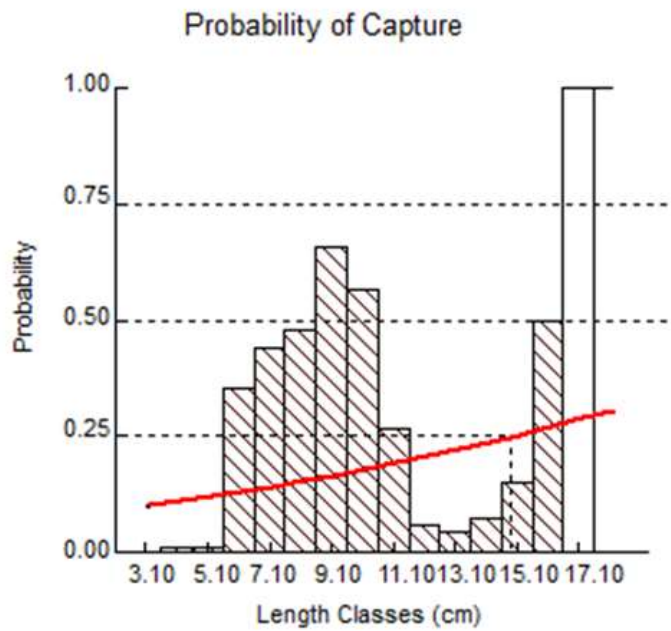


Figure 5. The probability capture curve showing the L_{25} , L_{50} and L_{75} of length converted catch curve

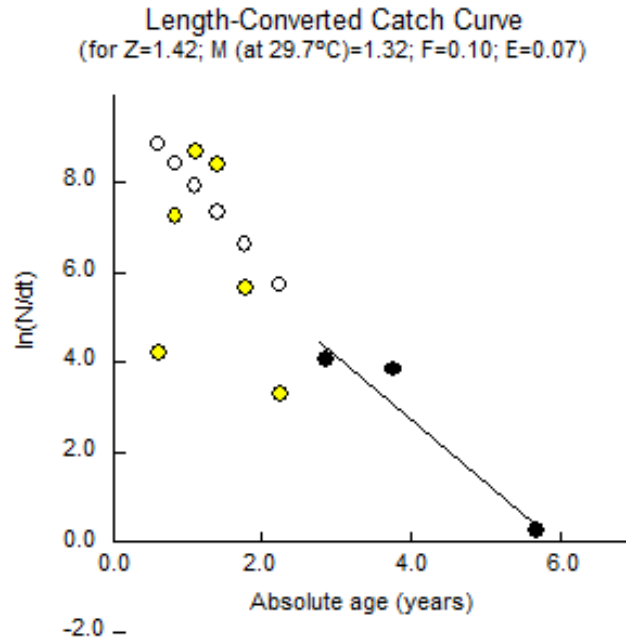


Figure 6. Length converted catch curve of *S. maderensis* using VBGF growth parameters

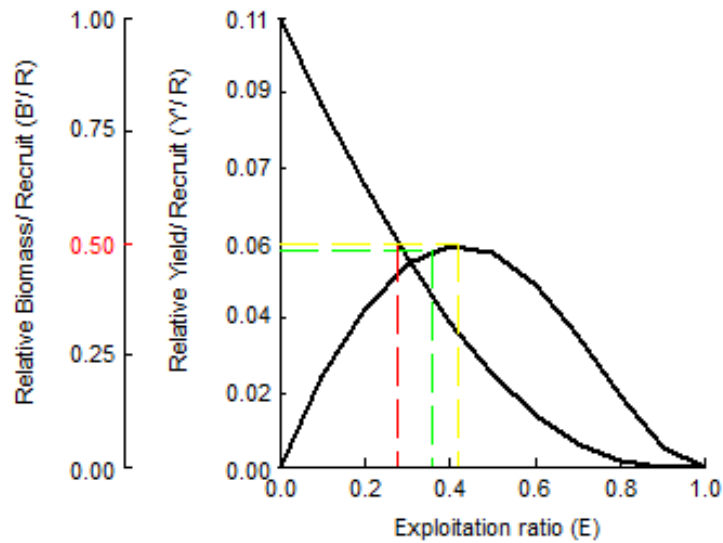


Figure 7. Relative yield per recruit and biomass per recruit curves of *S. maderensis* in Sombreiro River

Stock status of using Beverten and Holt’s relative Y/R analysis

The relative yield-per-recruit (Y/R) and relative biomass-per-recruit (B/R) analysis by the knife-edge selection method. The exploitation rate (E_{max}) that gives maximum relative yield-per-recruit was 0.421. The exploitation rate at which marginal increase occurred in the relative yield-per-yield was 10% of its value at $E = 0$, whereas ($E_{0.1}$) was observed to be 0.355 (Figure 7). The exploitation rate ($E_{0.5}$) which corresponds to 50% of the virgin (that is., the unexploited stock) relative biomass-per-recruit was estimated to be 0.278.

DISCUSSION

Estimation of the population size of a fish stock for the purpose of its rational exploitation often requires knowledge of these relationships (Le Cren, 1951). Values of the exponent 'b' provide information on fish growth. The values of length-weight regression coefficient "b" in this study was 2.58 negative allometric growth pattern ($b > 3$) meaning that the weight increase is made faster than the growth in length. This value is within the expected range of 2–4 reported by Tesch (1971), and $2.5 < b < 3.5$ by Froese (2006). However, the negative allometric growth pattern obtained in this study for *S. maderensis* was in contrary with the positive allometric growth reported for this species in Nkoro River (Niger-Delta) (Abowei, 2009). The value of 'b' may be due to feeding, sex, state of maturity, metabolic activity and genetic nature (Wootton, 1990). The length-weight relationship provides means for finding out the condition factor which indicates the "Wellbeing of the fish". The condition factor was very high in this fish species, the values ranged from 3.04 - 4.43. This could be attributed to the length range of the sampled specimens. Salam et al. (2005) pointed out that 'K' remained constant with increasing in length and weight of fish.

In this study the values of asymptotic length (L_{∞}) and growth coefficient (k) were calculated as 23.31cm, and 0.54 respectively. The results are in agreement with Beverton and Holt (1959) who pointed out that the two parameters of growth, asymptotic length and growth coefficient are inversely proportionally to each other. It implies that fishes with high L_{∞} should be with lower K values and those with lower L_{∞} with higher K values. The estimated growth rate was within the range: 0.34 per year and 0.67 per year, suggesting that *S. maderensis* is an intermediate growing fish species, evinced by its lifespan of 7.51 years (Kienzle, 2005). On the other hand, the L_{∞} value (23.31cm) in this study was smaller than 37.5cm reported by Marcus (1989) from coastal waters around Lagos, Nigeria, on the same species. The difference may be due to the ecological differences, feeding variability and most importantly fishing pressure.

Age at zero length (t_0) stood at -0.03 year^{-1} . Amponsah et al. (2018) reported the age at birth (t_0) for the same fish species at -0.284 year^{-1} from coastal waters of Ghana. It has been reported that there must be some differences between growth characteristics among localities as a result of diversity and availability of dietary items, hydrographical and climatic conditions (Bartulovic et al., 2004).

In this study the value of growth performance index of *S. maderensis* was found to be 2.46. The result is lower than values reported for the same species by Amponsah et al., (2018) in coastal waters of Ghana and by Marcus (1989) in coastal waters around Lagos, Nigeria. The difference in values could be due to poor state of water quality in the study area as a result oil pollution and other human activities in and around the Sombreiro River. The value recorded in the current study was lower than recommended value for fishes in Africa. Baijot and Moreau (1997) estimated that the ϕ' mean value for some important fishes in Africa have a range of 2.65 - 3.32, which they considered as low. According to Kalhoru et al. (2015) the higher value of growth performance index indicates that fish can grow faster and larger.

Total mortality (Z) was found to be 2.74 year^{-1} , fishing mortality was computed as 1.42 year^{-1} and natural mortality stood at 1.32. The total mortality (Z) was slightly higher than the Hashem and Faltas (1982) estimated Z by 2.399 for *S. maderensis* in El-Mex. The high estimated Z in this study may indicate more pressure on the species that may be resulted from increasing in one, or both the components (M and F') of Z. Sardine is vulnerable to a wide variety of predators, including many recreationally and commercially important fish species such as *Scomber japonicus* (Rizkalla and Faltas, 1997). The fishing mortality was slightly higher than the natural mortality and exploitation rate estimated (E) at 0.52 showed that that the level of exploitation is already high and species may not be in a sustainable condition. The exploitation rate in this study was almost the same with 0.5 optimally exploited stock which shows that the stock of this species may be under the pressure and not in a safe condition. Coefficient of exploitation higher than 0.5 along with higher fishing mortality compared to natural mortality show the stock is under overfishing pressure (King, 2007).

The species showed year round recruitment patterns having two peak periods. The minor peak during April and major peak during July. Pauly (1982) reported that double recruitment pulses per year for tropical fish species and for short-lived species. Recruitment has been described as a year-round phenomenon for tropical fish and shrimps species (Weber, 1976). The results obtained by Diouf et al. (2010) show a continuous reproduction for *S. maderensis* throughout the year.

In this work, the length at first capture L_{50} and L_{25} were 27.31cm and 14.88cm respectively. The length at which 75% fish are retained in the gear was estimated as 39.75 cm. The values in the current study were higher than those recorded in the coastal waters of Ghana for *S. maderensis* L_{25} %, L_{50} % and L_{75} % were 4.40 cm, 5.30 cm and 6.12 cm respectively by (Amponsah et al., 2018) In Senegal, the work performed by Boely (1980) and (Levenez 1993) showed that the L_{50} in this area was 20 cm.

The present level of exploitation rate ($E = 0.36$) was close to the maximum allowable limit based on the yield-per-recruit calculation ($E_{max} = 0.42$) indicating that that the level of exploitation is already high.

CONCLUSION

The results reveal that the level of exploitation is already high for this species and to obtain the maximum sustainable yield, the present level of fishing effort should be reduced. The present results can serve as baseline data for species with no previous information regarding stock assessment and for comparisons in future studies of Nigerian inland water fishery.

REFERENCES

- Abowei, J. F. N. (2009). The Abundance Condition Factor and Length-Weight Relationship of some *Sardinella maderensis* (Jenyns, 1842) from Nkoro River, Niger Delta, Nigeria. *Advanced Journal of Food Science and Technology*, 1, 65-70.
- Adesulu, E. A., & Sydenham D. H. J. (2007). *The fresh water and fisheries of Nigeria*. Macmillan Nigeria Publishers, Lagos, 397 pp.
- Amponsah, S. K. K., Ofori-Danson, P. K., Nunoo, F. K. E., & Ameyaw, G. A. (2018). Estimates of Population parameters of the Flat sardine, *Sardinella maderensis* (Lowe, 1838) in the coastal waters of Ghana. *Greener Journal of Agriculture Sciences*, 9 (1), 23-37. doi.org/10.15580/GJAS.2019.1.011719017
- Baijot, E., & Moreau, J. (1997). *Biology and demographic status of the main fish species in the reservoirs of Burkina-Faso*. In: Baijot, E., Moreau, J., Bouda, S. (Eds.), *Hydro biological aspects of fisheries in Small Reservoirs in the Sahel Region*. Technical Centre for the European Communities, Wageningen, the Netherlands, pp. 79–109.
- Bartulovic, V., Glamuzina, B., Conides, A., Dulcic, J., Lucic, D., Njire, J., & Kozul, V. (2004). Age, Growth, mortality and sex ratio of sand smelt, *Atherina boyeri*, Risso, 1810 (Pisces: Atherinidae) in the Estuary of the Mala Neretva River (Middle-Eastern Adriatic, Croatia). *Journal of Applied Ichthyology*, 20, 427-430.
- Beverton, R. J. H., & Holt, S. J. (1956). *A review of methods for estimating mortality rates in fish populations, with special reference to sources of bias in catch sampling*. *Rapports et Procès-verbaux des Reunions, Conseil*.
- Beverton, R. J. H., & Holt, S. J. (1959). A review of the life spans, natural mortality, and their relation to growth and other physiological characteristics. In CIBA colloquium on Aging. (Wolstenholme G. E. W. and MO'Connor Eds) London, Churchill, 5, 142-180
- Boely, T. (1980). Etude du cycle sexuel de la sardinelle plate: *Sardinella maderensis* (Lowe, 1841) des cotes senegalaise. *Cybiurn*, 8, 77-88
- de Graaf, G. J., Nunoo, F., Ofori Danson, P., Wiafe, G., Lamptey, E., & Bannerman, P. (2015). *International training course in fisheries statistics and data collection*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1091. Rome, FAO. 134 pp.
- Diouf, P. S. (1996). The Fish Population of the estuarine environment of the African coast: The example of the estuary salinity of the Sine saloum. University of Montpellier II. Thesis and Documents No. 156. ORSTOM, Paris. 267
- Diouf, K., Samb, B., & Sylla, M. (2010). Contribution a la Connaissance de la Biologie des Sardinelles (*Sardinella aurita* et *Sardinella maderensis*) du Littoral Senegalais. In: Science et Amenagement des Petits Pelagiques. Symposium sur la Science et le Defi de l'Amenagement des Pecheries de petits Pelagiques sur les Stocks Partages en Afrique Nord-Occidentale, 11-14 Mars 2008, Casablanca, Maroc, FAO Comptes Rendus des Peches et de l'Aquaculture, No. 18, Dans Garcia, S., M. Tandstad and A.M. Caramelo (Eds.), FAO., Rome, 39-56.
- Ezekiel, E. N., Hart, A. I., & Abowei, J. F. N. (2011). Benthic Macro- Fauna Composition and Abundance in Sombreiro River, Niger Delta, Nigeria. *Research Journal of Applied Science and Engineering Technology*, 3(4), 257-263
- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 241–253
- Froese, R., & Pauly, D. (2017). FishBase. World Wide Web Electronic Publication, France

- Gaudant, J. (1991). *Paleontology and history of clupeoid fishes*. p. 32-44. In H. Hoestlandt (ed.) *The freshwater fishes of Europe*. Aula Verlag, Wiesbaden, Germany
- Haddon, M. (2011). *Modeling and Quantitative Methods in Fisheries*. Chapman and Hall, CRC Press, London, 449 PP.
- Hashem, M. T., & Faltas, S. N. (1982). Fisheries investigation of the sardine gill net at El-Max Region, near Alexandria. *Bulletin of Institution of Oceanography and Fisheries ARE* 8 (2), 137-155.
- Hoggarth, D. D., Abeyasekera, S., Arthur, R., Beddington, J. R., Burn, R. W., Halls, A. S., Kirkwood, G. P., McAllister, M., Medley, P., Mees, C. C., Pilling, G. M., Wakeford, R., & Welcomme, R. L. (2006). *Stock assessment and fishery management - A framework guide to the FMSP stock assessment tools*. FAO Fisheries Technical Paper No. 487, Rome, Italy, 261 pp.
- Kalhor, M. A., Liu, Q., Valinassab, T., Waryani, B., Abbasi, A. R., & Memom, K. H. (2015) Population Dynamics of Greater Lizardfish, *Saurida tumbil* From Pakistani Waters. *Pakistan Journal of Zoology*, 47 (4), 921-931
- Kienzle, M. O. (2005). Estimation of the population parameters of the Von Bertalanffy Growth Function for the main commercial species of the North Sea. Fisheries Research Services Internal Report pp. 34.
- King, M. (2007). *Fisheries biology and assessment and management*. Fishing News Press, 340p.
- Le Cren, E. D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in the gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20, 201-219
- Levenez, J. J. (1993). Synthèse Bibliographique des Connaissances sur la Biologie de Quelques Espèces de Poissons Concernant le Symposium. In: L'Évaluation des Ressources Exploitable par la Pêche Artisanale Sénégalaise, Barry-Gerard, M., T. Diouf, A. Fontenau (Eds.). ORSTOM., France, pp: 121-141.
- Marcus, O. (1989). Breeding, age and growth in *Sardinella maderensis* (Lowe 1839) Pisces: Clupeidae from coastal waters around Lagos, Nigeria. *Nigerian Journal of Sciences*, 23 (1-2), 1-5,
- National Bureau of Statistics (NBS) 2017. Nigerian's fish production 2010-2015.
- Nduaguba, D.C. (1983). *Utilization of remote sensing data for mapping aquatic ecosystems of the Nigerian coastal areas*. RSC Series 15, FAO, Rome.
- Paul, D. (1980). *A selection of simple methods for the assessment of tropical Fish stocks*. FAO. Fisheries Circular 729, FAO, Rome
- Pauly, D (1982). Studying single-species dynamics in a tropical multi-species context. In: Pauly D, Murphy GI (Eds). *Theory and management of tropical fisheries*. *ICLARM Fishbyte*, 3, 13-14.
- Pauly, D. (1983). Some Simple Methods for Assessment of Tropical Fish Stocks. Fisheries Technical Paper, 234, FAO, 52 PP
- Pauly, D., & Munro, J. I. (1984). Once More on the Comparison of Growth in Fish and Invertebrates. *Fish Byte*, 2, 21-23
- Pauly, D., & Caddy, J. F. (1985). A modification of Bhattacharya's method for the analysis of mixtures of normal distributions, FAO Fisheries Circular, 781, FAO, Rome, Italy, 16 pp.
- Pauly, D., & Soriano, M. L. (1986). Some practical extensions to Beverton and Holt's relative yield per-recruit model. In: JL. Maclean, LB. Dizon, LV. Hosillos. (Eds.) *The First Asian Fisheries Forum*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1986, pp. 491-496.
- Riede, K. (2004). Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.
- Rizkalla, S. I., & Falats, S. N. (1997). Feeding habits of chub mackerel (*Scomber japonicus*) in Egyptian Mediterranean waters. *Journal of King Abdulaziz Marine Sciences*, 8, 127-136.
- Salam, A., Naeem, M., & Kauser, S. (2005). Weight length relationship and Condition factor relationship of fresh water wild *Puntius chola* from Islambad, Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (8), 1112-1114.
- Schneider, W. (1990). FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine resources of the Gulf of Guinea. Prepared and published with the support of the FAO Regional Office for Africa. Rome, FAO. 1990. 268 p.
- Ssentongo G. W, Ajayi, T. O., & Ukpe, E. T. (1983). Report on a resource appraisal of the artisanal and in shore fisheries of Nigeria. FAO, Rome FI: DP/NIR/77/001 p.43
- Tesch, F. W. (1971). *Age and growth*. In: *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. W. E. Ricker (Ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 98-130
- Tous, P., Sidibé, A., Mbye, E., de Morais, L., Camara, K., Munroe, T., Adeofe, T.A., Camara, Y.H., Djiman, R., Sagna, A., et al. (2015). "*Sardinella maderensis*". *The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN. 2015: e.T198582A15543624. doi:10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T198582A15543624.en. Retrieved 16 June 2018
- Weber, W. (1976). *The influence of hydrographic factors on the spawning time of tropical fish*. In: Tiews K (ed), *Fisheries resources and their management in Southeast Asia*: pp. 269-281.

- Whitehead, P. J. P. (1985). *FAO Species Catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeioidi). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. FAO Fish. Synop. 125 (7/1), 1-303.* Rome.
- Wootton, R. J. (1990). *Ecology of Teleost Fishes.* 1st Edn., Chapman and Hall, London, UK., ISBN-13: 9780412317200, Pages: 404.

Soğuk şartlarda (4±1°C) Depolanan Gümüşü Havuz Balığı (*Carassius gibelio*)'nda Meydana Gelen Kalite Değişimleri ve Aşamalı Çoklu Regresyon Yöntemine Göre Raf Ömrü Tahmin Modelinin Geliştirilmesi

İsmail Yüksel GENÇ^{*in}, Abdullah DİLERⁱⁿ

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: ismailgenc@isparta.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 04 Mart 2019; Kabul 26 Haziran 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Genç, İ.Y., & Diler, A. (2019). Soğuk şartlarda (4±1°C) depolanan gümüşü havuz balığı *Carassius gibelio*'da meydana gelen kalite değişimleri ve aşamalı çoklu regresyon yöntemine göre raf ömrü tahmin modelinin geliştirilmesi. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 365-377. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.535446>

Özet

Bu çalışmanın amacı soğuk şartlar altında depolanan gümüşü havuz balığı (*Carassius gibelio*)'nda depolama zamanı ve mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşsal verilere dayanarak aşamalı çoklu regresyon yöntemine göre bir raf ömrü tahmin modeli geliştirmektir. Avcılık yöntemi ile elde edilen *C.gibelio* bütün olarak soğuk şartlar altında (4±1°C) 11 gün boyunca depolanmıştır. Örnekler depolama süresi boyunca Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB), toplam psikrofilik aerobik bakteri (TPAB), Enterobacteriaceae, Laktik Asit Bakterileri (LAB), pH, duyuşsal analiz (koku, renk, tekstür ve genel beğeni) açısından değerlendirilmiştir. Araştırma sonuçları bütün olarak depolanan *C.gibelio*'nun soğuk şartlar altında 11 gün raf ömrüne sahip olduğunu göstermiştir. Aşamalı çoklu regresyon modeline göre sadece 2 parametre (genel beğeni ve TMAB) kullanılarak depolama zamanının tahmininin yapılabilceği gösterilmiştir. Geliştirilen model matematiksel olarak Depolama zamanı = 3,374+ (Genel beğeni*-3,211) + (TMAB*1,482) eşitliği ile açıklanabilmektedir. Bununla birlikte, F istatistiklerine göre modelin kullanılabilir olduğu araştırma sonuçlarına göre rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aşamalı çoklu regresyon, raf ömrü tahmini, kalite değişimleri, *Carassius gibelio*.

Quality Changes and Development of Shelf Life Prediction Model Based on Stepwise Multiple Regression in Prussian Carp (*Carassius gibelio*) Stored Under Chilled Conditions (4±1°C)

Abstract

The aim of this study is to develop a shelf life prediction model based on the data of microbiology, chemical and sensory in accordance with the stepwise multiple regression in whole prussian carp (*Carassius gibelio*) that are stored under chilled conditions. Captured *C. gibelio* were stored for 11 days under chilled conditions (4±1°C). Specimens were evaluated in terms of the changes in Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB), total psychrophilic aerobic bacteria (TPAB), Enterobacteriaceae, Lactic Acid Bacteria (LAB), pH, sensory analysis (odor, color, texture and general acceptability) during storage time. The results of this study are showed that whole stored *C. gibelio* has 11 days of shelf life under chilled conditions. Regarding to the stepwise regression model the shelf life prediction can be made by only using two parameters (general acceptability and TMAB). The developed model could be mathematically explained by the equation storage time= 3.374+ (general acceptability*-3.211) + (TMAB*1.482). However, it was reported that the developed model can be used according to the F statistics.

Keywords: Stepwise multiple regression, shelf life prediction, quality changes, *Carassius gibelio*

GİRİŞ

Avcılık yolu ile elde edilen *Carassius gibelio* ülkemizde taze olarak tüketime sunulmaktadır. Üretim miktarı ise 2012 yılında 5.090 ton ve 2017 yılında ise artarak 7.035 ton olarak bildirilmiştir (TUİK, 2019). Balıklarda bozulma, kırmızı et ve kanatlı etine göre daha hızlı olabilmektedir. Bozulma süreci, genel anlamda bakteri faaliyetleri sonucu mikrobiyolojik (spesifik bozulma organizmaları), azotlu ve azotlu olmayan bileşiklerin oluşumu sonucu kimyasal ve duyuşsal kayıplar ile oluşabilmektedir (Gram ve Huss, 1996; Zhang vd., 2017). Su ürünlerinde depolama sırasında meydana gelen kalite kayıpları yüksek oranda depolama sıcaklığına bağlıdır (Genç, 2018). Sıcaklığın düşürülmesi mikrobiyolojik ve enzimatik faaliyetler yavaşlatır ve bunun sonunda su ürünleri gibi çabuk bozulan gıdaların depolama süreleri uzatılabilmektedir.

Hasat yönteminin de kalite değişimleri ve raf ömrü üzerine etkisinin varlığı üzerine çalışmalar da yapılmıştır. Örneğin, Scherer vd. (2006) yapmış oldukları çalışmada farklı hasat tekniklerinin ot sazanında (*Ctenopharyngodon idella*) kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesine olan etkisini incelemiş, buzlu suya daldırma ve elektrik ile muameleden sonra buzlu suda asfiksasyon yöntemlerini inceledikleri çalışmada, hasat yönteminin raf ömrüne bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sazan balıklarını $1,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de 20 gün boyunca depolamışlardır. Araştırma sonuçlarına göre farklı öldürme metotları arasında depolama sonunda bir fark gözlenemediği bildirilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada araştırmacılar, buzda depolanan ot sazanı filetolarında (*Ctenopharyngodon idellus*) kalite değişimlerini incelemişlerdir. Bu çalışmada sazan filetoları 12 günlük depolama süresince kalite indeks metodu, kimyasal, mikrobiyolojik ve tekstür yönünden incelenmiş ve depolama zamanı ile kalite indeks metodu arasında güçlü doğrusal bir korelasyon bulunmuştur. Araştırmacılar sazan filetolarının tazeliğini, 10 gün boyunca soğuk şartlar altında muhafaza ettiğini ve 10 günden sonra mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşal açıdan değerlerin kabul edilebilir değerlerin üzerine çıktığını rapor etmişlerdir (Zhu vd., 2012).

Sazan balıklarında soğuk depolama şartlarında kalite değişimlerini belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Can, 2011; Lu vd., 2014; Kachele vd., 2017; Lu vd., 2014; Agüeria vd., 2016; Hudecová vd., 2010; Yu vd., 2017; Fan vd., 2016). Ancak yapılan bu çalışmalar kalitatif olarak, genellikle geleneksel yöntemler ile örneklerin kalite parametrelerinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir.

Gıdalarda kalite kayıplarının bir bütün olarak düşünülmesi ve her bir faktörün örneklerin raf ömrüne nasıl bir etki yarattığının belirlenmesi gerekmektedir. Gıdalarda raf ömrü belirlenirken zaman alan ve pahalı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Prediktif modeller ise gıdaların çevresel etkilere nasıl tepki verdiğini matematiksel olarak ifade eden denklemlerdir. Bu kapsamda bir ürünün raf ömrü belirlenirken prediktif modellerin kullanılması hem zaman hem ekonomik olarak avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, gıdalarda ve özellikle su ürünleri gibi çabuk bozulan gıdalarda bozulma, kalitenin korunması ve raf ömrünün belirlenmesinde çoklu regresyon gibi istatistiksel metotlar sıklıkla kullanılmaktadır (Jung vd., 2013; Fidelis vd., 2017)

Literatürde birçok metot bulunmasına rağmen su ürünlerine ilişkin olarak Jorgensen vd. (2000) Salmon (*Salmo salar*) balıkları için çoklu bileşen kalite indeks metodunu önermiştir. Bu metoda göre ürünün raf ömrü biyojenik amin içeriği ve pH'ya göre belirlenebilmektedir. Bununla beraber Leroi vd. (2001) yapmış oldukları çalışmada soğuk dumanlanan salmon balıkları için mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal değişkenlere dayalı aşamalı çoklu regresyon yöntemini önermişlerdir.

Yapılan bu çalışma bütün olarak soğuk şartlar altında depolanan *C. gibelio*'da depolama sırasında meydana gelen mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşal değişimlerin belirlenmesini ve aşamalı çoklu regresyon yöntemine göre matematiksel olarak raf ömrü tahmin modelinin geliştirilmesini amaçlamaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM

C. gibelio Temini

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları $328,48\pm 29,04$ g olan 30 adet *C. gibelio* kullanılmıştır. Eğirdir gölünden avcılık yolu ile balıkçılar tarafından temin edilen örnekler ticari faaliyet gösteren işletmelerden temin edilmişlerdir. Balıklar yakalandıktan 12 saat sonra strafor kutu içerisinde buz muhafazalı olarak laboratuvara getirilmiş ve mikrobiyolojik, kimyasal ve duyuşal analizler gerçekleştirilmiştir.

Depolama Şartları ve Örnekleme

C. gibelio örnekleri bütün olarak buzdolabı koşullarında ($4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) strafor kutu içinde depolanmışlardır. Strafor kutu içerisinde aerobik olarak depolanan örneklerin kurumasını en aza indirmek için strafor kutunun sıcaklığı depolama sıcaklığına geldikten sonra kapağı kapatılmıştır. Örnekler duyuşal olarak reddedilene kadar depolanmış ve depolamanın 0, 1, 4, 7 ve 11. gününde örnekleme yapılmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler

Gümüşü havuz balıklarında depolama süresince meydana gelen mikrobiyolojik değişimlerin belirlenmesi Genç vd. (2015) tarafından belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. *C. gibelio* örneklerinden alınan 10 g derili kas 90 ml peptonlu su (Merck 107228) ile homojenize edilmiştir. Sonraki seyreltmeler ilk seyreltme sıvısından hazırlanmıştır. Toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı, Toplam psikrofilik aerobik bakteri sayısı (TPAB), Laktik asit bakterileri (LAB) ve Enterobacteriaceae familyası üyelerinin sayıları sırasıyla Plate Count Agar (PCA, Merck 105463), de Man Rogosa and Sharpe (MRS agar, Merck 110660) agar ve Violete Red Bile Glucose Agar (VRBG agar, Merck 1.10275) kullanılarak belirlenmiştir. Belirtilen her bir besi yerine gerekli seyreltmeden 1 ml inoküle edilmiş ve dökme plak yöntemine göre besi yerleri inkübasyona hazırlanmıştır. Hazırlanan TMAB, TPAB, LAB ve Enterobacteriaceae familyasına ait besi yerleri sırasıyla 30°C'de 2 gün, 4°C'de 10 gün, 25°C'de 5 gün ve 37°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra 30-300 arası koloniye sahip olan petri kaplarının sayımları yapılmıştır. Bakteri sayıları log kob/g olarak ifade edilmiş ve ortalama \pm standart sapma olarak rapor edilmiştir.

Kimyasal Analiz

Balık örneklerinde meydana gelen kimyasal değişimleri belirlemek için örnekleme günlerinde derili olarak alınan balık eti örnekleri 1:1 oranında deiyonize saf su ile homojenize edilmiş ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Hanna 221 pH meter, USA).

Duyusal Analizler

Depolama süresince duyu analizler Dalgaard (2000) tarafından belirtilen yöntemin modifikasyonlarına göre yapılmıştır. Balık örneklerinde meydana gelen duyu analizler 3-5 uzman panelist tarafından değerlendirilmiştir. Panelistler her örnekleme gününde gümüşü havuz balıklarının koku, renk, tekstür ve genel beğeni açısından değerlendirmişlerdir. Örneklerin duyu analiz değerlendirmesinde 3 (1 en düşük (raf ömrü sonu) ve 3 en yüksek (raf ömrü başı)) ifadeli skala kullanılmıştır. Depolama sonunda örneklerin değerlendirilmesi duyu kalite değişimlerinin ortalaması \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

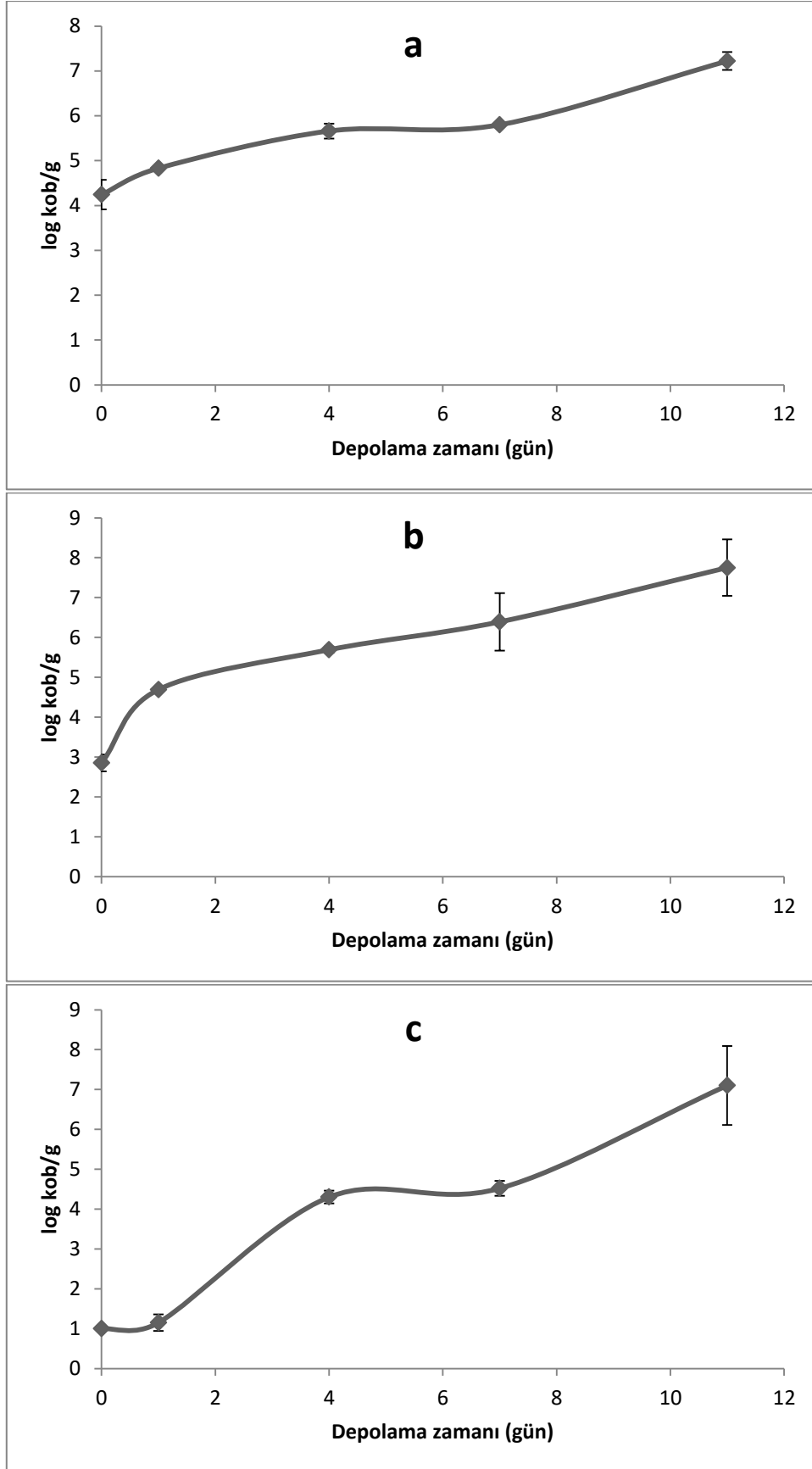
İstatistik Analizler ve Aşamalı Çoklu Regresyon Modeli

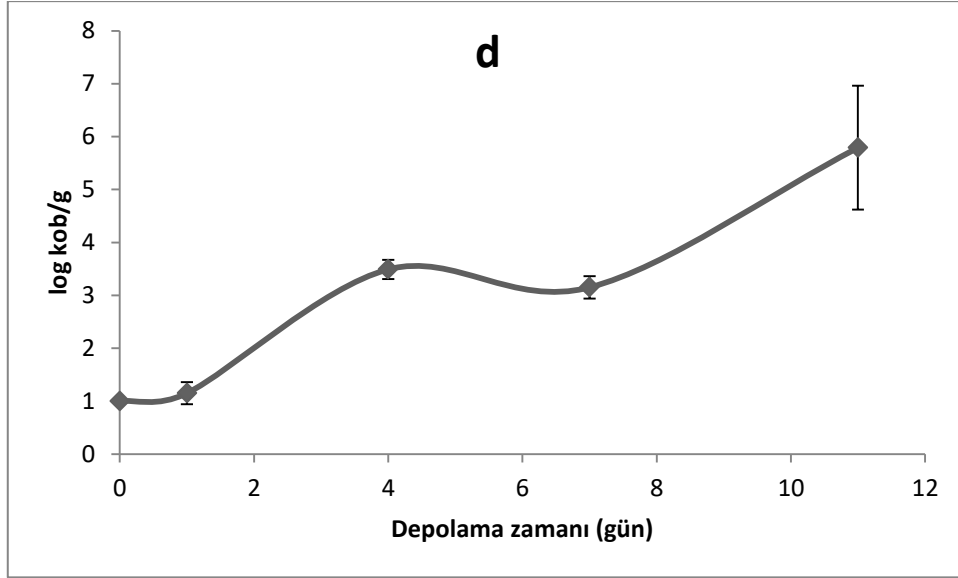
Depolama süresince boyunca elde edilen mikrobiyolojik, kimyasal ve duyu analizler Tek-Yönlü Varyans (ANOVA) analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar Tukey testi ile belirlenmiştir. Ortalamaların çoklu karşılaştırmaları istatistik paket programı (SPSS, 17.0, IBM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Esteves, 2011). Aşamalı çoklu regresyon modeli Minitab paket istatistik programı (Minitab, Coventry, UK) kullanılarak oluşturulmuştur (Svertsvik vd., 2003). Aşamalı çoklu regresyon modelinde mikrobiyolojik, kimyasal ve duyu analizler bir bütün olarak modele eklenmiş ve bu parametrelerin depolama zamanını nasıl etkilediği hesaplanmıştır. Bu kapsamda bağımlı ve bağımsız değişkenler aşamalı çoklu regresyon modelinde kullanılmak üzere modele dâhil edilmiş ve modele önem seviyesine göre en az katkı sağlayan değişkenler modelden aşamalı olarak çıkarılmıştır. Geliştirilen modelin validasyonu literatür verileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modelin geçerliliği ve hassasiyeti F-testi sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

C. gibelio'da Meydana Gelen Mikrobiyolojik Değişimler

Bütün olarak buzdolabı koşullarında depolanan *C. gibelio*'da meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 1'de sunulmuştur. Depolama süresince TMAB, TPAB, Enterobacteriaceae ve LAB sayıları istatistik olarak önemli derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$). Depolamanın başında $4,24 \pm 0,33$ log kob/g olan TMAB sayıları depolamanın son günü olan 11. günde $7,22 \pm 0,20$ log kob/g olarak rapor edilmiştir (Şekil 1 a). Bütün olarak depolanan gümüşü havuz balıklarındaki TPAB sayıları (Şekil 1 b) ise depolamanın başında TMAB sayılarına göre daha düşük olarak $2,85 \pm 0,21$ log kob/g ve depolama sonunda ise TMAB sayısından yüksek olarak $7,75 \pm 0,71$ log kob/g olarak bulunmuştur. Depolama süresince TMAB ve TPAB sayılarındaki artış istatistik olarak 4 ve 7. depolama gününde önemli olmuştur ($p < 0,05$).





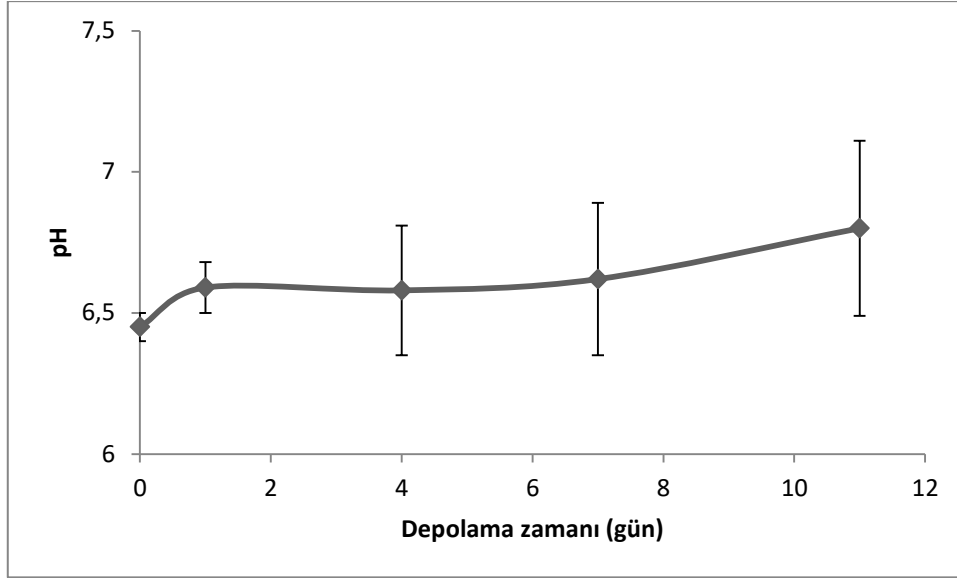
Şekil 1. Buzdolabı koşullarında bütün olarak depolanan *C. gibelio* 'da meydana gelen mikrobiyolojik değişimler. a:TMAB, b: TPAB, c: Enterobacteriaceae, d: LAB sayılarını göstermektedir.

Li vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada *Carassius auratus*'un raf ömrünü soğuk depolama şartlarında ($4\pm 1^\circ\text{C}$) doğal koruyucular (çay polifenoller ve biberiye ekstraktı) kullanarak uzatmayı amaçlamışlardır. Araştırmacılar doğal koruyucu eklenmeyen kontrol grubunda toplam bakteri sayılarını depolamanın başında $2,84 \log \text{ kob/g}$ ve depolamanın 10. gününde ise $6,97 \log \text{ kob/g}$ olarak bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada araştırmacılar farklı öldürme metotları kullanarak *C. idella*'da meydana gelen kimyasal ve mikrobiyolojik değişimleri incelemişlerdir. Araştırma sonuçları incelenen örneklerin mezofilik ve psikrotrofik bakteri sayılarının 13 ve 16. günler arasında ICMSF (1986) tarafından belirlenen $6 \log \text{ kob/g}$ olan limitini aştığını belirtmişlerdir (Scherer vd., 2006). Yapılan bu çalışmada *C.gibelio* örneklerinin ICMSF (1986) tarafından belirtilen limitlere TMAB ve TPAB açısından depolamanın 7. gününde yaklaştığı ancak değerlendirilen bütün bakteri grupları göz önüne alındığında ise depolamanın son günü olan 11. günde bu limitin üzerine çıktığı görülmüştür (Şekil 1 a-b). Bu kapsamda yapılan diğer çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Enterobacteriaceae familyasının üyeleri ve LAB sayıları depolamanın başında TMAB ve TPAB sayılarına göre daha düşük olarak $1,00\pm 0,00 \log \text{ kob/g}$ olarak bulunmuştur. Depolama süresince Enterobacteriaceae ve LAB sayıları önemli derecede ($p<0,05$) artış göstererek depolama sonunda sırasıyla $7,10\pm 0,99$ ve $5,79\pm 1,17 \log \text{ kob/g}$ olarak rapor edilmiştir (Şekil 1 c-d). Enterobacteriaceae familyasının üyeleri taze soğutulmuş su ürünlerinin bozulma mikroflorasında bulunduğu bildirilmiştir (Gram ve Dalgaard, 2002). Gümüşü havuz balığı ile yapılan bu çalışmada Enterobacteriaceae sayıları TMAB ve TPAB sayılarına benzer olarak bulunmuştur. Koutsoumanis vd. (1999) 0°C 'de bütün depolanan çipura (*Sparus aurata*) ile yapmış oldukları çalışmada başlangıç Enterobacteriaceae sayılarını $1,90\pm 0,00 \log \text{ kob/g}$ olarak bildirirken 14 günlük depolamanın sonunda ise $3,90\pm 1,20 \log \text{ kob/g}$ olarak gümüşü havuz balığı ile yapılan bu çalışmaya göre daha düşük olarak rapor etmişlerdir. Taze soğutulmuş diğer balık türleri (*Dicentrarchus labrax*) ile yapılan çalışmalarda ise Enterobacteriaceae sayıları daha düşük olarak bildirilmiştir (Paleologos vd., 2004). Depolama sonunda LAB sayıları diğer bakteri gruplarına göre daha düşük değerler sergilemiştir. LAB sayılarının daha düşük değerlerde gözükmesinin sebebi olarak ise bu bakteri gruplarının genellikle yarı korunmuş su ürünlerinde daha yüksek öneme sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Françoise, 2010).

***C. gibelio*'da Meydana Gelen Kimyasal Değişimler**

Buzdolabı koşullarında bütün olarak depolanan *C. gibelio*'da meydana gelen kimyasal değişimler Şekil 2'de sunulmuştur. Depolama süresince *C. gibelio*'da kas pH'sında önemli bir değişime rastlanılmamıştır ($p>0,05$). Depolamanın başında $6,45\pm 0,05$ olan pH değeri depolama süresince önemli olmayan derecede artış göstererek 11. günde $6,80\pm 0,31$ olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

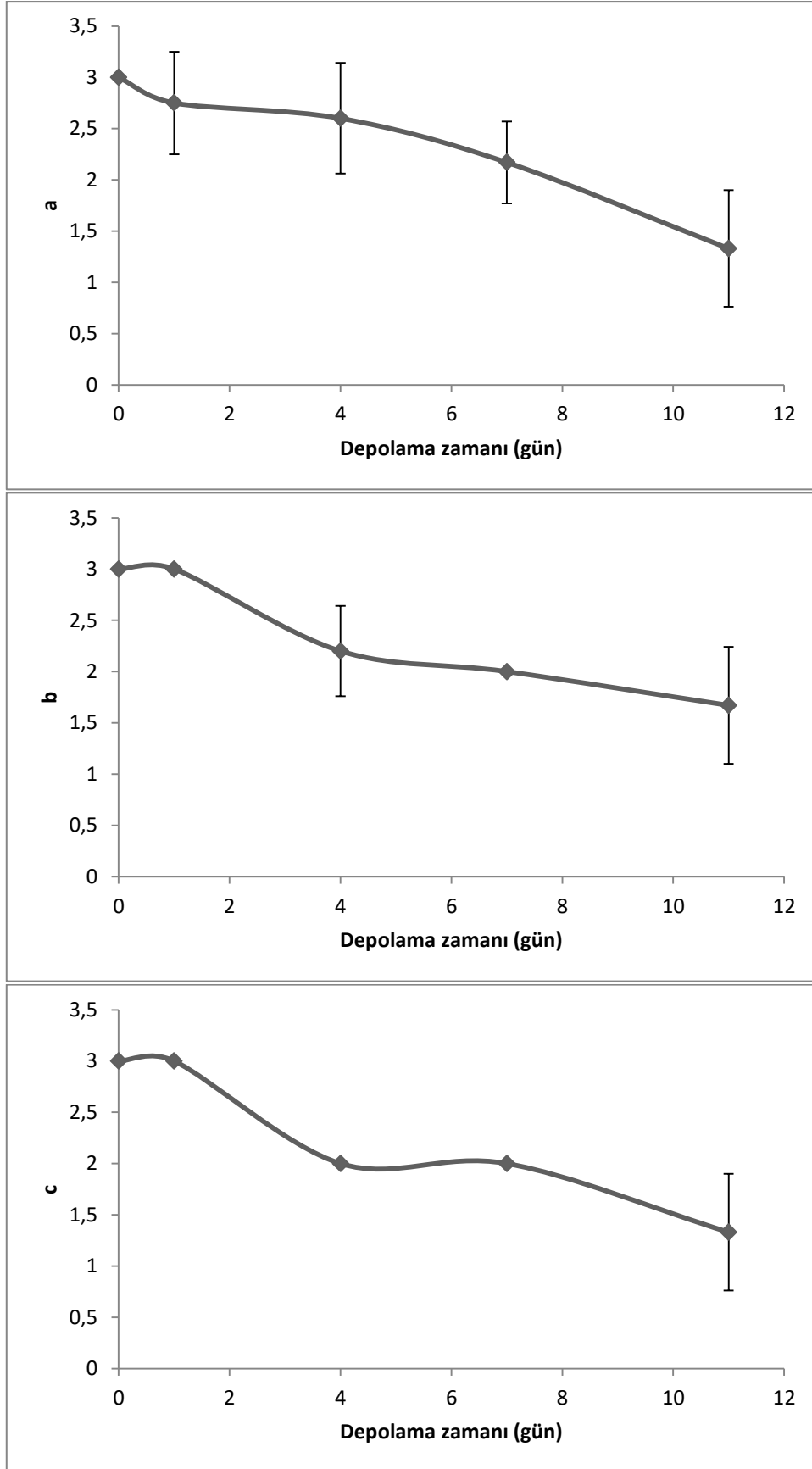


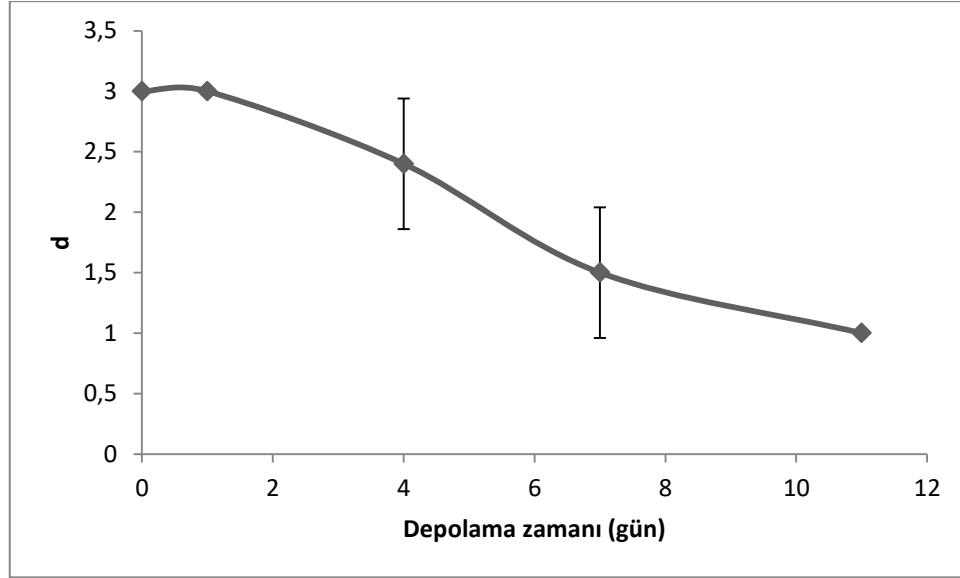
Şekil 2. Buzdolabı koşullarında bütün olarak depolanan *C. gibelio*'da meydana gelen kimyasal değişimler

Araştırmacılar balık kasındaki pH düşüşünün glikojenin ATP ve kreatin fosfata parçalanmasına ve balık kasında CO₂'nin çözünmesi ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Manju vd., 2007; Zhang vd., 2012). Ancak buzdolabı koşullarında depolanan *C. gibelio*'da pH da depolama süresince meydana gelen değişim artış yönünde olmuştur. Gümüş sazan balıkları (*Hypophthalmichthys molitrix*) ile yapılan bir çalışmada kitosan ile kaplanan iç organları alınmış örneklerin depolama süresince pH'larında meydana gelen değişim *C. gibelio* ile yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar *H. molitrix*'in başlangıç pH'sını yaklaşık olarak 6,00 olarak bildirirken depolama sonunda (30 gün) kontrol ve kitosan ile kaplı örneklerin pH'ları sırasıyla yaklaşık 7,5 ve 7,0 olarak bildirilmiştir (Fan vd., 2009). Ancak depolamanın ilk günlerinde meydana gelen düşüş *C. gibelio* ile yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermemektedir. Gümüş sazan balığı (*H. molitrix*) kıymaları ile yapılan diğer bir çalışmada 6 ay boyunca dondurulmuş olarak depolanan örneklerin pH larında meydana gelen değişimin istatistiki olarak önemsiz olduğu bildirilmiştir (Asgharzadeh vd., 2010). Yapılan bu çalışmada da istatistiki olarak önemli olmayan değişimler ($p>0,05$) rapor edilmiştir ve bu kapsamda yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir.

***C. gibelio*'da Meydana Gelen Duyusal Değişimler**

Soğuk şartlar altında depolanan *C. gibelio*'da depolama süresince meydana gelen duyusal değişimler koku, renk, tekstür ve genel beğeni açısından 3 ifadeli skalaya göre incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3'te sunulmuştur. Örneklerin incelenen parametreleri depolama zamanına bağlı olarak önemli derecede düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Depolama sonunda örnekler koku, renk, tekstür ve genel beğeni açısından sırasıyla $1,33\pm0,57$; $1,67\pm0,57$; $1,33\pm0,57$ ve son olarak $1,00\pm0,00$ değerlerine ulaşmış ve raf ömrünü tamamlamış olarak kabul edilmişlerdir. Su ürünlerinin kabul edilebilirliği yüksek oranda tüketicilerin genel beğenilerine bağlıdır. Bu çalışmada örneklerin renk ve tekstür (Şekil 3 b-c) açısından değerlendirildiğinde değerlerinde önemli bir düşüş olmasına rağmen istatistiki sonuçlara göre ürün kalitesinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Bununla birlikte renk parametresi (Şekil 3 a) balığın büyük pullu olmasından kaynaklı olarak büyük ölçüde korunduğu kanaatine varılmıştır. Ancak genel beğeni parametresinin (Şekil 3 d) zamana göre sistematik bir şekilde azaldığı görülmektedir. Bu kapsamda soğuk şartlar altında bütün olarak depolanan *C. gibelio* tazeliğini 11 güne kadar korumaktadır. Bu sonuçlar mikrobiyolojik veriler ile desteklenmektedir (Şekil 1 a-d). Duyusal değerlerin zamana göre önemli ölçüde düşüş gösterdiği diğer sazan türleri (*C. carpio* ve *H. molitrix*) ile yapılan diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (Tokur vd., 2006; Fan vd., 2009).





Şekil 3. Buzdolabı koşullarında bütün olarak depolanan *C. gibelio*'da meydana gelen duysal değişimler. a: Koku, b: Renk, c: Tekstür, d: Genel beğeni değerlerini göstermektedir.

Aşamalı Çoklu Regresyon Modelinin Geliştirilmesi

Aşamalı çoklu regresyon modeli çok değişkenli parametreleri içeren sistemlerde modele en fazla katkı yapan değişkeni/değişkenleri bulmaya yönelik olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu kapsamda model geliştirilmeden önce bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki korelasyonlar Tablo 1'de sunulmuştur. Yapılan bu çalışmada depolama zamanının diğer kalite parametreleri ile korelasyonu incelendiğinde en düşük korelasyonun 0,913 ile pH ve en yüksek korelasyonun ise -0,988 ile genel beğeni parametresi olduğu açıkça görülmektedir (Tablo 1). Tüm bu değişkenler ile oluşturulan çoklu doğrusal regresyon modeli eşitlik (1)'de gösterilmiştir. Çoklu doğrusal regresyon modelinde kullanılan değişkenler depolama zamanı ile yüksek korelasyon göstermiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki korelasyon değerleri

	Depolama Zamanı
Depolama Zamanı	1,000
TMAB	,967
TPAB	,931
Enterobacteriaceae	,962
LAB	,932
Koku	-,978
Renk	-,962
Tekstür	-,957
Genel beğeni	-,988
pH	,913

Ancak depolama zamanı tahmini 9 değişkenli çoklu doğrusal regresyon ile tahmin edildiğinde gözlenen ve beklenen değerler arasında istatistiki olarak önemli farklar görülmüştür ($p < 0,05$) (sonuçlar gösterilmemektedir). Bununla birlikte mikrobiyolojik verilerin ise korelasyonları yüksek olmasına rağmen (Tablo 1) modeldeki katsayılarının oldukça düşük olduğu görülmektedir (Eşitlik 1).

$$\text{Depolama zamanı} = -0,814 + (\text{TMAB} * 4,58e-14) + (\text{TPAB} * -7,46e-14) + (\text{Enterobacteriaceae} * 8,91e-14) + (\text{LAB} * 1,30e-13) + (\text{Koku} * -2,34) + (\text{Renk} * -2,151) + (\text{Genel beğeni} * -1,596) + (\text{pH} * 2,959)$$

(1)

Aşamalı çoklu regresyon modeline göre denklemden çıkarılan parametreler Tablo 2’de sunulmuştur. Bu kapsamda çıkarılan parametreler en düşük kısmi korelasyon derecesinden en yükseğe doğru incelendiğinde sıralamanın Enterobacteriaceae, tekstür, renk, TPAB, LAB, koku ve pH olduğu görülmektedir.

Tablo 2. Aşamalı çoklu regresyon modelinden çıkarılan parametreler

Model	Beta In	t	Sig	Kısmi korelasyon
TPAB	,062	1,033	,341	,389
Enterobacteriaceae	-,012	-,125	,905	-,051
LAB	,085	1,496	,185	,521
Koku	-,161	-2,064	,085	-,644
Renk	,032	,360	,731	,145
Tekstür	-,011	-,130	,901	-,053
pH	,115	2,159	,074	,661

Aşamalı regresyon modeli incelendiğinde depolama zamanının kalan diğer parametreler ile (genel beğeni ve TMAB) ilişkili olduğu ancak bu parametrelerin tek başına kullanılamayacağı Tablo 2’de modelden çıkarılan parametreler incelendiğinde görülmüştür. Bu çerçevede aşamalı çoklu regresyon modelinin son denklemi eşitlik 2’de gösterilmiştir.

$$\text{Depolama zamanı} = 3,374 + (\text{Genel beğeni} * -3,211) + (\text{TMAB} * 1,482) \quad (2)$$

Eşitlik 2’de belirtilen regresyon denkleminde istatistiki olarak önemli ($p < 0,05$) derecede regresyona ulaşılmıştır (Tablo 3). ANOVA tablosunda belirtilen modelin F-istatistiği 1098 ($p < 0,05$) ve hata kareleri toplamı 0,516 iken hata karelerinin ortalaması 0,074 olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen aşamalı çoklu regresyon modelinde düzeltilen R^2 değeri ise 0,996 olarak kaydedilmiştir. Modelin tahmin verilerine uyarlanmasında bu değer oldukça yüksek olduğu açıkça görülmektedir (Tablo 4). Bununla birlikte model parametreleri olarak kullanılan genel beğeni ve TMAB sayılarının *C.gibelio*’larda depolama zamanı varyasyonunun % 99’unun açıklandığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar sarı yüzgeçli orkinos (*Thunnus albacares*) balıklarında uçucu bileşiklerin kalite parametreleri ile ilişkisini araştırmışlardır. Araştırma yöntemine göre aşamalı çoklu regresyon metodu kullanılarak uçucu bileşiklerin toplam uçucu bazik azot (TVBN) ve duyuşal değişimler gibi parametreler ile yüksek bir korelasyona sahip olduğunu bildirmişler ve aşamalı çoklu regresyon yöntemine göre kalite parametrelerinde meydana gelen değişimlerin varyasyonlarının % 99 kadarının açıklandığını belirtmişlerdir (Edirisinghe vd., 2007). Yapılan çalışma *C.gibelio*’nun kalite değişkenlerinin varyasyonlarının açıklanması açısından benzerlik göstermektedir. Buna karşılık olarak Hassan vd., (1999) tarafından yapılan çalışmada soğuk depolanan kefal balıklarının kalite kriterleri, raf ömrü ve market kayıplarının belirlenmesi amaçlanmış ve aşamalı regresyon metodu kullanılarak raf ömrü tahmin modeli geliştirilmiştir. Aşamalı doğrultuda oluşturulan regresyon eşitliklerine göre market kayıplarının tahminindeki varyasyonların sadece % 22’si açıklanabilmiştir. Bu durumun ise bazı değişkenlerin veri toplamada kullanılmadığı veya gözlenen verilerin sayılarının yetersiz olabileceğinden kaynaklandığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ancak *C.gibelio* ile yapılan bu çalışmada varyansların %99’u açıklandığından gerekli ve yeterli parametrelerin kullanıldığı ve modele eklendiği düşünülmektedir.

Tablo 3. Aşamalı çoklu regresyon modeli ANOVA analizi

Model	Kareler toplamı	df	Kareler ortalaması	F	Sig.
Regresyon	161,884	2	80,942	1097,990	,000
Hata	,516	7	,074		
Toplam	162,400	9			

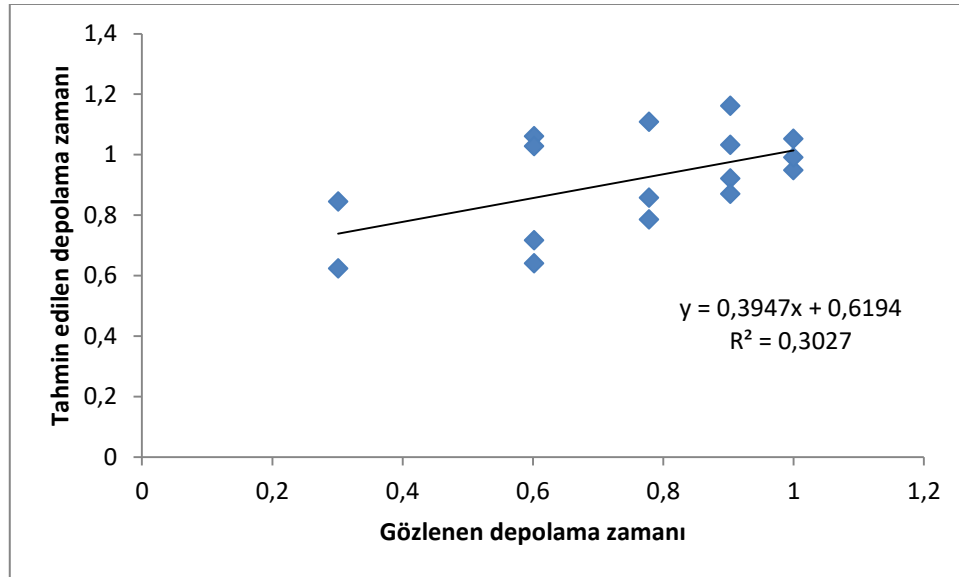
Tablo 4. Aşamalı regresyon model özeti

R	R ²	Düzeltilen R ²	Tahminin standart hatası	Değişim istatistikleri				
				R ² değişimi	F değişimi	df1	df2	Sig. F değişimi
,998	,997	,996	,272	,021	46,926	1	7	,000

Aşamalı regresyon modeli validasyonu Tablo 5’te belirtilen kaynaklara göre gerçekleştirilmiştir. Sazangiller familyasına ait olan farklı türler ile gerçekleştirilen çalışmalarda depolama sıcaklıkları *C.gibelio* ile yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Kalite değişimlerinin sıcaklığa birincil oranda bağlı olduğu bildirilirken (Genç, 2018) aşamalı çoklu regresyon modelinin validasyonunda kullanılacak olan verilerin eldesindeki depolama sıcaklıklarının aynı olmasına dikkat edilmiştir.

Tablo 5. Aşamalı çoklu regresyon modelinde validasyon için kullanılan parametreleri içeren soğuk ortamda depolanan farklı sazan balığı türleri ile yapılan çalışmalar

Tür	Depolama sıcaklığı (°C)	TMAB (log kob/g)	Duyusal analizler	Kaynak
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	+4	4,00 – 7,33	9 – 3	Huang vd., 2018
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	+4	3,44 – 8,62	9 - 1	Huang vd., 2017
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	+4	3,59 – 7,18	20 - 4	Wang vd., 2014
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	+4	4,58 – 7,09	35 - 19	Zhang vd., 2012
<i>Cyprinus carpio</i>	+4	3,90 – 8,10	20 - 9	Zhang vd., 2017

**Şekil 4.** Aşamalı çoklu regresyon modeline göre tahmin edilen ve gözlenen depolama zamanına ilişkin regresyon modeli (n=16).

Eşitlik 2 kullanılarak gerçekleştirilen depolama zamanı tahmini gözlenen veriler ile göreceli olarak yüksek korelasyon göstermiş ve sonuçlar Şekil 4’te sunulmuştur. Bu kapsamda regresyon denklemi $y=0,39x+0,61$ olarak ve açıklama katsayısı ise $R^2=0,30$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada *C.gibelio*’da gözlenen ve tahmin edilen depolama zamanı arasındaki varyasyonun % 30 kadarının açıklandığı görülmüştür. Regresyon modellerinde R^2 değeri bazı kriterlere göre birbirinden ayrılmakta ve bu kriterler R^2 değerinin kullanım alanlarını belirlemektedir. Özelliklerinden bir kısmı ise $0 \leq R^2 \leq 1$; değişken eklendiğinde R^2 değerinin değişmemesi gibi durumlar olarak araştırmacılar tarafından bildirilmiş (Cameron ve Windmeijer, 1996) ve *C.gibelio* ile yapılan bu çalışmada araştırmacılar tarafından belirtilen kriterleri sağladığı görülmüştür. Bununla birlikte F-istatistikleri incelendiğinde $F=1,94$ ve F olasılık değerinin ise 0,10 olduğu hesaplanmış ve modelin geçerliği olabileceği yapılan istatistik analizler ile ortaya konmuştur.

SONUÇ

Yapılan bu çalışmada *C.gibelio*’da meydana gelen kalite değişimlerinin belirlenmesi ve bu kalite değişimleri kullanılarak aşamalı çoklu regresyon yöntemine göre bir raf ömrü tahmin modeli geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre örnekler depolama sonunda mikrobiyolojik olarak tüketime uygun olmayan ölçüte ulaşmışlardır (≥ 7 log kob/g). Bununla birlikte duysal açıdan ise genel beğeni değeri yaklaşık olarak 7. Günde 1,5’a ulaşmış ve örnekler tüketim açısından reddedilmişlerdir. Örneklerin kalite değişimleri belirlenirken pH’larında istatistiki olarak önemli bir değişime rastlanılmamıştır.

Aşamalı çoklu regresyon modeli 9 parametre arasından sadece 2 parametrenin toplam varyansın %99 kadarını açıkladığını göstermiş ve modelde sadece genel beğeni ve TMAB sayılarının kullanılabilir olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte geliştirilen matematiksel ifade Depolama zamanı = $3,374 + (\text{Genel beğeni} \cdot 3,211) + (\text{TMAB} \cdot 1,482)$ olarak belirlenmiş ve geliştirilen modelin validasyonu literatürde belirtilen farklı türler ile gerçekleştirilmiş ve F-istatistiklerine göre modelin kullanılabileceği anlaşılmıştır. Geliştirilen modelin sadece iki parametre kullanarak raf ömrünü tahmin edebilmesi ve toplamda 48 saat içerisinde sonuç alınabiliyor olması açısından avantajları mevcuttur. Ancak geliştirilen modelin TMAB parametresini içermesi ve bu parametrenin değerinin 4 log kob/g’den küçük olmaması gerekmektedir. Doğal kontamine olmuş su ürünlerinin bakteriyel yükü yaşadığı ortama, av/hasat yöntemlerine, transfer ve depolama koşullarına büyük ölçüde bağlı olmasından dolayı bu kısıtlamanın önüne geçmek mümkün olmamaktadır. Bu kapsamda geliştirilen model genel beğeni değerleri ve TMAB sayılarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bununla beraber bu çalışmada geliştirilen model F-istatistiklerine göre büyük ölçüde başarıya ulaşmış olduğundan bilimsel çalışmalara katkı sağlaması ve endüstriye uygulanabilir olması yönüyle önem arz etmektedir.

Teşekkür: Çalışma süresince duysal analizlerde yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi personeline teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- Agüeria, D., Sanzano, P., Vaz-Pires, P., Rodríguez, E., & Yeannes, M. I. (2016). Development of Quality Index Method Scheme for Common Carp (*Cyprinus carpio*) Stored in Ice: Shelf-Life Assessment by Physicochemical, Microbiological, and Sensory Quality Indices. *Journal Of Aquatic Food Product Technology*, 25(5), 708-723.
- Asgharzadeh, A., Shabanpour, B., Aubourg, S. P., & Hosseini, H. (2010). Chemical changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) minced muscle during frozen storage: Effect of a previous washing process. *Grasas Y Aceites*, 61(1), 95-101.
- Cameron, A. C., & Windmeijer, F. A. (1996). R-squared measures for count data regression models with applications to health-care utilization. *Journal of Business & Economic Statistics*, 14(2), 209-220.
- Can, Ö. P. (2011). Evaluation of the microbiological, chemical and sensory quality of carp processed by the sous vide method. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5, 1060-1065.
- Dalgaard, P. (2000) Fresh and lightly preserved seafood. In Shelf-Life Evaluation of Foods, 2nd ed. Man, C. M. D., Jones, A. A., Eds.; Aspen Publishers: London, U.K., pp 110-139

- Edirisinghe, R. K., Graffham, A. J., & Taylor, S. J. (2007). Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC-MS and their relationship to fish quality parameters. *International Journal Of Food Science & Technology*, 42(10), 1139-1147.
- Esteves E.(2011). Statistical analysis in food science. R.M. Cruz (Ed.), Practical Food and Research, Nova Science Publishers Inc., NY, USA, pp. 409-451.
- Fan, H., Liu, X., Hong, H., Shen, S., Xu, Q., Feng, L., & Luo, Y. (2016). Quality changes and biogenic amines accumulation of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fillets stored at different temperatures. *Journal of Food Protection*, 79(4), 635-645.
- Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y., & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115(1), 66-70.
- Françoise, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, 27(6), 698-709.
- Fidelis, M., Santos, J. S., Coelho, A. L. K., Rodionova, O. Y., Pomerantsev, A., & Granato, D. (2017). Authentication of juices from antioxidant and chemical perspectives: A feasibility quality control study using chemometrics. *Food control*, 73, 796-805.
- Genç, İ. Y., Esteves, E., Anibal, J., & Diler, A. (2015). Effects of different thawing methods on the quality of meagre fillets. *Veterinary Journal of Ankara University (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi)*, 62(2), 153-159.
- Genç, İ.Y. 2018. Taze ve marine edilmiş su ürünlerinde mikrobiyal kalite değişimlerinin tahmini ve değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 131 s.
- Gram, L., & Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266.
- Hassan, I. M., Khallaf, M. F., Abd-Al Fattah, L. E., & Yasin, N. M. (1999). Quality criteria, expiration period and marketing loss estimations of pre-treated and cold stored mullet fish. *Grasas y Aceites*, 50(3), 208-217.
- Huang, Z., Liu, X., Jia, S., & Luo, Y. (2017). Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *Food Control*, 82, 316-324.
- Huang, Z., Liu, X., Jia, S., Zhang, L., & Luo, Y. (2018). The effect of essential oils on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 52-59.
- Hudecová, K., Buchtová, H., & Steinhäuserová, I. (2010). Effects of modified atmosphere packaging on the microbiological properties of fresh common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 79(9), 93-100.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1986). *Microorganisms in foods, 2: sampling for microbiological analysis: principles and specific applications* (2nd ed.). London: Blackwell Scientific Publications.
- Jorgensen, L.V., Dalgaard, P. and Huss, H.H. (2000) Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2448-2453.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Lee, H. J., & Jeon, C. O. (2013). Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food microbiology*, 34(2), 360-368.
- Kachele, R., Zhang, M., Gao, Z., & Adhikari, B. (2017). Effect of vacuum packaging on the shelf-life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4° C. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 163-168.
- Koutsoumanis, K., Lampropoulou, K., & Nychas, G. J. E. (1999). Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 C. *Journal of Food Protection*, 62(4), 398-402.
- Leroi, F., Joffraud, J. J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (2001). Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 578-587.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., & Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry*, 135(1), 140-145.
- Lu, H., Luo, Y., Zhou, Z., Bao, Y., & Feng, L. (2014). The Quality Changes of Songpu Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) during Partial Freezing and Chilled Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 948-954.

- Manju, S., Jose, L., Gopal, T. S., Ravishankar, C. N., & Lalitha, K. V. (2007). Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlsport (*Etroplus suratensis*) during chill storage. *Food Chemistry*, 102(1), 27-35.
- Paleologos, E. K., Savvaıdis, I. N., & Kontominas, M. G. (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food microbiology*, 21(5), 549-557.
- Scherer, R., Augusti, P. R., Bochi, V. C., Steffens, C., Fries, L. L. M., Daniel, A. P., Kubota, E. H., Neto, J. R., & Emanuelli, T. (2006). Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. *Food Chemistry*, 99(1), 136-142.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., & Kleiberg, G. H. (2003). Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, 68(4), 1467-1472.
- Tokur, B., Ozkütük, S., Atici, E., Ozyurt, G., & Ozyurt, C. E. (2006). Chemical and sensory quality changes of fish fingers, made from mirror carp (*Cyprinus carpio* L., 1758), during frozen storage (- 18 C). *Food Chemistry*, 99(2), 335-341.
- Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK, (2019). http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005, Erişim Tarihi 23.01.2019.
- Wang, H., Luo, Y., Huang, H., & Xu, Q. (2014). Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) filets during storage at 4° C and its contribution to biogenic amines' formation. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 66-71.
- Yu, D., Li, P., Xu, Y., Jiang, Q., & Xia, W. (2017). Physicochemical, microbiological, and sensory attributes of chitosan-coated grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets stored at 4° C. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 390-401.
- Zhang, L., Luo, Y., Hu, S., & Shen, H. (2012). Effects of chitosan coatings enriched with different antioxidants on preservation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) during cold storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(5), 508-518.
- Zhang, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kong, C., & Luo, Y. (2017). Effect of cinnamon essential oil on bacterial diversity and shelf-life in vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 1-8.
- Zhu, Z., Ruan, Z., Li, B., Meng, M., & Zeng, Q. (2013). Quality loss assessment of crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V) fillets during ice storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(3), 254-261.

Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumunun Farklı *In Vitro* Metodlarla TespitiFethi FİLİK^{*}, Ayşegül KUBİLAY

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: fethi.filik@hotmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 09 Mart 2019; Kabul 25 Haziran 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Filik, F., & Kubilay, A. (2019). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı *In Vitro* metodlarla tespiti. *Acta Aequatica Turcica*, 15(3), 378-390. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537796>**Özet**

Bu çalışmada, fenomen bir virülens faktörü olan biyofilmin, bakteriyel balık patojeni olan *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum* bakterileri tarafından üretilmesi tüp, mikropalak ve kongo red agar yöntemleriyle araştırılmıştır. Tüp yöntemi ile biyofilm oluşum dereceleri tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*'da (++) , *A. sobria*'da (++) , *S. warneri*'de (+) , *Y. ruckeri*'de (-) , *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir. Mikropalaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*'de 0,121, *A. sobria*'da 0,158, *Y. ruckeri*'de 0,071, *F. psychrophilum*'da 0,172, *V. anguillarum*'da 0,212 absorbans değeri tespit edilmiştir. Mikropalak testinde biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agar testinde biyofilm (slime) oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değişmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur. Pembe renkli koloni üreten *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* bakterileri ise bu teste biyofilm oluşumu göstermemiştir. Sonuç olarak; biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar balıklar üzerinde ölümcül etki göstermektedir. Bu etkilerin araştırılması ve durdurulması balık ölümlerinin azaltılmasında önemlidir. Bakteriyel balık patojenlerinden olan *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri*'nin araştırmamızda oldukça güçlü biyofilm oluşturdıkları farklı yöntemlerle tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel balık patojenleri, biyofilm, tüp yöntemi, mikropalak yöntemi, kongo red agar yöntemi

Determination of Biofilm Formation with Different *In Vitro* Methods in Some Bacterial Fish Pathogens**Abstract**

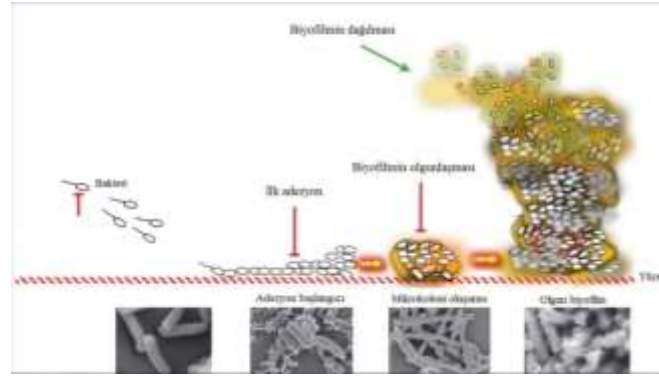
bacterial fish pathogens *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Vibrio anguillarum* by tube, microplate and congo red agar methods. The degree of biofilm formation by the tube method in order according to the thickness of the film formed on the inner surface of the tube is in *F. psychrophilum* (++) , in *A. sobria* (++) , in *S. warneri* (+) , in *Y. ruckeri* (-) was determined as (-) in *V. anguillarum*. In the biofilm biofilm test with microplates, the biofilm was found to be 0.048 in the negative control, 0.121 in *S. warneri*, 0.158 in *A. sobria*, 0.071 in *Y. ruckeri*, 0.172 in *F. psychrophilum* and 0.212 absorbance in *V. anguillarum*. Biofilm formation in microplate test was determined as *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*. In congo red agar test, biofilm formation was determined as *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* according to color change of colony morphology of bacteria forming slime. The most powerful biofilm formation by producing dry crystallized black colony in congo red agar was found in *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*. The pink colony producing *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* bacteria did not show biofilm formation in this test. As a result; Biofilm induced infections show a lethal effect on fish. Investigation and cessation of these effects is important in reducing fish mortality. It was determined that cacterial fish pathogens *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* create a very strong biofilm by using different methods.

Keywords: Bacterial fish pathogens, biofilm, tube method, microplate method, congo red agar method.

GİRİŞ

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan, iletişim ve bilgi aktarımına izin veren, farklı gen transkripsiyonu ve büyüme oranlarına bağlı olarak farklı fenotipik özellik gösterebilen (Donlan ve Costerton, 2002), birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir mimari organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Post vd., 2004). Biyofilm, kalınlığı 0,2 mikron üstünde ise bakteri içerebileceği belirtilmiştir (Larson, 2011). Dünyadaki mikrobiyal kütleinin %80 kadarının biyofilm durumunda bulunduğu iddia edilmektedir (Davies, 2003; Richards ve Melveer, 2009). Mikrobiyal biyofilmlerin balık sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ulusal sağlık enstitüleri enfeksiyonların %80'inden fazlasına biyofilmlerin neden olduğunu tahmin etmektedir (Donlan ve Costerton, 2002). Bu iddialar göz önüne alındığında savaşmamız gereken biyofilmlerin ne derece önem arz ettiği daha iyi anlaşılmaktadır. Söz konusu biyofilmin kimyasal kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir.

Biyofilm kitlesi yerleştiği bölgeye göre değişir ve genellikle bakteri, mantar, alg ve protozoa ve fajları içeren birçok mikroorganizma türünden oluşur (Wu vd., 2015). İlk yapışma (adezyon) olduğunda biyofilmin uzaklaştırılması artık zordur (Bryers, 2008).



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun aşamaları (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012)

Biyofilm gelişmesinin beş aşaması (Şekil 1); 1: Planktonik bakterilerin biyomateryal yüzeyine yapışmaları, 2: Hücrelerin mikro koloniler oluşturması, ekstraselüler polimerik substantlar (EPS) yani slimenin dışarı atılması ve bağlanmanın geri döndürülemez hale gelmesi, 3: Biyofilm oluşması, olgunlaşması, 4: Üç boyutlu büyüme ve konakçı savunma mekanizmalarına ve antibiyotiklere karşı koruma sağlayarak biyofilmin daha da olgunlaşması, 5: Biyofilmin, kritik bir kütleyle ulaşması, diğer yüzeylere kolonize olmaya hazır olması ve planktonik bakterilerin dağılması şeklinde gelişmektedir (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012).

Tablo 1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu (Jamal vd., 2015)

Bileşen (Component)	Matriksteki yüzdesi
Mikrobiyal hücre	%2-5
DNA ve RNA	< %1-2
Polisakkaritler	%1-2
Proteinler	< %1-2
Su	%97



Şekil 2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005)

Biyofilmlerle ilgili balık enfeksiyonları araştırıldığında *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Bacillus* ve *Aeromonas* gibi bakteri türler biyofilm oluşturmakta ve hastalıklara neden olmaktadır (Mortensen, 2014). Biyofilmler bakterilerin birbirleri arasında horizontal gen transferi yapması için elverişli ortamlardır. Horizontal gen transferi bakterilere, balık enfeksiyonlarıyla mücadele de antimikrobiyal direnci gibi adaptif mutasyonlar geliştirmeleri avantajını sağlamaktadır. Enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan bakterilerin immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazırdır (Jurcisek ve Bakaletz, 2007).

Bakteriyel patogenezele ilgili yapılan araştırmaların çoğu akut enfeksiyonlara odaklanmış ancak bu hastalıklar, şimdi biyofilm (Şekil 2) içinde yetişen bakterilerin neden olduğu yeni bir kategori olan kronik enfeksiyonlarla desteklenmektedir. Kronik yaralar, fibrinöz peritonitis enfeksiyonları gibi biyofilm enfeksiyonları, dünyadaki milyonlarca balığı her yıl etkilemekte ve birçok ölüm meydana getirmektedir. Özellikle kronik biyofilmin temeli enfeksiyonların önemli noktası antibiyotiklere karşı aşırı direnç ve konakçı savunmalarından kaçmaktır (Bjarnsholt, 2013). Söz konusu tehlikeli biyofilm su ürünleri yetiştiriciliğinde de balık pulları gibi balığın vücudunda ve yetiştiricilik tesislerinde kullanılan birçok materyalin yüzeyinde görülmektedir. Etkili bir virülens faktörü olan biyofilmin yetiştiricilik tesislerinden uzak tutulması bu nedenle oldukça önemlidir.

S. warneri'de, *A. sobria*'da, *Y. ruckeri*'de, *F. psychrophilum*'da ve *V. anguillarum*'da biyofilm üretimi açısından araştırıldığında Stafilokokların biyofilm oluşturmalarında *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit intersellüler adhesin (PIA) en önemli rolü üstlendiği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Arciola vd., 2015). *S. warneri*'de hasta balıklar arasında kronik enfeksiyonların patognomik olduğu biyofilmi oluşturur (Molobela vd., 2010). *Aeromonas*'larda biyofilm oluşumunda polar flagella ile yüzme hareketinde ve başlangıç tutunmasında, lateral flagella ile ise hücrelerin kolonizasyonunda rol oynamaktadır (Kirov vd., 2003). Rahman vd., 2007'de *Aeromonas* klonlarının güçlü biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. C-di-GMP (cyclic di-GMP) birçok bakteride biyofilm oluşumunu düzenlediğini bildirmiştir. *Yersinia* bakteri türleri Quorum Sensing: QS (Çevreyi Algılama) adı verilen bakteriyel iletişim mekanizmasının düzenlediği 3-oxo-C8-HSL molekülüyle biyofilm üretmektedir (Delshad vd., 2018). *Y. ruckeri*'de flagellar proteinin salgılanmasıyla yapışkanlığı artmakta ve biyofilm oluşturabilmektedir (Coquet vd., 2002). *F. psychrophilum* mutantları yüksek biyofilm geliştirir. Donlan, 2002; Högfors-Rönnholm vd., 2015; Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017 yaptıkları çalışmalarda *F. psychrophilum*'un virülens ve biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğunu ifade etmişlerdir (Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017). *V. anguillarum*'da, transkripsiyonel düzenleyici, VanT'nin, biyofilm oluşumunu düzenlediği gösterilmiştir. *V. anguillarum*-VanT mutanı ve Sat-Vps73 DNA loküsünde polar mutasyon taşıyan bir mutantın, hatalı biyofilmler ürettiğini göstermiştir (Croxatto vd., 2002). *Vibrio*'ların biyofilm oluşturmasının özel genetik yapılarına (flagella, pili ve ekzopolisakkarit biyosentezi) ve düzenleyici işlemlere (iki düzenleyici bileşen, çevreyi algılama ve c-di-GMP molekülleri) bağlı olduğu bilinmektedir (Yıldız ve Visick, 2009).

Bu çalışmanın amacı; hasta balıklardan izole edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* balık patojenlerinin biyofilm virülens gücü birbirinden farklı metotlar olan tüp, mikropalak, kongo red agar yöntemleriyle araştırılmasıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakteriyel Suşlar (*S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* Suşlarının Üretim ve Depolanması)

Araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarından temin edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşları kullanılmıştır. *F. psychrophilum* 15°C’de, diğer patojenler 25°C’de üretilmiştir. Suşlar kullanılmaya kadar -80°C’de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C’den alınarak -20°C’de bekletildikten sonra *F. psychrophilum* Ordal Agar, diğer patojenler TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* 25°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekimleri yapılan *F. psychrophilum* suşu ise 15°C’de 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C’de saklanmıştır.

Patojenlerin Biyofilm Testleri

Tüp yöntemi, mikropalak yöntemi ve kongo red agar yöntemi olmak üzere 3 farklı metotta araştırılmıştır.

Tüp Yöntemi

Christensen vd. (1985) tarafından bildirilen yöntemle göre, test edilecek *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşlarının, agar’da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml % 0,25 glukoz içeren TSB besiyerine inokule edilerek 25°C’de, *F. psychrophilum* suşları ise 15°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılmış, %1’lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Boya dökülecek, tüpler steril PBS ile iki defa yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) ve (-) olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 3 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

Mikropalak Yöntemi

O’Toole ve Kolter (1998)’in tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye vd., 2008). Kısaca *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşları Triptik Soy Broth (TSB)’da 25°C’de 16 saat, *F. psychrophilum* 15°C, 72 saat üretilmiştir. Kültürlerin tümünden McFarland 0,5’e göre standardize edilen bakteri süspansiyonları düz tabanlı 96 çukurlu mikropalalara 100 µl olarak çukurlara ilave edilerek 25°C’de, *F. psychrophilum* ise 15°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilme ilişkili hücre kalıntıları %1’lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekilde yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için mikropalalara 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Plakların 630 nm’de ELISA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye vd., 2008). Her bakteri için 24 sonucun OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Test sırasında steril TSB negatif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

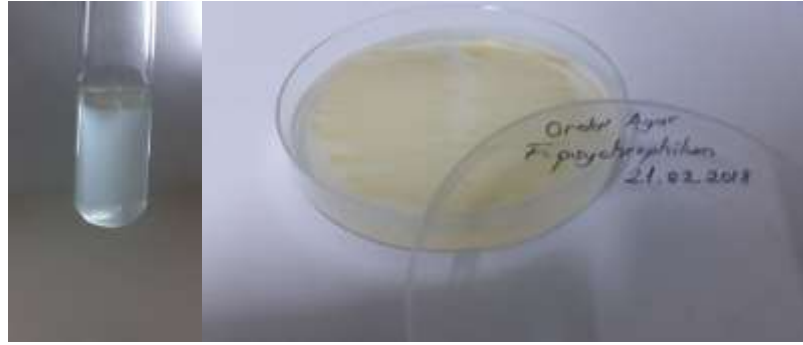
Kongo Red Agar Yöntemi

Freeman vd. (1989) tarafından bildirilen metoda göre hazırlanmıştır. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 50 gr sakkaroz, 37 gr BHI (Brain Heart Infusion) Agar ve 0,8 gr Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Suşlar kongo kırmızılı agara ekim yapıldıktan sonra *F. psychrophilum* 15°C, diğer suşlar 25°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 2 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

BULGULAR

Balık Patojenleri *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum*'un Koloni Morfolojileri

Araştırmada 5 farklı balık patojeni kullanılmıştır. *F. psychrophilum* üretilmesi ve gençleştirilmesinde Ordal Agar (OA) kullanılmıştır. Bakteriler 15°C de 72 saat inkübe edilmiştir ve OA'da sarı turuncu renkte üremişlerdir (Madetoja, 2002; Wiklund, 1994) (Şekil 3). *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* patojenlerinin üretilmesi ve gençleştirilmesinde Triptik Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. Bakteriler 25°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve TSA üzerinde krem renkli koloniler oluşturmuşlardır. *S. warneri* (Şekil 4), *A. sobria* (Şekil 5), *Y. ruckeri* (Şekil 6), *V. anguillarum* (Şekil 7) bakterileri kullanılmıştır. (Bakterilerin koloni rengi önemlidir çünkü kongo red agar testindeki biyofilm tespitinde koloni rengi değişimi sonucu verecektir).



Şekil 3. *F. psychrophilum* OA ve OB'da koloni morfolojisi



Şekil 4. *S. warneri* koloni morfolojisi



Şekil 5. *A. sobria* koloni morfolojisi



Şekil 6. *Y. ruckeri* koloni morfolojisi



Şekil 7. *V. anguillarum* koloni morfolojisi

Biyofilm Testleri Bulguları

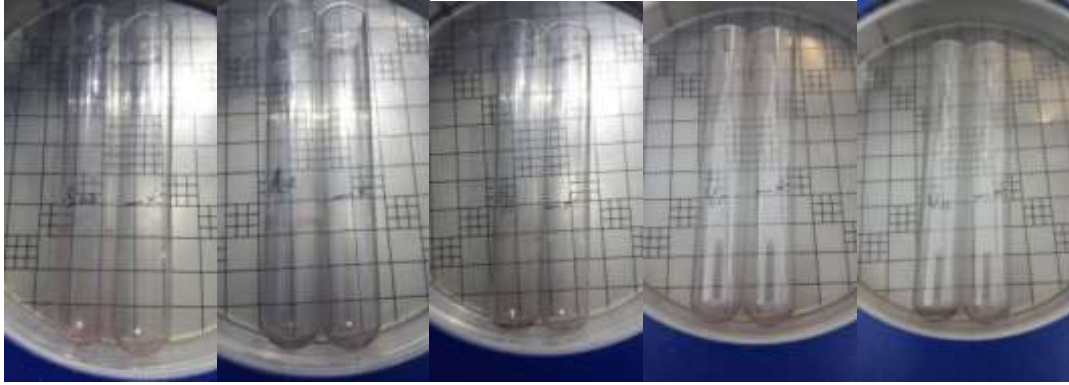
Tüp yöntemi, mikroplak yöntemi ve kongo red agar yöntemi olmak üzere 3 biyofilm tespit yöntemleriyle ilgili patojenlerin biyofilm virülens gücü araştırılmıştır.

Tüp Yöntemi Bulguları

Tüp yönteminde bakteri kültürü dökülerek safraninle boyanan tüplerde besiyerinin bittiği hizada safranin boyasıyla bakteri tutunmasından kaynaklanan biyofilm çizgisi belirlenmiştir. Tüp yönteminde tüpün iç yüzeyinde renkli bu film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) ve (-) olarak değerlendirme yapıldığında biyofilm *S. warneri*'de (+), *A. sobria*'da (++) , *Y. ruckeri*'de (-), *F. psychrophilum*'da (++) , *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir (Şekil 8 ve Şekil 9). Tüp testinde tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* olarak belirlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşumu *F. psychrophilum* ve *A. sobria*'da görülmüştür.



Şekil 8. Tüp yöntemi ile *F. psychrophilum* (++) , *A. sobria* (++) , *S. warneri* (+) suşlarında film tabakası varlığıyla biyofilm oluşumu



Şekil 9. Tüp yönteminde *S. warneri* (+) , *A. sobria* (++) ve *F. psychrophilum* (++) , *Y. ruckeri* (-) , *V. anguillarum* (-) suşlarında biyofilm sonuçları

Mikroplak Yöntemi Bulguları

Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm ELİSA okuyucusunda 630 nm'de ölçüldü ve absorbans değeri negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*'de 0,121, *A. sobria*'da 0,158, *Y. ruckeri*'de 0,071, *F. psychrophilum*'da 0,172, *V. anguillarum*'da 0,212 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışılan tüm bakteriyel balık patojenleri biyofilm oluşturmaktadır (Şekil 10 ve Şekil 11). Mikroplak testinde absorbans değerlerine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*'da bulunmuştur.



Şekil 10. *V. anguillarum*'da biyofilm oluşumu



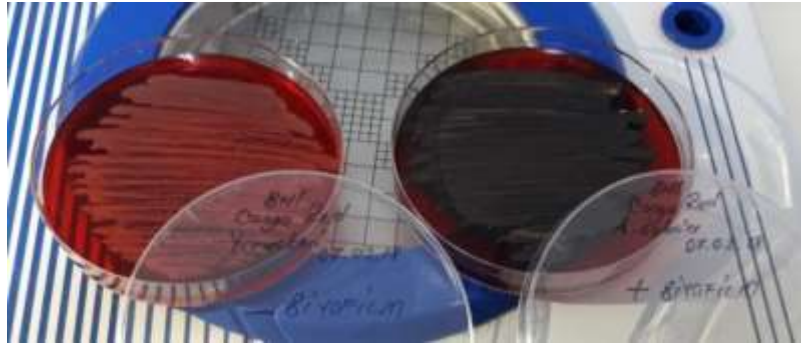
Şekil 11. *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum*'da biyofilm oluşumu

Kongo Red Agar Yöntemi Bulguları

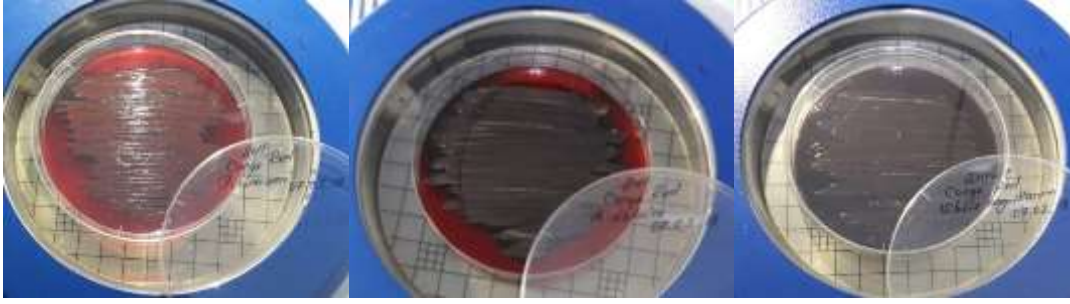
Doğası gereği krem renkte olan bakteriyel balık patojenleri bu biyofilm testiyle krem renkten farklı renge dönüşmektedir (Şekil 12). Kolonin pembe renge dönüşmesi biyofilm oluşturmadığını, siyah renge dönüşmesi biyofilm oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 13). Koloni morfolojisi incelendiğinde koloni rengiyle biyofilm oluşumunun tespit edildiği prensibe dayanan CRA testiyle *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşları kongo red agarda kuru kristalize siyah pigmentli koloni üreterek biyofilm (slime) üretimi pozitif bulunmuştur (Şekil 14). *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum* suşları pembe pigmentli koloni üreterek biyofilm üretimi negatif bulunmuştur (Şekil 15). Kongo red agar testinde biyofilm oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agar testinde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur.



Şekil 12. Bakteri koloni renkleri: doğal krem koloni – biyofilm oluşmamasıyla pembe koloni – biyofilm oluşmasıyla siyah koloni



Şekil 13. CRA testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç



Şekil 14. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan *S. warneri*, *V. anguillarum* ve *A. sobria* suşları



Şekil 15. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmayan *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum* suşları

Tablo 2. Farklı metotlarda uygulanan biyofilm testine göre patojen bakterilerin biyofilm oluşturma güçleri

	<i>F. psychrophilum</i>	<i>A. sobria</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i>
Tüp yöntemi	++	++	+	-	-
Mikroplak yöntemi	++	++	++	+	+++
Kongo red agar yöntemi	-	+++	+++	-	+++

Biyofilm oluşturan bakterilerin en iyi hangi yöntemle biyofilm oluşturdularının belirlenmesi amacıyla çalışılan bakterilerin tüp yöntemi, mikroplak yöntemi ve kongo red agar yöntemleriyle biyofilm oluşturmalarının karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir.

TARİŞMA ve SONUÇ

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir (Szcuka ve Kaznowski, 2014). Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir (Deighton vd., 2001; Arciola vd., 2002; Harraghy vd., 2006). Bu yöntemlerden; tüp testi (Mathur vd., 2006), mikroplak testi (Stepanovic, 2000), radiolabeling mikroskopi (Deighton vd., 2001) ve kongo red agar testi (Arciola vd., 2002) gibi testler biyofilm tayini için kullanılmaktadır. Fakat mikroplak metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır (Stepanovic vd., 2007).

Sundell ve Wiklund (2011) *F. psychrophilum*’un biyofilm oluşturdularını kanıtlamışlardır. *F. psychrophilum* enfeksiyonunda patojen bakterileri barındıran dirençli biyofilmleriyle ve tekrarlayan enfeksiyonlarla daha karmaşık hale gelebildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırma da *F. psychrophilum*’un biyofilm oluşturduğu tüp testinde ve mikroplak testinde kanıtlanmıştır.

Hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmada ve *A. veronii biovar sobria*’da, *A. hydrophila* ve *A. caviae*’ya göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu

gözlemlemişlerdir (Gavin vd., 2003). Çalışmamızda da aynı durum söz konusu olup *A. sobria*'da biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Biyofilm oluşumunun makroskobik saptanmasında kongo red agar yöntemi sıklıkla kullanılan, görsel sonuçlara dayalı bir yöntem olduğunu ifade edilmiştir (Aslan, 2015). Bu yöntemin ilk olarak Freeman vd., (1989) stafilkoklar üzerinde biyofilm üretiminin araştırılmasında kullanıldığını da ifade etmiştir. Araştırmamız da kongo red agar testinde balık patojenlerinin makroskobik incelemelerinde *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının siyah pigment oluşturmalarıyla biyofilm oluşturdıkları bulunmuştur.

Ormancı (2010) yaptığı çalışmada mikroplak yöntemiyle yapılan biyofilm çalışmasında *Aeromonas*'ların tür bazında tutunmalarına baktığında, kuvvetli pozitif değerde en fazla tutunma balığın deri, solungaç ve bağırsağından izole edilen *A. veronii biovar sobria*'da olduğunu bildirmiştir. Biyofilm ölçümü için yaptığı tüp testinde *A. veronii biovar sobria* %61,43 ile yüksek kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunda birinci sırada yer aldığını ifade etmişlerdir. Biyofilm ölçümü için diğer test olan kongo red agar testi ile de tayin etmiş ve sonuçta *A. veronii biovar sobria* izolatlarının %59,37 kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Araştırmamızda da aynı durum görülmüş ve çalışılan patojenler arasında en güçlü sonucu kongo red agarda siyah koloni oluşturarak *A. sobria* vermiştir. Tüp testinde ise *A. sobria*'da (++) yorumuyla güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Jahid vd. (2013) *A. hydrophila*'nın çeşitli glikoz konsantrasyonlarına yanıt olarak biyofilm oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada tüp yönteminde glikoz kullanılmıştır ve *A. sobria*'da biyofilm oluşumu (++) derecesiyle pozitif bulunmuştur.

Musharrafieh vd. (2014) çalışmalarında *V. anguillarum*'un *S. warneri* varlığında veya yokluğunda gökkuşağı alabalığı pulları üzerinde biyofilmler oluşturmasını incelemişlerdir. Sonuçta, *S. warneri*'nin varlığında, *V. anguillarum*'un biyofilm oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *S. warneri* patojenin *V. anguillarum*'un büyümesi ve biyofilm oluşturması için bir katalizör görevi görerek enfeksiyon başarısını artırdığını bildirmişlerdir. *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının biyofilm oluşturmaları bu araştırmada da kanıtlanmıştır.

Nurcan (2010) yaptığı çalışmada, *V. anguillarum*'un mikroplak yönteminde biyofilm oluşturması bu çalışmayı desteklemektedir.

Černohorská ve Votava (2004), *S. warneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturdıklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da *S. warneri*'de aynı durum söz konusu olup biyofilm oluşturduğu görülmüştür.

Yıldız ve Visick (2009) *Vibrio* türlerinden, *cholerae*, *parahaemolyticus*, *vulnificus* ve *fischeri*'deki biyofilm oluşumunu karşılaştırdığında, biyofilm ile koloni morfolojisi arasında bir korelasyon olduğunu belirterek biyofilm üreten hücrelerin koloni yapılarının kıvrımlı ya da akışkan olabileceğini bildirmişlerdir. Biyofilmin matriks kimliğini tespit etmek için kolonideki değişimlere bakıldığını rapor ederek kongo red agar yönteminde koloninin renginin önemini vurgulamıştır. Bu çalışma baz alındığında araştırmamızda da *V. anguillarum* kolonisinin renginin kongo red agar testinde siyah olması bu bakterinin biyofilm oluşturduğunu göstermiştir.

Abdallah vd. (2009) *V. alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus* suşlarının fenotipik slime üretimi kongo red agar testiyle araştırmışlardır. Sadece *V. alginolyticus* ATCC 17749 suşu kongo red agarda slime üreten siyah koloniler geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Yapışmanın ise *V. alginolyticus* suşlarında *V. parahaemolyticus* suşlarına göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da kongo red agarda *V. anguillarum*'un siyah koloni oluşturarak slime ürettiği tespit edilmiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde biyofilmle mücadele de etkin koruma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkin bir olgudur. Bakteriler salgıladıkları AHL molekülleri aracılığıyla iletişim kurarak bakteri-bakteri anlaşmasını sağlamaktadırlar. Bunun neticesinde de enfeksiyon oluşturan virülens faktörlerinin kritik gen ekspresyonlarını gerçekleştirmektedirler. Burada ki en önemli virülens faktörü son zamanlarda fenomen olan biyofilmdir. İletişimin gücüyle mikroorganizma virulent olmakta, klinik biyofilm oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olmaktadır. Biyofilmin temeli olan QS'nin başarısız bir sistem haline getirilmesi bakteri için çok büyük bir kayıp olacaktır. Bu esasa hastalığı daha da güçlü hale getiren zararlı biyofilm gücünün hiç var olmaması su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak önerilebilir.

Biyofilm enfeksiyon sürecinde bakteriye ciddi bir etkinlik kazandırmakta ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bakteriye güç katan ve oldukça tehlikeli olan biyofilmlerin hasta balık

enfeksiyonlarında ilaç direncindeki rolünü araştırmalı ve biyofilm kontaminasyonu ile hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı tespit edilmelidir. Bu nedenle antibiyofilm yaklaşımları dikkat çekmektedir.

Araştırmacılar biyofilmlerin ölçümü için daha güvenilir teknikler ve kontrol stratejilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere daha iyi model sistemleri geliştirdikçe, daha etkili biyofilm kontrol stratejilerinin ortaya çıkması beklenmektedir. Ayrıca, biyofilmlerin antimikrobiyal ilaç direncindeki rolü araştırıldıkça ve biyofilm kontaminasyonu ile hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı daha iyi kuruldukça, biyofilmlerin yetiştiricilik sağlığındaki önemi konusunda daha net bir tablonun ortaya çıkacağına inanılmaktadır. Bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir virülens faktörü olan biyofilmi kongo red agar yöntemiyle saptamanın pratik, güvenilir ve az maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan bazı suşların, neden olduğu vakalarının tedavisinde, antibiyogramla birlikte kongo red agar yönteminin kombine kullanımı, direnç gelişim mekanizmasını engelleyebilecek olan bir adım gibi gözüktüğü bazı araştırmalarda ifade edilmiştir. Örneğin Freeman vd. (1989)'a göre özel bir besiyeri olan kongo red agarda üreyen kolonilerin özelliklerine göre biyofilm yeteneğini belirlemeye çalışan yöntemler bulunmaktadır. Bu durumun balık hastalıkları enfeksiyonları tedavi çalışmalarında da fayda sağlayıp sağlamadığını tespit etmek için yapılacak çalışmalara bu araştırmadaki kongo red agar verileri ilk adım olabilir.

Sonuç olarak *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* bakterilerinde biyofilmin varlığı çalışmamızda açıkça ortaya konmuştur. Bu bakteriyel biyofilm inatçılığının bir sonucu olarak, klinik ilişkili biyofilm oluşumunu önlemek şarttır ve komplike teknolojilere gereksinim olduğu savunulmaktadır. Söz konusu biyofilm hastalıkların alt yapısını ciddi anlamda güçlendirmektedir. Bu çalışma da bakteri dünyasındaki enfeksiyon gücünün azaltılması, bakterinin kimliğinin ve doğasının çok iyi tanınması, bunun bir sonucu olarak bakteriyel güçlerden belki de etkili olan biyofilm virülens gücünün önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Burada esas vurgulanan amaç bakterinin daha biyofilmi oluşturmada önce onu engellemektir. Biyofilm oluşturmamış bakteri enfeksiyon gücü açısından zayıf bakteridir dolayısıyla biyofilmin engellenmesinin balık hastalıklarıyla mücadelede etkin role sahip olduğu ve büyük çıkır açacağı görüşündeyiz.

Teşekkür: Çalışma 5092-YL1-17 No'lu Proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiş olan yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., & Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays ve slime production of *Vibrio alginolyticus* ve *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 394-398.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural ve regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 7, doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., & Montanaro, L. (2002). Detection of Slime Production by Means of an Optimised Congo Red Agar Plate Test Based on a Colourimetric Scale in *Staphylococcus epidermidis*. *Clinical Isolates Genotyped for İca Locus, Biomaterials*, 23, 4233-4239.
- Aslan, H. (2015). *Cveida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal. T.C. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplement Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 136, 1-51.
- Bryers, J.D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnology ve bioengineering*. 100(1), 1-18, PubMed PMID: 18366134.
- Černohorská, L., & Votava M. (2004). Determination of Minimal Regrowth Concentration (MRC) in Clinical Isolates of Various Biofilm-Forming Bacteria. *Folia Microbiologica*, 49 (1), 75-78.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F., & Melton, D.M. vd. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (6), 996-06.
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G. A., Beucher, E., Saiter, J. M., & Jouenne, T. (2002). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell ve material surface properties. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 26 (4), 373-378.

- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.A., & Jouenne, T. (2002). Occurrence ve Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 470-475.
- Çiftçi, Z. (2005). Kronik Tonsillit Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.
- Davies, D. (2003). Understveing biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-22.
- Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewski, E., & Van Nguyen, T. (2001). Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods in Enzymology*, 336, 177-95.
- Delshad, S.T., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., & Bossier, P. (2018). Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *Journal of Fish Diseases*, <https://doi.org/10.1111/jfd.12840>.
- Demir, C., & İnanç, B.B. (2015). Investigate Nasal Colonize *Staphylococcus* Species Biofilm Produced (Nazal Kolonize Stafilokok Türlerinde Biyofilm Üretimini Araştırılması). *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 414-418.
- Donlan, R.M., & Costerton, W.J. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Diseases*, 8(9), 881-890.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., & Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(1), 872-4.
- Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M., Menger, M.D., & Herrmann, M. (2006). Advances in *in vitro* ve *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *The International Journal Artificial Organs*. 29, 368-78.
- Högfors-Rönholm, E., Norrgård, J., & Wiklund, T. (2015). Adhesion of Smoothan Drough Pheno types of *Flavobacterium psychrophilum* to Poly Styrene Surfaces, *Journal of Fish Diseases*, 38(5), 429-437.
- Jahid, I.K., Lee, N.Y., Kim, A., & Ha, S.D. (2013). Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239-247.
- Jurcisek, J.A., & Bakaletz, L.O. (2007). Biofilms formed by nontypeable Haemophilus influenzae *In vivo* contain both double-strveed DNA ve type IV pilin protein. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3868-75.
- Kirov, S.M., Castrisios, A., & Shaw, J.G. (2003). Aeromonas Flegella (Polar ve Lateral) are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. *American Society for Micrbiology*, 72, 1939-45.
- Levipan, H.A., & Avendaño-Herrera, R. (2017). Different phenotypes of mature biofilm in *Flavobacterium psychrophilum* share a potential for virulence that differs from planktonic state. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(76), doi: 10.3389/fcimb.2017.00076.
- Madetoja, J. (2002). *Flavobacterium psychrophilum*: Characterisation, Experimental Transmission and Occurence in Fish and Fish Farming Environments. *Academic Dissertation, Finland*, 1-37.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal Medical Microbiology*, 24, 25-9.
- Molobela, I. P., Cloete, T.E., & Beukes, M. (2010). Protease ve amylaseenzymes for biofilm removal vedegradation of extracellular polymericsubstances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14), 1515-1524.
- Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5,11. Erişim tarihi: 14.10.2018. <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050307>
- Mortensen, B.K. (2014). Problems caused by biofilms. *Bactoforce International A/S*. <http://www.bactoforce.se/wp-content/uploads/2014/09/Problems-caused-by-biofilms.pdf>.
- Nurcan, N. (2010). Bazı Gram-Negatif Bakteriyel Balık Patojenlerinde Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ormancı, S. (2010). Hayvansal ve Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- O'Toole, G.A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., & Ehrlich, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion Otolaryngology and Head Neck Surgery, Review*, 12(3), 185-90.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., & Möllby, R. (2007). The role of c-di-GMP signalling an *Aeromonas veronii biovar sobria* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 273, 172-179.

- Rendueles, O., & Ghigo, J.M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 1-18, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- Richards, J.J., & Melveer, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 10(14), 2287-94.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Ventura, G.B., Djukic, S., Irkovic, I.C. & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions ve practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Apmis ResearchGate*, 115, 891-899.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, 40, 175-9.
- Sundell, K., & Wiklund, T. (2011). Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 34, 373-383 doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01250.x.
- Szczuka, E., & Kaznowski, A. (2014). Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiology (Praha)*, 59, 283-8, <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0296-9>.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., & Dalsgaard, I. (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bulletin European Associate Fish Pathology*, 14, 44-46.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N., & Song, Z.J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., & Yolota, I. (1994). Interaction between human polymorphonuclear leucocytes ve bacteria relased from *In vitro* bacteriol biofilms models. *Journal of Medical Microbiology*, 41, 359-67.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., & Zhang, Y.X. (2008). Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.
- Yildiz, F.H., & Visick, K.L. (2009). Vibrio biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118.

Yersinia ruckeri Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Yönetimindeki Virülens Faktörlerinin Araştırılması

Nurdan FİLİK*, Ayşegül KUBİLAY

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: nurdansal@hotmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 09 Mart 2019; Kabul 11 Temmuz 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Filik, N., & Kubilay, A. (2019). *Yersinia ruckeri* suşlarında çevreyi algılama sistemi ve yönetimindeki virülens faktörlerinin araştırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 391-403. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537802>

Özet

Gram-negatif balık patojenleri çevreyi algılama (QS) yönetimindeki AHL (*N*-Acyl homoserine lactones) molekülleriyle virülens faktörleri üzerinde etkili olarak balıklarda enfeksiyon oluşturur. Araştırmada bakteriyel balık patojeni klinik *Y. ruckeri* (12 suş) kullanılmıştır. Acyl yan zincirinde 4-8 karbona sahip *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) ve Acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 mikrobiyolojik monitör sistemleri (biyosensör suşlarıyla) aracılığıyla araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu kullanılmıştır. Testlerle *Yersinia ruckeri* suşlarının, *C. violaceum* CV026 aracılığıyla BHL molekülünü, *A. tumefaciens* NT1 aracılığıyla OdDHL molekülünü ürettiği tespit edilmiştir. Elastaz spektrofotometreyle, ramnolipid 0,2 g CTAB (Cetiltrimetilamonyumbromid), 5mg/l metilen mavisi ve M9-glutamat minimal medium agarla araştırılmıştır. Hemoliz %5 kanlı agarda, proteaz %2 yağsız süt tozlu agarda, amilaz %2 nişastalı agarda bakterilerin inokülasyonu araştırılmıştır. Sonuçta *Y. ruckeri* ürettikleri sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurmakta ve istedikleri çoğunluğa ulaştıkları anda balık için kritik gen ekspresyonlarını tetikleyerek virülens faktörlerini üretmektedir. Ayrıca busuşlarının azda olsa elastazı ürettiği belirlenirken, ramnolipid, proteaz, amilaz ve hemoliz aktiviteleri gibi virülens faktörlerini üretmediği belirlenmiştir. *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama molekülleri BHL ve OdDHL'yi kullandığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa* insan patojenine özgü virülens faktörleri elastaz ve ramnolipidin *Y. ruckeri*'ye uyarlanarak araştırılmasının sonucunda elastazın bulunması *Y. ruckeri*'nin patojenitesi açısından değerlidir.

Anahtar kelimeler: *Yersinia ruckeri*, çevreyi Algılama Sistemi, AHL molekülleri, virülens faktörleri, elastaz

Investigation of Virulence Factors in Management and Quorum Sensing System in *Yersinia ruckeri* Strains

Abstract

Gram-negative fish pathogens cause infection in fish by detecting quorum sensing managing factors (QS) with AHL (*N*-Acyl homoserine lactones) molecules on virulence factors. Bacterial fish pathogen clinical *Y. ruckeri* (12 strains) were used in this study. Researched production of signaling molecules of *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) own 4-8 carbons in the Acyl side chain and *N*-(3-octododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) own 6-12 carbons in the Acyl side chain, via *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1 are microbiological monitoring systems (upon biosensor strains). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was used as positive control. *Yersinia ruckeri* strains were found to produce BHL molecule via *C. violaceum* CV026 and OdDHL molecule via *A. tumefaciens* NT1 upon testes. Elastase upon spectrophotometer, rhamnolipid 0.2 g CTAB (Cethyltrimethylammonumbromid), 5 mg/l methylene blue and M9-glutamate minimal medium agar were researched. hemolysin %5 blood agar, protease in %2 skimmed milk agar, amylase in %2 starch agar upon inoculation of bacteria were researched. As a result, *Y. Ruckeri* communicates via the signal molecules they produce and when reach the majority want, produce virulence factors by triggering critical gene expression for fish. In addition, it has been determined that these strains produce elastase at least, whereas it does not produce virulence factors such as rhamnolipid, protease, amylase and hemolysis activities. *Y. ruckeri* was determined to use quorum sensing molecules BHL and OdDHL. *P. aeruginosa* human pathogen specific of virulence factors elastase and rhamnolipid adaptation to *Y. ruckeri* as a result of research presence of elastase is valuable in terms of pathogenesis of *Y. ruckeri*.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, quorum Sensing System, AHL molecules, virulence Factors, elastase

GİRİŞ

Enterobacteriaceae familyası üyesi olan *Yersinia ruckeri* Gram-negatif, basil, 1-0,75 µm çapında ve 1,0-3,0 µm uzunluğunda (Tkachenko vd., 2019), sporsuz, kapsülsüz, flagella her zaman mevcut olmadığından değişken motilite gösteren bir bakteridir (Davies ve Frerichs, 1989; Ohtani vd., 2019). *Y. ruckeri* salmonid balıklarda subakut, akut veya kronik septisemi ile seyreden bulaşıcı bir hastalık etkeni olarak ilk kez 1955’de bildirilmiştir. Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) ve Atlantik salmonlarda (*Salmo salar*) yüksek mortaliteye ve önemli ekonomik kayıplara neden olan fırsatçı bir patojen olduğu rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Petrie vd., 1996; Ormsby vd., 2019). Hastalığa, ilk görüldüğü vadinin ismi olan “Hagerman Redmouth” adı verilmişse de 1975’te Amerikan Balıkçılar Birliği’nin Balık Sağlığı Bölümü tarafından hastalığın adı “Enteric Redmouth” (ERM) veya Yersiniozis olarak değiştirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Furones vd., 1993; Austin ve Austin, 1999; Balta vd., 2016). Yersiniozis ağız çevresi, operkulum, yüzgeç tabanları ve anüs etrafında hemorajiler (Fuhrmann, 1983) karaciğer, böbrek, bağırsak, dalak gibi iç organlarda noktasal kanamalarla karakterize olan (Rodgers, 1992) bakteriyel bir enfeksiyondur (Austin vd., 1982; Secades ve Guijarro, 1999; Rigos ve Stevenson, 2001).

Erwin F. Smith (1905)’e göre çok sayıdaki bakteri bir kaç bakteriden daha güçlü olduğu, ancak bu bir kaç bakterinin de birlik olarak engelleri aşabileceği ve enfeksiyon sürecini daha rahat başlatabileceğini bildirmiştir. İşte bu sözlerden yıllar sonra, yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirileri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir (Baskın, 2005; Boşgelmez-Tınaz, 2003). Bakterilerin değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar olduğunu “yalnız yaşayan” ve “yalnız ölen” izole varlıklar olmadıkları araştırmalarla desteklenmektedir (Swift vd., 1994).

Bakteriler birbirlerini anlamak amacıyla Çevreyi Algılama (Quorum Sensing, QS) denilen sistemi kullanırlar. Bakterilerin her bir türü birbirleriyle iletişim kurmak için birden fazla sayıda veya birden fazla çeşitte sinyal molekülü kullanırlar. Bu sinyal molekülleri, bakteriyel popülasyonlara kendi hücre yoğunluklarını algılama imkânı sağlar. Bakterilerin bu şekilde kendi popülasyon yoğunluklarını algılayabilme yeteneklerine “Çevreyi Algılama” denir (Fuqua vd., 1994). Bu sistem sinyal moleküllerinin kullanımı ve algılanmasıyla gerçekleşir. Hatta bu sinyal moleküller ile bakteriler kendi sayılarını bile algılayabilirler. Bakterilerin kullandıkları sinyallerin yapay sinir ağları ile olan benzerlikler göze çarpmaktadır. Bakterilerin bir sinir ağı özelliklerinin birçoğunu barındırdığı bulgusundan hareketle bakteriler için düşük düzeyde bir zekâ yapısı söz konusu olabilir (Hellingwerf, 2005). Çevreyi algılama ile biyofilm oluşumu, beslenme, üreme, spor oluşumu, antibiyotiklere karşı direnç gibi olaylar sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşir (Throup vd., 1994). OS; bu söz konusu sinyal moleküllerinin salınımını gerçekleştiren ve bakteri popülasyonunu koordine eden düzenleyici bir network sistemidir (Sarabhai vd., 2016; Asif vd., 2019). QS sisteminin en etkili özelliği bakterilerin popülasyon yoğunluğunu anlaması ve virülens faktörlerini düzenlemesidir (Watve vd., 2019). Mikrobiyologlar çevreyi algılama ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda mikroorganizmalar arasındaki sinyal molekülleri bozarak laboratuvar ortamında mikroorganizmaların sayılarını kontrol altında tutmayı başarmışlardır (Throup vd., 1994). Bakteriler arasındaki bu sinyal moleküllerini kullanan mikrobiyologlar bakterileri öldürmek yerine aralarındaki bu sinyal moleküllerini durdurmuşlardır (Throup vd., 1994).

Algılanan moleküller ve kullanılan algılama düzeneğine göre üç tip çevreyi algılama mekanizması vardır: Gram-negatif bakterilerde LuxI homologları denilen bazı enzimler türe özgü AHL moleküllerini katalizler. Bu AHL’lar LuxR tipi transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından algılanır. Gram-pozitif bakterilerde ise sinyal iletimi için oligopeptitlere bağlı olarak iki bileşenli fosforlama zinciri kullanılır. Üçüncü ve son mekanizma “Hibrit sistem”dir. *V. harveyi* modelide denir. Burada hem oligopeptidleri görülür hemde LuxI/LuxR tipi proteinler hücre içinde sinyal yolunda görev alır. LuxLM tarafından; AI-1 ve LuxS tarafından AI-2 sinyal molekülleri olmak üzere iki tip sinyal üretilir. AI-1 molekülü tür içi sinyalleşmeyi sağlarken AI-2 (LuxS) türler arası sinyalleşme de görev alır. Türler arası sinyalleşmeye “cross-talk”da denir (Raffa vd., 2005; Sequences, 2008).

Y. ruckeri’de çevreyi algılama sisteminin *C. violaceum* CV026 biyosensör suşuyla varlığı saptanmıştır. *Y. ruckeri*’nin çevreyi algılama sistemi; pUC18 plazmit taşıyıcısı olarak kurgulanmış, gen kütüphanesinden klonlanmış ve *yruR/yrul* olarak adlandırılmıştır (Temprano vd., 2001). *Y.*

ruckeri'nin N-3-oktanoil homoserin lakton (OHL) sinyal molekülünü üretmektedir (Bruhn vd., 2005). Virülens faktörlerinden yüzme hareketliliği ve biyofilm oluşumu çevreyi algılamatarafından düzenlenirken, kazeinaz, fosfolipaz ve hemoliz üretiminin 3-oxo-C8-HSL sinyal molekülünün salınımı sonrası düzenlenmediği görülmüştür (Delshad vd., 2018).

İnsan kaynaklı *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* NT1 ve *Pseudomonas aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi araştırıldığında *C. violaceum* mor pigment violacein özelliğini üretir. Daha önce yazarlar bir violacein-negatif, pigment üretiminin süpernatant ile inkübasyon ile iade edilebildiği *C. violaceum* CV026'nın mini-Tn5 mutant'ı olarak tanımlamışlardır (McClellan vd., 1997). Yine bu bakterinin sinyal molekülü üretmeyen mutanti, diğer bakterilerin açıl homoserin lakton molekülü üretimlerini test etmek için kullanılmaktadır (Sharma vd., 2003). *A. tumefaciens* mutant suşu ortamda AHL molekülü varlığında orijinal rengi olan yeşil pigment bırakır. Ti plazmid üzerinde bulunan *Tra* genleri *LuxI* ve *LuxR* homologu olan *TraI* ve *TraR* proteinleri ve sinyal molekülü olan N-3(okzokitonol)-L-homoserin lakton aracılığıyla aktive edilirler (Boşgelmez-Tınaz, 2003). *P. aeruginosa*'da, AHL sinyal molekülüne dayanan, kendi popülasyon yoğunluklarını algılamalarını sağlayan ve çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılan mekanizmayı kullanırlar (Kleerebezem vd., 1997; Ulusoy, 2007). Bu iletişim sisteminin temeli iki protein molekülüne bağlıdır. Bunlardan birisi *LuxI* ailesine mensup AHL sentez ve diğeri de *LuxR* ailesine ait AHL reseptör proteindir. Hücre yoğunluğundaki artışa paralel olarak AHL sinyal molekülünde de artış gözlemlenir. Hücre yoğunluğunun artmasıyla AHL sinyal molekülü sayısı artar ve sınır değere ulaştığı zaman AHL *LuxR*-tip reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin uyarılmasını veya baskılanmasını sağlar (Kleerebezem vd., 1997). Balık patojeni *Vibrio anguillarum* çevreyi algılama sistemi sinyal molekülünden 3-Oxo-C10-HSL molekülünü salgılayarak regülatör proteinleri *VanI/VanR* sayesinde fenotipik etkilerini gösterir (Ulusoy, 2007). *LuxS*; çevreyi algılama sisteminde proteaz üretimi ve EPS, biyofilm tabakası, flegella/motilite (hareket) gibi fenotipikle ilişkisi olan birçok düzenleme kadar *Vibrio alginolyticus*'un virülensinde de önemli bir rol oynamaktadır (Ye vd., 2008). *Pseudomonas fluorescens* kontrolü çevreyi algılama sisteminde olan 3-Oxo-C10-HSL sinyal molekülünün dışarı bırakılmasından sonra Mupirosini fenotipik etki olarak gösterir (Williams, 2007). *Aeromonas hydrophila*'da *LuxRI* homolog *AhyRI* ve *Aeromonas salmonicida*'da *LuxRI* homolog *AsaRI*'nin varlığıyla AHL molekülünden (N-butanoyl-L-homoserin lakton [BHL]) her iki bakteride de bulunmaktadır. Ayrıca, *A. hydrophila* ve *A. salmonicida*'da serine proteaza üretimi çevreyi algılama için bir kanıttır (Swift vd., 1997).

Bakteriler çevreyi algılama sistemiyle virülens faktörlerini yönetir ve etkinleştirir. Ramnolipid hemolitik etkisi olan hemolizindir, mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur (Salyers ve Whitt, 1994). Proteaz roteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur (Turus, 2011). Nişasta çözünmeyen granüller formunda olup (Polaina ve MacCabe, 2007) mikroorganizmaları şastayı parçalayan enzimler üretmektedir (Yamamoto vd., 2000; Gawande ve Patkar, 2001). Bakteriler sahip kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Sonuç olarak ekzoenzim serin proteaz, ekzotoksin α -hemolizin ve hücre dışı protein olan siderefor gibi virülens faktörleri yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılamasisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonuyla ortaya çıkar (Jangid vd., 2007). *A. hydrophila* ve *Aeromonas salmonicida* N-Açıl homoserin lakton molekülüleri üretirler veya *LuxRI*'in homologlarını içerirler. Bu patojenler *LuxRI*'in homologları olan *AhyRI* ve *AsaRI*'ı exprese ederek BHL ve HHL sinyal molekülünün sentezini düzenlerler. *Vibrio anguillarum*'da *LuxRI* homologu olan *VanI* N-(3-oxo-Dekanoyl)-L-HSL (ODHL) molekülünün sentezini katalizler (Sharma vd., 2003). Çevreyi algılama sistemi proteaz, EPS, biyofilm, motilite *V. alginolyticus*'un virülensinde etkilidir (Ye vd., 2008). *P. fluorescens* çevreyi algılama kontrolündeki 3-Oxo-C10-HSL sinyal molekülünün başka *P. fluorescens*'in algılamasından sonra Mupirosini etki olarak gösterir (Williams, 2007). *A. hydrophila* ve *A. salmonicida* BHL molekülüyle serine proteaz üretir (Swift vd., 1997). Elastaz ve ekzotoksin A gibi, üretimi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörleri bazı suşlarda tanımlanmıştır (Hamood vd., 1996; Rumbaugh vd., 1999; Zhu vd., 2004).

Bu çalışmada *Y. ruckeri* suşlarının patojenitesinin yetkinliği açısından; fenotipik olarak çevreyi algılama sistemini kullanıp kullanmadığı, kullanıyorsa bu sistemin yönettiği ve patojenin hastalık yapma gücünden sorumlu olduğu virülens faktörleri elastaz, ramnolipid, proteaz, amilaz, hemoliz üretiminin tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Y. ruckeri Suşlar ve Gelişme Koşulları

Araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilen, hasta balıkların iç organlarından izole edilmiş ve moleküler düzeyde identifikasyonu yapılmış olan balık patojeni *Y. ruckeri*'nin 12 suşu kullanılmıştır. Suşlar kullanılmaya kadar McFarland 0,5'e göre standardize edilen miktarda -80°C'de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Depolanan suşlar günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan suşlar 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maksimum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır. SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 (1 suş) suşu, LB besiyerinde 30°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve %20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. AHL sinyal moleküllerinin tespiti *C. violaceum* CV026 (1 suş) suşu ve *A. tumefaciens* NT1 (1 suş) suşu kullanılarak yapılmıştır. Bu suşlar %1,2 agar içeren katılaştırılmış ve *A. tumefaciens* NT1 suşu için gentamisin (20 µg/ml); *C. violaceum* suşu için kanamisin (20 µg/ml) LB (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 NaCl) besiyerinde 24 saat süreyle 30°C'de üretilmiştir. Bu stok kültürler farklı testler için kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

Kimyasal maddeler

Çalışmada; gliserol (Acar Chemicals), X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-Dgalaktopiranosid) (Sigma-Aldrich), gentamisin (Oxoid; 10µg), etanol (Sigma-Aldrich), kanamisin (Sigma-Aldrich), lugol solüsyonu (Biorad), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich NIST SRM 2186II), KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich NIST SRM 200B), NaCl (Merck), NH₄Cl (Sigma-Aldrich A9434), MgSO₄.7H₂O (Sigma-Aldrich), CaCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich), glikoz (PubChem), glutamat (SAFC), metilen mavisi (Supelco), cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) (Sigma), tris (Merck), CaCl₂ (Sigma), elastinkongo red (ECR) (Sigma) kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle AHL moleküllerinin tespiti

Ulusoy (2007) tarafından modifiye edilen McClean vd. (1997)'nin metodundan yararlanılmıştır. *Y. ruckeri* Tryptik Soy Agar (TSA)'da 25°C'de 24 saat üretilmiştir. *Y. ruckeri* suşları ve *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu aralarında 3 mm olacak şekilde karşılıklı ekilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda renk değişikliğine bakılmıştır. Mor renk görülmesi BHL'nun varlığını belirtmektedir. OdDHL molekülünün varlığı araştırmak için de aynı prosedür uygulanmıştır. Yeşil renk aranırken pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 suşu için tek fark olarak 20 µg X-Gal ilaveli Luria Bertani Agar (LBA) kullanılmıştır. Sonuçlar pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak tespit için çapraz doğrulama testi yapılmıştır (Mohaddam vd., 2014).

Elastaz testi

Ohman vd. (1980)'nin belirttiği prensiple yapılmıştır. *Y. ruckeri* suşlarına Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır. *Y. ruckeri* suşları 25°C'de 14 saat Luria Bertani Broth (LBB) besiyerinde üretilmiştir. Üretilen kültürlerin süpernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7,5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 25°C'de 3 saat karıştırılarak hareket halinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 12000 devirde 2 dk çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatantlar 96 çukurlu yuvarlak tabanlı plaklara 100 µl olarak çalışılmıştır. Plaklar OD'si 630 nm'de ELİSA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür. Her bakteri için 7 sonucun OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Test sırasında LBB negatif kontrol PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

Ramnolipid üretimi testi

Siegmund ve Wagner (1991)'in prensibine göre yapılmış bir testdir. Ramnolipid üretimi testi; 0,2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l⁻¹ metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petrileri kullanılmıştır. LBB besiyerinde 25°C'de 24 saat *Y. ruckeri* suşları üretilmiştir. Bu suşların bir gecelik kültürlerinden 25'şer µl alınarak M9-glutamat minimal medium agar petrilerinin ortasına damlatılmıştır. Hazırlanan bu petriler 25°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki sarı-saydam zon ramnolipid aktivitesinin varlığını gösterir. Test sırasında LBB negatif PAO1 suşu pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007; Onwosi ve Odibo, 2012).

Proteaz testi

Y. ruckeri suşları Tryptik Soy Broth (TSB) besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. TSA petrilerinin ortasına yaklaşık 3 mm çaplı çukurlar açılmış ve her bir kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren bu çukurların içine 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kolonisi etrafında saydam zon oluşması proteolitik aktivitenin varlığını, zon oluşmaması yokluğunu göstermektedir (Arda, 1997; Swift vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007).

Amilaz testi

Y. ruckeri suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. %2 nişasta ilaveli TSA besiyerine çizgi ekimi yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler üzerine lugol solüsyonu damlatılmış, pozitif reaksiyonların koloni etrafında saydam alan oluşturması beklenmiştir. Negatif durumlarda ise besiyerinin mavi renkte görülmesi beklenmiştir. Koloni etrafında oluşan pembe-esmer bölge şüpheli reaksiyonu ifade etmektedir. Reaksiyon 5 dk içinde okunmuştur (Arda, 1997; Swift vd., 1999). Amilaz testi her suş için üç defa tekrarlanmıştır.

Hemoliz testi

Y. ruckeri suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. %5 koyun kanı içeren TSA petrilerinin ortasına, 25 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların etrafında saydam zon oluşup oluşmamasına göresonuçlar değerlendirilmiştir (Swift vd., 1999). Hemoliz testi her suş için üç defa tekrarlanmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Mikrobiyolojik monitör sistemleri (*C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1), *P. aeruginosa* PAO1, *Y. ruckeri*'nin Koloni Yapıları

Orijinal suşta *C. violaceum* 12472 (Şekil 1) mor renk koloni ve *C. violaceum* CV026 (Şekil 2) mutant suşta ise pigmentsiz koloni oluşumu gözlenmiştir. OdDHL sinyal molekülünün üretimini gösteren *A. tumefaciens* NT1 mutant suşunun koloni yapısı (Şekil 3)'de, pozitif kontrol insan patojenin koloni yapısı *P. aeruginosa* PAO1 (Şekil 4)'de ve *Y. ruckeri*'nin koloni yapısı (Şekil 5) LBA üzerinde verilmiştir.



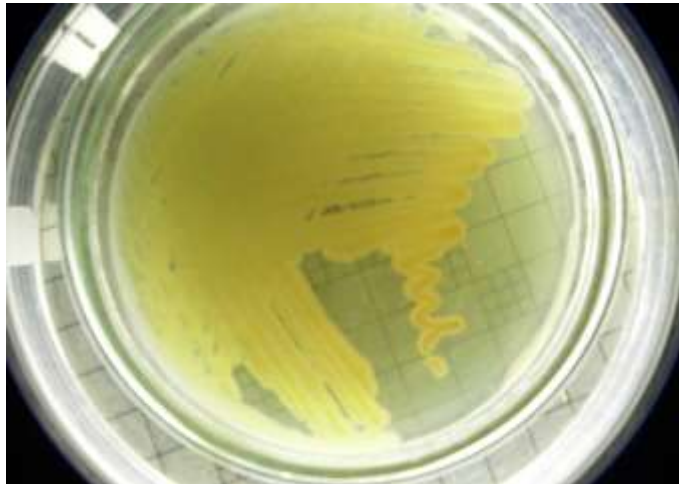
Şekil 1. *C. violaceum* 12472 orijinal suş



Şekil 2. *C. violaceum* CV026 mutant suş



Şekil 3. *A. tumefaciens* NT1 mutant suş

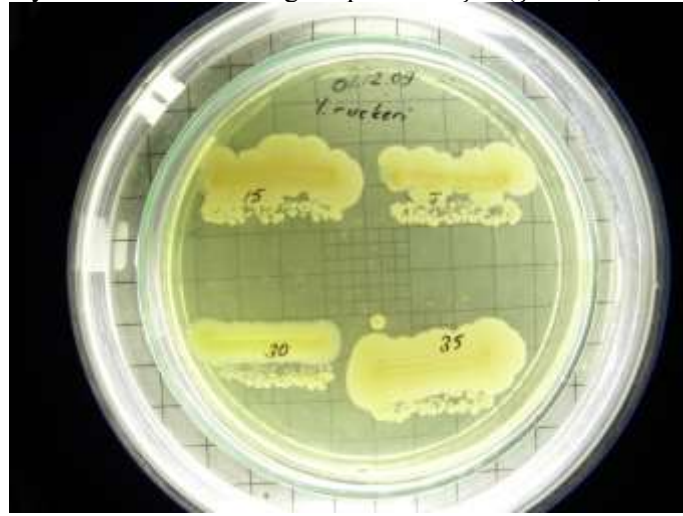
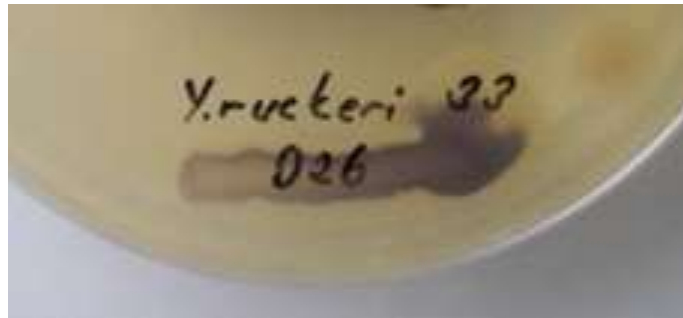


Şekil 4. *P. aeruginosa* PAO1

Şekil 5. *Y. ruckeri*

Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle *Y. ruckeri*'de *N*-acyl Homoserin Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti

Sinyal molükülünün varlığı fenotipik olarak araştırılmıştır. *Y. ruckeri* suşların koloni renk değişimiyle BHL ve OdDHL moleküllerini üretilip üretilmediği takip edilmiştir (Şekil 6). Sonuçta *Y. ruckeri* suşlarının *C. violaceum* CV026 suşu aracılığıyla lakrem renkten mor renge dönüşmesiyle BHL sinyal molükülünü (Şekil 7) ürettiği, *A. tumefaciens* NT1 suşu aracılığıyla dakrem renkten yeşil renge dönüşmesiyle OdDHL sinyal molükülünü ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 8).

Şekil 6. Üreyen *Y. ruckeri* suşların koloni renk değişimiyle BHL ve OdDHL molekülleri üretiminin takibiŞekil 7. *C. violaceum* CV026 aracılığıyla *Y. Ruckeri* suşlarında BHL sinyal molüküllerinin üretimi



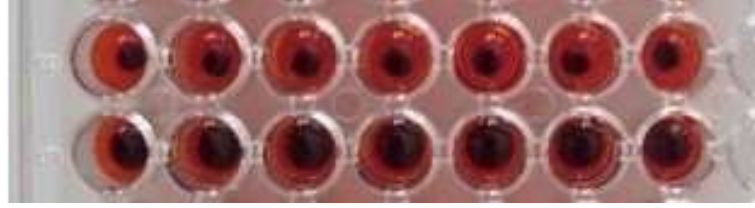
Şekil8. *A. tumefaciens* NT1 aracılığıyla *Y. ruckeri* ve *P. aeruginosa* (+kontrol) suşlarında OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi

BHL ve OdDHL Sinyal Moleküllerine Bağımlı Virülens Faktörlerinin Araştırılması

Deneysel çalışmalarla balık patojeni ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı veya yokluğu bakımından test edilmiştir. Araştırma sırasında kullanılan suşlar ve *Y. ruckeri* suşlarının tamamının testlere verdiği cevaplar gösterilmiştir (Tablo 1).

Y. ruckeri'de Elastaz, Ramnolipid, Proteaz, Amilaz ve Hemoliz Bulguları

P. aeruginosa'nın ürettiği bilinen ve balık patojenine uyarlanan elastaz testinde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında optik yoğunluğuna bakılarak elastaz üretimi azda olsa tespit edilmiştir (Şekil 9). Sonuçlar incelendiğinde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında agar testlerinde ramnolipid, proteaz, amilaz ve hemoliz üretimi tespit edilmemiştir.



Şekil 9. *Y. ruckeri* suşlarında elastaz virülens faktörünün varlığı

Tablo 1. Araştırma sırasında kullanılan suşlar ve *Y. ruckeri* suşlarının tamamının testlere verdiği cevaplar

Suş Adı	Özellik	Çevreyi					
		Algılama Sinyal Molekülü Tipi	Elastaz	Ramnolipid	Proteaz	Amilaz	Hemoliz
<i>P. aeruginosa</i> *	PAO1 PT5 orijinal tip	+ Kontrol					
<i>C. violaceum</i> *	CV026	Biyosensör Suş					
<i>A. tumefaciens</i> *	NT1	Biyosensör Suş					
<i>Y. ruckeri</i>	Yavuzlar	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	15	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	17	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	18/1	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	18/2	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	28	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	29/1	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	30	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	33	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	34	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	35	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	36	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-

*Suşlar pozitif kontrol ve biyosensör suş olarak kullanılmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakteriler istedikleri çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda virülens faktörleriyle konak üzerindeki etkisini gösterirler (Watve vd., 2019). En ilkel canlılardan biri olarak bilinen bakterilerin sistemleşmiş milyarlarca hücreden oluşan balıkların dokularında hastalık oluşturarak yetiştiricilik

ünitelerinde nasıl büyük ölçüde kayıplara sebep olduğu sorusunun cevaplarından birisi, çevreyi algılamadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık kayıplarının azaltılması için kullanılan profilaktif yöntemlere ek olarak alternatif yeni metotlara gereksinim vardır. Çevreyi algılama sistemini durdurma bunlardan bir tanesidir (Defoirdt vd., 2004).

Temprano vd. (2001) tarafından beyaz mutant *C. violaceum* CV026 ile karşılıklı çapraz olarak inoküle edilen *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemine sahip olduğu saptanmıştır. Beyaz mutant *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu kullanılarak yapılan bu çalışmada da çapraz ekimde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında çevreyi algılama sinyal molekülleri bulunmuştur.

Kastbjerg vd. (2007)'e göre *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C8-HSL), *N*-(3-oxoheptanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C7-HSL) ve *N*-(3-oxononanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C9-HSL) üretmiştir. Benzer şekilde Temperano vd. (2001)'e göre *Y. ruckeri*'de sinyal molekülleri vardır. Söz konusu araştırmamız da *Y. ruckeri* suşlarının tamamının mor renkli koloni oluşturmasıyla BHL ve yeşil renkli koloni oluşturmasıyla OdDHL sinyal moleküllerini ürettiği ispatlanmıştır.

Y. ruckeri'nin ekstraselüler ürünlerinin (ECP), lipazlar, proteazlar ve hemolizinler de dâhil olmak üzere, balıklara enjekte edildiğinde, ağızda ve bağırsaktaki kanamalar gibi bazı karakteristik ERM (Enteric redmouth) bulguları üretirler. Bu nedenle, bu ECP'lerin *Y. ruckeri* enfeksiyonunun patogenezinde rol oynadığı görülmektedir (Toback, 2009).

Ulusoy (2007) araştırmasında *P. aeruginosa* PAO1 suşunda elastazın olduğunu bulmuştur. Ulusoy (2007)'dan modifiye edilerek balık patojenine uyarlanan teste *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü virülens faktörü olan elastaz aktivitesine *Y. ruckeri* suşlarının tamamında rastlanmıştır.

Kumar vd. (2015)'ne göre *Y. ruckeri*'nin birçok virülans mekanizması tanımlanmıştır. Bazı hücre dışı ürünlerin (ECP), konakçılara tekrar enjekte edildiklerinde hastalığın hemorajik formu ile ilişkili klinik bulguları çoğalttığı gösterilmiştir. Bu ECP'nin virülensi tetiklediği bilinmektedir. Azokazin proteaz, sitolitik ve hemolitik aktiviteleri düzenleyen hemolizin *Yh1A* ile geniş bir hedefe sahip olan ve özellikle fibronektin, aktin ve miyozin parçalanmasında etkili olan 47 kDa metalloproteaz *Yrpl* buna örnektir. Ancak araştırmamızda ECP üzerinde bu denli etkili olan proteaz, hemoliz ve amilaz sonuçları çalışılan tüm suşlarda negatiftir.

Ulusoy (2007) araştırmasında *P. aeruginosa* PAO1 suşunda ramnolipidin olduğunu bulmuştur. Ulusoy (2007)'dan modifiye edilerek balık patojenine uyarlanan teste *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü virülens faktörü olan ramnolipid aktivitesine *Y. ruckeri* suşlarının tamamında rastlanmamış ve sonuçlar araştırmacıdan farklılık göstermiştir.

Ulusoy (2007) tarafından çevreyi algılama sisteminde rol alan BHL sinyal molekülü aracılığıyla balık patojenleri *A. hydrophila*'nın AhyI/AhyR regülatör proteinleriyle ekzoproteaz üretimini gerçekleştirdiği, *A. salmonicida*'nın ise AsaI/AsaR regülatör proteinleriyle hücre dışı proteaz üretimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Fakat çalışılan *Y. ruckeri* suşlarının tamamında proteaz negatif belirlenmiştir.

Romalde ve Toranzo (1993)'a göre patolojik bir aktivite olan amilaz *Y. ruckeri* suşlarının tamamında pozitifken bu araştırmada negatiftir.

Fernández vd. (2007)'e göre *Y. ruckeri*'nin patojenitesinde *Yh1A* olarak adlandırılan hemolizin/sitolizin'in önemli bir rol oynadığını ve hemolizin *Yh1A*, eritrositlerin yanı sıra kültür balığının doku hücrelerini de eritebilmişlerdir. Aynı zamanda *Yh1A*'nın üretimi için iki genin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak çalışılan *Y. ruckeri*'nin suşlarının tamamında hemoliz aktivitesi görülmemiştir.

Patojenitenin oluşumunda, bakteriyel çevreyi algılama karmaşık olduğu için (Boyen vd., 2009), bakteriyel patojenler tarafından üretilen sinyal molekülleri, enfeksiyonların teşhis ve tedaviedilmelerinde yol göstericilerdir (Kumari vd., 2008; Boyen vd., 2009). Spor oluşturma, konjugasyon, biyoluminesans, biyofilm oluşturma, antibiyotik üretimi ve bakteriyosin üretimi gibi türe özgü pek çok davranış çevreyi algılama mekanizması ile kontrol edilmektedir. Çevreyi algılamanın anlaşılması ile yeni dönem probiyotikler olarak tanımlanan metabiyotiklerin tasarlanmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir (Boyen vd., 2009).

İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkin bir olgudur. İletişimin gücüyle mikroorganizma virulent olmakta, hastalık oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olabilmektedir. Elde edilen veriler ışığında bakteri hücreleri arasındaki iletişimin engellenmesiyle (Quorum Quenching, QQ) antibakteriyel etki elde etme çalışmaları gelecek için umut vaadeden bir alan olarak görülmektedir. Bu esasa çevreyi algılamanın durdurulmasıyla enfeksiyon gücünün azaltılması su

ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunma arayışlarında alternatif bir metottur. Aynı zamanda quorum quenching modasıyla çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespit edilmesi, bu moleküllerin oluşumunun inhibitörler, mimikler, enzimler aracılığıyla durdurulması hastalıkta erken teşhis kavramını gündeme getirmekte ve bu durumunda balık hastalıkları profilaksisinde önemli olması hedeflenmektedir.

Y. ruckeri suşlarının tamamının çevreyi algılama sistemini kullandığı ve bu sistemin yönetimindeki virülens faktörlerinden elastazı ürettiği bulunmuştur. Araştırmada BHL ve OdDHL sinyal molekülleri aracılığıyla *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemini kullandığının ispatıyla insan patojenine özgü elastaz ve ramnolipid gibi patolojik etkenlerden elastaza *Y. ruckeri*'de rastlanmasının araştırmaya orijinallik kattığını düşünmekteyiz. Bu araştırma makalesinin *Y. ruckeri*'de çevreyi algılama tespitiyle bir sonraki adım olarak bu patojenle ilgili quorum quenching çalışmalarına ve *In vivo* çalışmalara yön göstereceği kanaatindeyiz.

Teşekkür: Çalışma, 1973-YL-09 No'lu Proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiş olan yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Arda, M.(1997). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No:25, 490s, Ankara.
- Asif, A., Iftikhar, A., Hamood, A., Colmer-Hamood, J.A., & Qaisar, U. (2019). Isonitrile-functionalized tyrosine modulates swarming motility and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 288-295.
- Austin, B., & Austin, D.A. (1999). Bacterial fish pathogens. Diseases in famed and wild fish. 3rd (Revised), Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 457.
- Austin, B., & Austin, D.A. (1987). Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish. First Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 364.
- Austin, B., Green, M., & Rodgers, J.C. (1982). Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 27, 73-78.
- Balta, F., Balta, Z.D., Özgümüş, O.B., & Çağırman, H. (2016). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin Portörlük Yönünden Tetkiki ve Antimikrobiyal Direncin Tespiti. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences (Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi)*, 1(3), 72-76.
- Baskın, H. (2005). Mikroorganizmanın Çevreye Uyumu ve Biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 9-10.
- Boşgelmez-Tınaz, G.(2003). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turkish Journal of Biology*, 27, 85-93.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F.(2009). Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, 135, 187-195.
- Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen J.L., & Gram L. (2005). Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65, 43-52.
- Davies, R.L., & Frerichs, G.N. (1989). Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases*, 12, 357-365.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., & Verstraete, W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240, 69-88.
- Delshad, S.T., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., & Bossier, P. (2018). Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *Journal of Fish Diseases*, 41(9), 1429-1438. doi: 10.1111/jfd.12840.
- Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Journal of Infection* 46, 207-214.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P., & Zhang, L. (2005). The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 56, 1287-1301.

- Farrand, S.K. (1998). Conjugation in Rhizobiaceae. In: The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), 199-233. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Fernández L., Prieto M., & Guijarro J.A. (2007). The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology*, 153, 483-489.
- Frerichs, G.N. (1993). Isolation and identification of fish bacterial pathogens. In: Bacterial Diseases of Fish (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), 270–272. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Fugua, W.C., Winans, S.C., & Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269-275.
- Fuhrmann, H., Böhm, H.K., & Schlotfeldt, J.H. (1983). An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases*, 6, 309-311.
- Furones, M.D. Rodgers, C.J., & Munn, C.B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 105-125.
- Gawande, B.N., & Patkar, A.Y. (2001). Purification and properties of a novel raw starch-degrading cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 735-743.
- Hamood, A.N., Griswold, J., & Colmer, J. (1996). Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 64, 3154-3160.
- Hellingwerf, K.J. (2005). Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends in Microbiology*, 13(4), 152-158.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M.S., & Shouche, Y.S. (2007). *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. *BMC Microbiology*, 7, 93, 1-11.
- Kastbjerg, V.G., Nielsen, K.F., Dalsgaard I., Rasch M., Bruhn J.B., Givskov M. & Gram L. (2007). Profiling acylated homoserine lactones in *Yersinia ruckeri* and influence of exogenous acyl homoserine lactones and known quorum-sensing inhibitors on protease production. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 363-74.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., & de Vos, V.M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24, 895-904.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46, 103, doi: 10.1186/s13567-015-0238-4.
- Kumari, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2008). Detection of bacterial quorum sensing *N*-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1619-1627.
- McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of *N*-acyl homoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703-3711.
- Moghaddam, M.M., Khodi, S., & Mirhosseini, A. (2014) Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology*, 3(4), 1-10.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J., & Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 142, 836-842.
- Ohtani, M., Villumsen, K.R., Strøm, H.K., Lauritsen, A.H., Aalbæk, B., Dalsgaard, I., Nowak, B., Raida, M.K., & Bojesen, A.M. (2019). Effects of fish size and route of infection on virulence of a Danish *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 strain in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 503, 519-526, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.041.
- Onwosi, C.O., & Odibo, F.J.C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 937-942, doi: 10.1007/s11274-011-0891-3.
- Ormsby, M.J., Grahame, E., Burchmore, R., & Davies, R.L. (2019). Comparative bioinformatic and proteomic approaches to evaluate the outer membrane proteome of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Journal of Proteomics*, 199, 135-147, doi: 10.1016/j.jprot.2019.02.014
- Petrie, J., Bronu D.W., & Hastings, T.S. (1996). Isolation of *Yersinia ruckeri* from wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. *Journal of Fish Diseases*, 14, 137-140.
- Polaina, J., & MacCabe, A.P. (2007). Industrial Enzymes: Structure. Function and Applications, Springer, The Netherlands.
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., & Young, J.M. (2005). Bacterial Communication (“Quorum Sensing”) via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-423.

- Rigos, G., & Stevenson, R. (2001). The effect of antibiotic treatment on the establishment of persistent infection with *Yersinia ruckeri* serovar II in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 9, 247-253.
- Rodgers, J.C. (1992). Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemological studies. *Journal of Fish Diseases*, 15, 243-254.
- Romalde, J.L., & Toranzo, A.E. (1993) Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the Enteric Redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiology Letters, Federation of European Microbiological Societies*, 112, 291-300.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., & Hamood, A.N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *P. aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and Immunity*, 67, 5854-5862.
- Sarabhai, S., Kaur, A., Capalash, N., & Sharma, P. (2016). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism and regulation of virulence. In *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology* (pp. 231-256).
- Salyers, A.A., & Whitt, D.D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 1st ed. Washington, D.C: ASM Press, 260-268, USA.
- Secades, P., & Gujarro, J.A. (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3969-3975.
- Sequences, (2008). Bakteri hücreleri arasında haberleşme (Cell-to-cell communication: quorum sensing). <http://www.genotyping.wordpress.com> <http://genotyping.wordpress.com/2008/05/12/bakteri-hucreleri-arasindahaberlesme-cell-to-cell-communication-quorum-sensing/>. Erişim Tarihi: 28.03.2010.
- Sharma, A., Sahgal, M., & Johri, B.N. (2003). Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing. *Current Science*, 85(8), 1164-1172.
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *BioTechniques*, 5, 265-268.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B., & Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5192-5199.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., & Stewart, G.S.A.B. (1997). Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI Homologs AhyRI and AsaRI and Their Cognate N-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5271-5281.
- Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P., & Stewart, G.S. (1994). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Science*, 21, 214-219.
- Temprano, A., Yugueros, J., Hernanz, C., Sánchez, M., Berzal, B., Luengo, J.M., & Naharro, G. (2001). Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yrul-yrulR* quorum sensing. *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 253-261.
- Tkachenko, H., Buyun, L., Terech-Majewska, E., Honcharenko, V., Prokopiv, A., & Osadowski, Z. (2019). Preliminary in vitro screening of the antibacterial activity of leaf extracts from various *Ficus* species (Moraceae) against *Yersinia ruckeri* *Fisheries & Aquatic Life*, 27, 15-26, Archives of Polish Fisheries, doi:10.2478/aopf-2019-0002.
- Tobback, E. (2009). Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor in Veterinary Sciences (PhD), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.
- Turus, N. (2011). Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 92s.
- Ulusoy, S. (2007). Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretimini Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, Isparta.
- Watve, S., Barrasso, K., Jung, S. A., Davis, K. J., Hawver, L. A., ... & Perez, L. J. (2019). Ethanolamine regulates CqsR quorum-sensing signaling in *Vibrio cholerae*. *bioRxiv*, 589390. Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153, 3923-3938.
- Yamamoto, K., Zhang, Z.Z., & Kobayashi, S. (2000). Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 962-966.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., & Zhang, Y.X. (2008). Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.

Zhu, H., Bandara, R., Conibear, T.C.R., Thuruthyil, S.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Givskov, M., & Willcox, M.D.P.(2004). *P. aeruginosa* with LasI quorum sensing deficiency during corneal infection. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45,1897-1903.

Effects of Different Feeding Frequencies on Growth Performance and Feed Consumption in Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)

Adem KURTOĞLU¹, Hüseyin SEVGİLİ², Masahiro OIAKAWA¹

¹Mediterranean Fisheries Research Production and Training Institute, Beymelek Unit, Demre, Antalya, Turkey.

²Mediterranean Fisheries Research Production and Training Institute, Kepez Unit, Döşemealtı, Antalya, Turkey.

Corresponding Author: husevgili@yahoo.com

Research Article

Received 14 March 2019; Accepted 09 August 2019; Release date 15 September 2019.

How to Cite: Kurtoglu, A., Sevgili, H., & Oiakawa, M. (2019). Effects of different feeding frequencies on growth performance and feed consumption in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758). *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 404-410. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.540268>

Abstract

This experiment aimed to determine the effects of feeding frequencies on growth, feed intake and feed conversion efficiency in turbot, (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758). Six treatments consisted of feeding twice a day for 6 and 7 days a week (6:1₍₂₎ and 7:0₍₂₎ respectively), feeding twice a day and then one or two days starvation (1:1₍₂₎ and 1:2₍₂₎ respectively), two days feeding and one day starvation (2:1₍₂₎) and feeding once a day for six days a week (6:1₍₁₎). Initial average weight of fish was 110.3±0.5 g. They were fed until apparent satiation in each meal regardless of the treatments for 6 weeks. Each treatment was tried in triplicate tanks. At the end of the experiment, fish particularly those on 7:0₍₂₎ and 6:1₍₂₎ performed significantly better than those on 1:2₍₂₎ ($p<0.05$) in terms of daily growth coefficient. The differences in growth rate actually were a reflection, at large extend, of amount of food consumed. Briefly fish fed more frequently consumed more feed and individuals on 7:0₍₂₎, 6:1₍₂₎ and 2:1₍₂₎ had significantly higher feed intake than those on 1:2₍₂₎. On the other hand, feed intake per feeding day or per meal were inversely related with feeding days ($n=18$, $r^2=0.89$) and number of meals ($n=18$, $r^2=0.87$). Feed conversion efficiency was not affected by the treatments. A quadratic broken line model estimated minimum number of daily meal for maximum growth as 1.756, equal to twice a day feeding for 6 days a week.

Keywords: Turbot, feeding frequency, meal size, feed consumption.

Farklı Yemleme Sıklıklarının Yavru Kalkan (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)'da Büyüme Performansı ve Yem Tüketimine Etkileri

Özet

Bu araştırma farklı yemleme sıklıklarının yavru kalkan (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758)'da büyüme, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranına etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Altı muamele, haftada 6 veya 7 gün ikişer öğün (sırasıyla 6:1₍₂₎ ve 7:0₍₂₎), bir gün ikişer öğün yemleme ve ardından bir veya iki gün aç bırakma (sırasıyla 1:1₍₂₎ ve 1:2₍₂₎), iki gün çift öğün yemleme bir gün aç bırakma (2:1₍₂₎) ve haftada altı gün tek öğün (6:1₍₁₎) şeklinde olmuştur. Başlangıç ağırlığı 110.3±0,5 g olan balıklar her öğünde doyuncaya kadar yemlenmiştir. Her bir muamele üç tekerrürlü olarak test edilmiştir. Deneme sonunda 7:0₍₂₎ ve 6:1₍₂₎ muamelelerindeki balıklar 1:2₍₂₎'dekilerden önemli derecede daha yüksek büyüme oranı göstermiştir ($p<0,05$). Büyüme hızında gözlenen bu farklılıklar, tüketilen yem miktarının bir yansıması sonucu olmuştur. Daha sık beslenen balıklar toplamda daha fazla yem tüketmişler ve 7:0₍₂₎, 6:1₍₂₎ ve 2:1₍₂₎'deki bireyler 1:2₍₂₎'dekilere göre önemli derecede daha fazla tüketmişlerdir ($p<0,05$). Buna zıt olarak, günlük yem tüketimi veya öğün başına yem tüketimi yemleme günü ile zıt bir ilişki göstermiştir (sırasıyla, $n=18$, $r^2=0,89$ ve $n=18$, $r^2=0,87$). Yemden yararlanma etkinliği muamelelerden etkilenmemiştir. Maksimum büyüme için gerekli minimum öğün sayısı kuadratik kırık modeli ile 1,756 olarak tahmin edilmiş ve bu da aşağı yukarı hafta 6 gün çift öğünlü uygulamaya eşit bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Kalkan, yemleme sıklığı, öğün büyüklüğü, yem tüketimi.

INTRODUCTION

Optimization of feeding levels and frequencies in aquaculture farms is of great importance in terms of meeting nutritional requirements of fish, farm management, environmental impacts, labor and feeding associated costs. Feed can be delivered at either *ad libitum* or satiation level or a restricted level close to satiation point during varying stages of fish (Lovell, 2003; NRC, 2011). However daily feeding frequencies change depending on several factors including fish species, size, water temperature, diet nutrient concentrations, farm management and fish health.

A previous study in whitefish (*Coregonus lavaretus*) showed that fish showed an increase in stomach capacity when meal frequency was reduced (Känkänen and Pirhonen, 2009). A similar adaptive mechanism in the gastric organs in response to restricted feeding schedules were also reported for flatfishes including turbot (Flowerdew and Grove, 1979; Jobling 1982). Anatomically, turbot has large mouth, therefore they can feed on macrofauna at a quite earlier life stage in the nature compared with other flatfish such as flounder, *Platichthys flesus* (Aarnio et al., 1996). They have also large esophagus and stomach allowing to ingest large preys (Aarnio et al., 1996). Reflection of these features to aquaculture conditions is that turbot can be fed less frequently and hence a substantial feeding related costs can be saved. Former studies in turbot weighing between 10 and 130 g showed that feeding two times a day was better than either one and three times a day or every other day and every two-day (Burel et al., 2000; Türker, 2006). Similarly, juvenile turbot with about 60 g weight showed best growth performance when fed twice a day 7 days a week, but when the number of feeding days reduced down to 4 days a week, the performance was inversely affected (Blanquet and Oliva-Teles, 2010). On the other hand, Aydın et al. (2011) reported that once a day feeding can be sufficient to sustain good growth in turbot with initial weights of 24 and 39 g both a satiation and restricted feeding conditions respectively. Apparently, optimum feeding frequency in growing turbot is still controversial. Therefore, the present study was planned to determine the effects of various feeding days, feeding frequency and starvation on growth and feed utilization in turbot.

MATERIAL and METHODS

Experimental design

The experiment was carried out at the Beymelek Unit of Mediterranean Fisheries Research Production and Training Institute, Antalya, Turkey. Juvenile turbot were selected from a 30 m³ rearing tank with water about 30 m³. Forty fish were randomly allocated to each of 18 tanks (1.1×1.1×0.5 m) and acclimated for two weeks prior to commencement of the study. During the adaptation period, fish were fed a commercial diet (Çamlı Yem, İzmir, Turkey) with 50% protein and 16% lipid. The initial average weight was 110.3±0.5 g (n=18). Brackish water was supplied to each tank at a flow rate of 5.4 L/min. Supplemental air from an air-blower was provided to each tank. Experimental system was an indoor system allowing natural light to enter. Fish were subjected to natural photoperiod between 10.5-11 h light and 13-13.5 h dark over the study period. A commercial diet (6 mm pellet diameter) containing 55 % protein and 12 % lipid was offered to fish at an apparent satiation in each meal. Water parameters such as temperature, dissolved oxygen, pH and salinity were daily monitored from selected four tanks with a hand DO meter and pH meter (YSI Model 55 and 63, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) respectively. Average temperature, dissolved oxygen, pH and salinity values were 17.63±0.05 °C, 5.66±0.10 mg/L, 7.32±0.02 and 7.20±0.02 ppt, respectively. During the study, fish were collectively weighed at the beginning and final after about one-day starvation period.

Six experimental treatments were tried in triplicate groups of fish. An explanatory overview of the treatments is given in Table 1.

Table 1. Feeding programs used in the experiment

Treatment no	Abbreviation	Explanation
1	7:0 ₍₂₎	Everyday feeding : no starvation (twice a day)
2	6:1 ₍₁₎	6 days feeding : one day starvation (once a day)
3	6:1 ₍₂₎	6 days feeding : one day starvation (twice a day)
4	1:1 ₍₂₎	1 day feeding : one day starvation (twice a day)
5	1:2 ₍₂₎	1 day feeding : two days starvation (twice a day)
6	2:1 ₍₂₎	2 days feeding : one day starvation (twice a day)

Calculations

Voluntary Feed Intake (VFI g/kg MBW / day, feeding day (WFI_{fd}) or meal (VFI_m)) = (dry matter intake / MBW^{0.8}) / day (Van der Meer et al., 1997)

Metabolic Body Weight (MBW^{0.8}) = (Geometric mean of initial weight (IW) and final weight (FW))^{0.8} (Saravanan et al., 2012)

Feed Conversion Efficiency (FCE) = weight gain / dry matter intake (Van der Meer et al., 1997)

Daily Growth Coefficient (DGC) = [(FW^{1/3}-IW^{1/3}) /day] × 100 (Saravanan et al., 2012)

Statistical analysis

Normality and homogeneity of the data were checked by Shapiro-Wilk W Test (Shapiro and Wilk, 1965) and Bartlett's test (Bartlett, 1937), respectively. One-way analysis of variance (ANOVA) and then Tukey post hoc test were used to detect the significant differences between the treatments. A significance level of P<0.05 was used unless otherwise stated. Relationships between VFI and DGC, number of feeding day or meal and WFI_{fd} or WFI_m were checked by a linear regression. A Statistical package JMP v.8.0 for Windows was used for all statistical analyses. Relationship between number of daily meals and DGC was also checked using nonlinear models (broken line and quadratic broken line models) to estimate minimum meal number requirements of turbot weighing 100 and 175 g. The models were run in Graphpad Prism for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The optimum daily meal number were defined based on the model fitting best in terms of the residual sum of squares.

RESULTS and DISCUSSION

In the present study, we changed feeding frequencies at a satiation level by mainly altering feeding days except 6:1₍₁₎ where only single feeding a day was made. This design resulted in 14-41 feeding days and 28-82 meals over the study period (Table 2). Fish fed varying feeding regimens had significantly different growth rates; i.e. particularly those on 7:0₍₂₎ and 6:1₍₂₎ performed significantly better than those on 1:2₍₂₎ (p<0.05) in terms of DGC. The differences in growth rate actually were a reflection, at large extend, of amount of food consumed (Table 2 and Figure 1). Fish fed more frequently consumed more feed and individuals on 7:0₍₂₎, 6:1₍₂₎ and 2:1₍₂₎ had significantly higher VFI than those on 1:2₍₂₎. This is consistent with previous observations in turbot by Blanquet and Oliva-Teles (2010) and Türker (2006). In the present experiment, maximum daily feeding frequency was set at 2 times. We did not exceed this level since Burel et al. (2000) observed that delivering feed twice or thrice a day did not significantly change feed intake of turbot.

Table 2. Growth, feed utilization and feed intake of turbot fed varying frequencies over 6 weeks

	7:0 ₍₂₎	6:1 ₍₁₎	6:1 ₍₂₎	1:1 ₍₂₎	1:2 ₍₂₎	2:1 ₍₂₎
Number of Feeding Days	41	36	36	21	14	28
Total Number of Meals	82	36	72	42	28	56
IW	109.9±0.3	109.9±0.4	109.9±0.3	109.8±0.0	109.8±0.2	112.4±2.7
FW	172.7±1.2 ^{ab}	170.5±3.4 ^{ab}	175.0±5.9 ^a	158.7±3.2 ^{ab}	154.0±4.6 ^b	174.5±5.3 ^a
DGC	1.81±0.02 ^a	1.75±0.08 ^{ab}	1.86±0.15 ^a	1.46±0.08 ^{ab}	1.33±0.13 ^b	1.77±0.07 ^{ab}
Feed intake (g/fish)	49.67±1.13 ^{ab}	45.27±1.27 ^{ab}	51.37±5.07 ^a	39.73±3.34 ^{ab}	33.73±1.19 ^b	48.90±2.54 ^a
VFI (g/kg MBW/day)	5.91±0.13 ^a	5.42±0.20 ^{ab}	6.07±0.52 ^a	4.89±0.37 ^{ab}	4.21±0.16 ^b	5.74±0.20 ^a
VFI (g/kg MBW/meal)	2.96±0.06 ^d	6.17±0.23 ^a	3.46±0.30 ^{cd}	4.77±0.36 ^{bc}	6.16±0.24 ^a	4.20±0.14 ^{bc}
VFI (g/kg MBW/feeding day)	5.91±0.13 ^d	6.17±0.23 ^d	6.92±0.59 ^{cd}	9.55±0.73 ^b	12.33±0.48 ^a	8.41±0.29 ^{bc}
FCE	1.27±0.03	1.35±0.11	1.27±0.04	1.26±0.02	1.29±0.13	1.25±0.04

For treatment codes, please see Table 1.

Data are given as means ± standard error of mean. Values at the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

IW: Initial weight, FW: Final weight, DGC: Daily growth coefficient, VFI: Voluntary feed intake, MBW: Metabolic body weight, FCE: Feed conversion efficiency

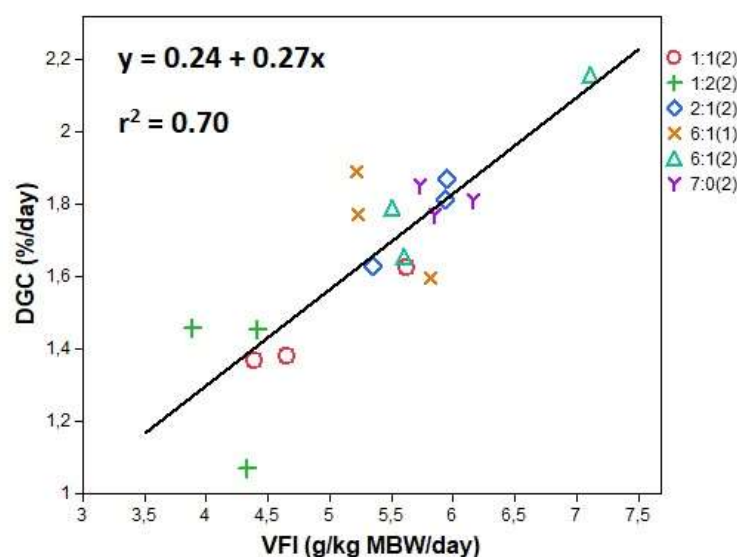


Figure 1. Relationship between VFI (voluntary feed intake) and DGC (daily growth coefficient) in turbot fed different feeding frequencies. $DGC (\%/day) = 0,24 + 0,27 * VFI (g/kg MBW/day)$. MBW: Metabolic body weight

When VFI is calculated based on number of feeding days over the study period, the highest consumption was observed in fish on 1:2₍₂₎, followed by those on 1:1₍₂₎. More or less a similar trend was observed in WFI_m where fish on 6:1₍₁₎ and 1:2₍₂₎ had significantly higher VFI than the others ($p < 0.05$). Both WFI_{fd} and WFI_m had strong inverse relationships with feeding days ($n = 18$, $r^2 = 0.89$) and number of meals ($n = 18$, $r^2 = 0.87$), respectively (Figure 2), meaning that fish responded to a decrease in feed abundance with an increase of feed intake. This behavior is well harmony with previous findings summarized by Carter et al. (2001), who underlined that fish respond to feed restriction by either reducing feeding frequency or abundance with an increase in meal size. Decreasing meal numbers results in a size increase of gastro intestinal tract in fish (Flowerdew and Grove, 1979; Grove et al., 1985; Jobling, 1982; Carter et al., 2001). As mentioned in introduction section, turbot has large mouth and stomach, and thereby they can ingest large meals at once (Aarnio et al., 1996), which was also confirmed in experimental conditions by Flowerdew and Grove (1979) and Grove et al. (1985). This suggests that turbot has an intrinsic ability to compensate lower feeding frequencies in farm conditions. However, consumption of large meals at limited feeding events did not bring a comparable growth in fish to those fed more frequently in the present study. Indeed, a restricted feeding regimens (once every other day) in plaice (*Pleuronectes platessa*) resulted in an

increased food intake in each feeding event due to enlarged stomach, but these fish lagged behind those fed continuously in terms of growth rate (Jobling, 1982). Another issue that should be underlined in terms of varying feeding rates in turbot is related to relationship between gastric emptying rate and return of appetite. Return of appetite is thought to be closely associated with stomach fullness (Grove et al., 1985; Alanärä et al., 2002). Gastric emptying rate in fish is affected by a number of factors including fish size, water temperature, meal size, feeding rate, feed type (dry or wet), ingredient particle size and feed nutrient concentrations (Flowerdew and Grove, 1979; Grove et al., 1985; Alanärä et al., 2002). It can be concluded in the present study that more frequently fed turbot appeared to have fuller stomach and therefore they consumed less amounts of feed intake in each feeding meal (Figure 2).

There should be a limit which farmers can reduce feeding frequencies in practice. To estimate minimum number of daily meal required for maximum DGC, we used linear and quadratic broken line models and they generated residual sum of squares of 0.6672 and 0.6593 respectively, suggesting that the latter should be used. The quadratic model estimated the daily meal number as 1.756 (Figure 3). This level is almost equal to feeding twice a day for 6 days a week. Therefore, our findings in terms of number of daily meals are consistent, to a large degree, with those of Burel et al. (2000), Türker (2006) and Blanquet and Oliva-Teles (2010), who recommended feeding twice a day in juvenile turbot. However, there are also conflicting findings in the literature; for instance, feeding once a day was preferred at both restricted and satiation feedings by Aydin et al. (2011).

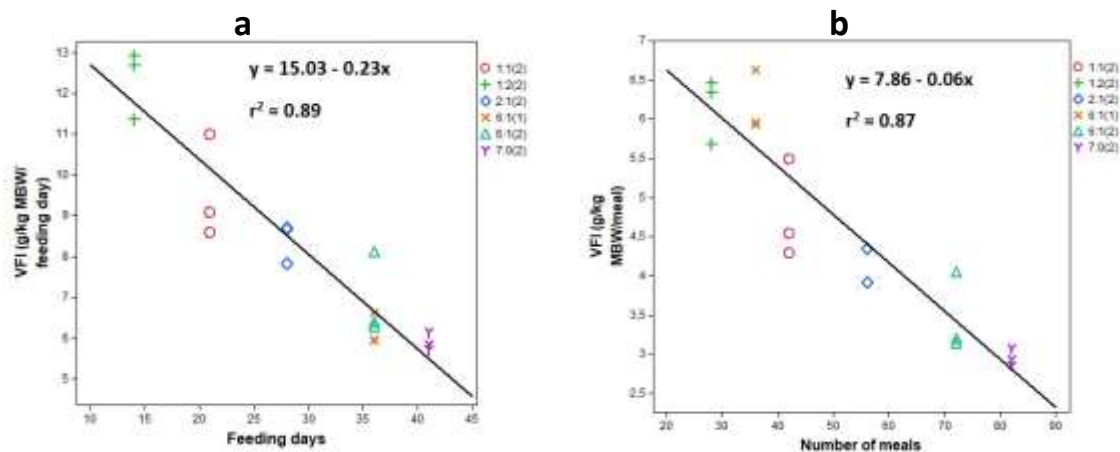


Figure 2. Relationship between number of feeding days and voluntary feed intake per feeding day: $VFI (g/kg MBW/feeding day) = 15.03 - 0.23(Feeding days)$ (a) and meal: $VFI (g/kg MBW/meal) = 7.86 - 0.062(Number of meals)$ (b). VFI: Voluntary feed intake, MBW: Metabolic body weight

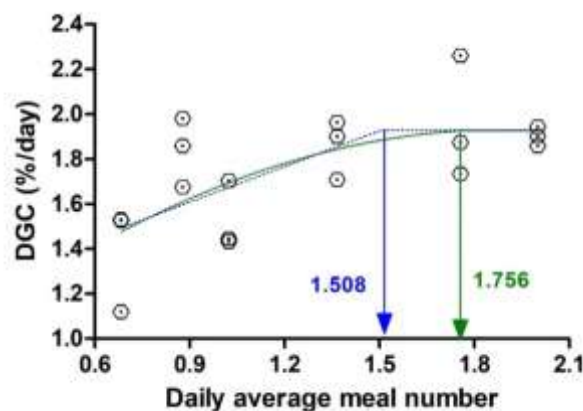


Figure 3. Relationship between daily average meal number and DGC (%/day); blue: linear broken line model, green: quadratic broken line. DGC: Daily growth coefficient.

Since the effect of various feeding frequencies on FCE of turbot was not significant in the current study, the observed growth differences among the treatments were due to variations in amount of feed consumptions, which are consistent with the observations of Grove et al. (1985), who reported comparable protein and energy assimilation rates in turbot regardless of feeding rates. However, some authors found that feed restriction improved FCE in turbot (Van Ham et al., 2003; Blanquet and Oliva-Teles, 2010). The discrepancies between our study and others could be due to differences in method of feed restrictions, *i.e.* we restricted amounts of feed by changing the frequencies and the former authors did by reducing feeding rates. This point is important because fish show a greater feed consumption after a period of food deprivation without an improvement of FCE (Nikki et al., 2004; Sevgili et al., 2013). However, a dietary restriction with feeding rate results in better FCE in fish including turbot (Van Ham et al., 2003; Eroldoğan et al., 2004; Blanquet and Oliva-Teles, 2010).

Although we did not record the individual weights of fish, juvenile *Colossoma macropomum* showed a greater size heterogeneity when fed less frequently due to development of hierarchy (Van der Meer et al., 1997), which should be taken into consideration in feeding management of turbot as well.

Briefly although various treatments showed similar growth rates at the end of the experiment, quadratic broken line method estimated a daily meal number of 1.756, tantamount to 6 days feeding a week with twice a day, as an optimum feeding rate for maximum growth of turbot weighing about 140 g.

Acknowledgments: This study was supported by the Japan International Cooperation Agency and General Directorate of Agricultural Production, Turkey. Senior scientist G. Nezaki and other project members are gratefully acknowledged for their valuable contributions during the study.

REFERENCES

- Aarnio, K., Bonsdorff, E., & Rosenback, N. (1996). Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot *Scophthalmus maximus* L. in the Åland archipelago, northern Baltic Sea. *Journal of Sea Research*, 36, 311-320.
- Alanärä, A., Kadri, S., & Paspatis, M. (2001). Feeding management. In *Food intake in fish* (Houlihan, D. et al. eds.), pp. 332-353. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Aydin, I., Küçük, E., Sahin, T., & Kolotoglu, L. (2011). The effect of feeding frequency and feeding rate on growth performance of juvenile black sea turbot (*Psetta maxima*, Linneaus, 1758). *Journal of Fisheries Sciences*, 5(1), 35-42.
- Bartlett M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A*, 160, 268-282.
- Blanquet, I., & Oliva-Teles, A. (2010). Effect of feed restriction on the growth performance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles under commercial rearing conditions. *Aquaculture research*, 41, 1255-1260.
- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K.A., Kühn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M., & Ribailier, D. (2000). Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture*, 188, 363-382.
- Carter, C., Houlihan, D., Kiessling, A., Médale, F., & Jobling, M. (2001). Physiological effects of feeding In *Food intake in fish* (Houlihan, D. et al. eds.), pp. 297-331. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Eroldoğan, O., Kumlu, M., & Aktas, M. (2004). Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture*, 231, 501-515.
- Flowerdew, M. W., & Grove, D. J. (1979). Some observations of the effects of body weight, temperature, meal size and quality on gastric emptying time in the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) using radiography. *Journal of Fish Biology*, 14, 229-238.
- Grove, D. J., Moctezuma, M. A., Flett, H. R. J., Foott, J. S., Watson, T., & Flowerdew, M. W. (1985). Gastric emptying and the return of appetite in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., fed on artificial diets. *Journal of Fish Biology*, 26, 339-354.
- Jobling, M. (1982). Some observations on the effects of feeding frequency on the food intake and growth of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology*, 20, 431-444.
- Känkänen, M., & Pirhonen, J., 2009. The effect of intermittent feeding on feed intake and compensatory growth of whitefish *Coregonus lavaretus* L. *Aquaculture*, 288, 92-97.
- Lovell, R.T. (2003). Diet and Fish Husbandry In *Fish Nutrition (Third Edition)* (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds.), pp. 703-754. Academic Press, San Diego.

- Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M., & Karjalainen, J. (2004). Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture*, 235, 285-296.
- NRC (2011). NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. *Washington, DC: National Research Council of the National Academies*.
- Saravanan, S., Schrama, J. W., Figueiredo-Silva, A. C., Kaushik, S. J., Verreth, J. A., & Geurden, I. (2012). Constraints on energy intake in fish: the link between diet composition, energy metabolism, and energy intake in rainbow trout. *Plos One*, 7(4), e34743.
- Sevgili, H., Hoşsu, B., Emre, Y., & Kanyılmaz, M. (2013). Effect of various lengths of single phase starvation on compensatory growth in rainbow trout under summer conditions (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 465-477.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Türker, A. (2006). Effects of feeding frequency on growth, feed consumption, and body composition in juvenile turbot (*Psetta maxima* Linnaeus, 1758) at low temperature. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 251-256.
- Van der Meer, M., Herwaarden, H.V., & Verdegem, M. (1997). Effect of number of meals and frequency of feeding on voluntary feed intake of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 28, 419-432.
- Van Ham, E.H., Berntssen, M.H., Imsland, A.K., Parpoura, A.C., Bonga, S.E.W., & Stefansson, S.O. (2003). The influence of temperature and ration on growth, feed conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217, 547-558.

Acta Aquatica Turcica

(e-ISSN: 2651-5474)

Copyright Release Form

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 : +90 246 211 86 76 Fax: +90 246 211 86 97

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

actaquatr@isparta.edu.tr

Yazım Kuralları

Sayfa boyutu	:A4 (21 cm x 29,7 cm) olarak ayarlanmalıdır
Kenar boşlukları	:Üst: 2,5 - Alt: 2,5 - Sol: 2,5 - Sağ: 2,5. Cilt payı: 0.
Yazı stili	:Tüm makalede Times New Roman, 11punto iki yana yaslı, satır aralığı tek, olarak ayarlanmalı. Paragraf girintisi 0,5 ayarlanmalıdır.
Adres yazımı	:Üniversite (kurum) – Fakülte – Bölüm – İl (Büyük illerde birden çok ilçede birimi bulunması durumunda veya merkez dışında ise “ilçe” ve yabancı yayınlarda “ülke” de yazılmalı)
Özet	:Özet, 250 kelimeyi geçmeyecek şekilde yazılmalıdır.
Anahtar kelimeler	:En az 3 (üç), en çok 5 (beş) kelime içermelidir.
Ondalık gösterim	:Türkçe makalelerde “,” (virgül) İngilizce makalelerde “.” (nokta) olmalıdır.
Tablo	:Tablo özel bir tasarım uygulanmamış düz kılavuz şeklinde olmalı ve iç yazılar en çok 10 punto ve alt bilgi yazıları 8 punto olmalıdır.
Şekil	:Şekil ve şekil yazısı sayfaya ortalı yerleştirilmelidir.
Metin içi atıf yapma	:(Bilgin vd., 2006; Küçük, 2008; Ekici ve Koca, 2009; Güçlü, 2018a; Güçlü, 2018b; Anonim, 2019), Kubilay vd. (2006)’ne göre, Diler (2008)’e göre, Boyacı ve Durucan (2009)’a göre gibi.....
Kaynaklar	:“APA” standardında ve alfabetik sıralama ile yapılmalıdır. Dergi isimleri açık yazılmalıdır. Kısaltma yapılmamalıdır. APA standartları için; https://www.adelaide.edu.au/writingcentre/referencing_guides/APA_styleGuide.pdf
APA’ya göre internet kaynaklarının gösterimi	https://blog.apastyle.org/apastyle/2010/11/how-to-cite-something-you-found-on-a-website-in-apa-style.html? ga=2.171887075.2146134039.1550653734-57712603.1550653734

Ö R N E K M A K A L E

Eğirdir Gölü'nden Tatlısu İstakozu (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823)'nun Sindirim Enzim Aktivitelerinin Mevsim, Büyüklük ve Cinsiyete Bağlı Olarak Değişimi

Esra ACAR¹, Seval BAHADIR KOCA^{1*}, Mehmet NAZ², Özgür KOŞKAN³, İlater İLHAN⁴

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta

²İskendurun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Hatay

³Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Isparta

⁴Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta

* Sorumlu Yazar: sevalkoca@sdu.edu.tr

Özet

Bu çalışma, Eğirdir Gölü'nde yaşayan *Astacus leptodactylus* türünde mide sindirim enzim aktiviteleri üzerine (proteaz α -amilaz ve lipaz) mevsim ve eşeyin etkisini araştırmak amacıyla oluşturulmuştur. Bu amaçla kerevitler 1 yılda 4 mevsim olarak Eğirdir Gölü'nden avlandı. İlkbahar mevsiminde, kerevitlerin pinterlere girmemesi nedeniyle örnekleme yapılamadı. Bu nedenle, sonuçlar üç mevsim (sonbahar, kış, yaz) ve eşeyler üzerinden faktöriyel düzeyinde varyans analizi ile değerlendirildi. Bulgular, eşey ve mevsim faktörlerinin kerevitlerin midesindeki proteaz ve lipaz aktivitesini önemli düzeyde etkilediğini ($p < 0,05$), α -amilaz aktivitesinde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde etkili olmadığını gösterdi ($p > 0,05$). Bulgular ayrıca, kerevitlerin, proteaz enzim aktivitesinin sonbahar ve kışın, lipaz enzim aktivitesinin ise kışın eşeyler arası önemli değişim gösterdiğini ortaya çıkardı ($p < 0,05$).

Anahtar kelimeler: *Astacus leptodactylus*, sindirim enzim aktivitesi, lipaz, α -amilaz, proteaz.

Variation of Digestive Enzyme Activities Depending on Season, Size and Sex of Freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) from Lake Eğirdir

Abstract

This study was conducted to search the effect of sex and season on digestive enzyme activities (protease, α -amylase, lipase) in *Astacus leptodactylus* species that lives in Eğirdir Lake. The freshwater crayfish were caught as four seasons in a year from Eğirdir Lake. The sampling was not possible for crayfish since they were not entered into trap in spring season. Therefore, the results were evaluated over three seasons and sex by factorial variance analysis. The results showed that sex and season affected to protease and lipase activities ($p < 0.05$), whereas they did not affect statistically α -amylase activity in crayfish stomach ($p > 0.05$). Results also indicated that protease enzyme activity in crayfish showed significant changes in autumn and winter while lipase enzyme activity showed changes in winter between sexes ($p < 0.05$).

Keywords: *Astacus leptodactylus*, digestive enzyme activity, α -amylase, lipase, protease.

GİRİŞ

Astacus leptodactylus, dünyada Türk istakozu (kerevit) olarak da bilinen (Köksal, 1988) ve ülkemiz içsularında doğal olarak bulunan bir decapoda (on ayaklı) türüdür. *Astacus* ekonomik değeri yüksek kabuklu türlerinden biridir (Bolat, 2001). Kerevit 1986 yılı öncesi özellikle Eğirdir Gölü balıkçılarının başlıca gelir kaynağı iken bu türün daha sonra gerek aşırı avcılık ve gerekse hastalık nedeniyle popülasyonu azalmıştır (Köksal, 1988; Ackefors, 2000; Bolat, 2001; Harlıoğlu ve Aksu 2002; Harlıoğlu ve Mişe 2007; Bilgin vd., 2008).

Acta Aquatica Turcica

Phone : +90 246 211 86 76 Fax: +90 246 211 86 97

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

actaquatr@isparta.edu.tr

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Ekim 2014 ile Haziran 2015 tarihleri arasında Eğirdir Gölü'nde kerevit (10-15 cm) avcılığı gerçekleştirilmiştir. Avcılıkta kerevit pinterleri kullanılmış, örneklemeler mevsimsel olarak yapılmıştır. İlkbahar mevsiminde, kerevitlerin pinterlere girmemesi nedeniyle örnekleme yapılamamıştır.

Enzim aktivite analizler

Bu çalışmada; α -amilaz, proteaz ve lipaz olmak üzere üç çeşit sindirim enzim aktivitesi araştırılmıştır. Tatlısu istakozundaki α -amilaz enzim aktivitesi, Metais ve Bieth (1968)'e göre yapılmıştır.

İstatistiksel analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 23 istatistiki paket programından yararlanılmış ve sonuçlar, faktöriyel düzeyinde varyans analizi testi ile $P < 0,05$ önem düzeyinde test edilmiştir. Faktörlerin seviye ortalamalarının arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır.

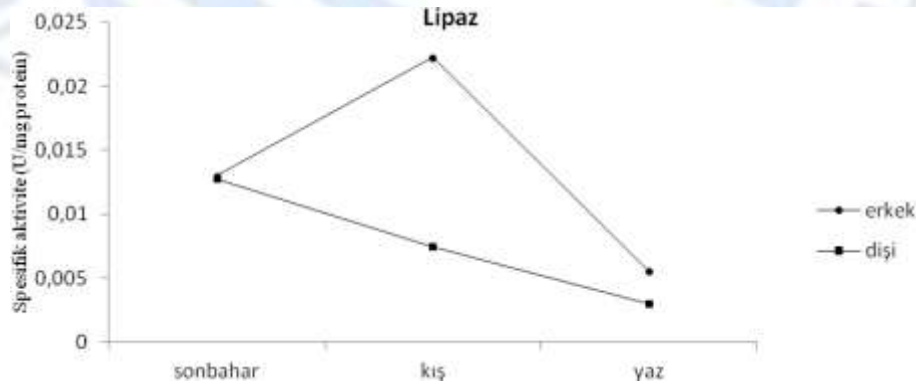
BULGULAR

Eşey ve mevsimsel farklılıkların kerevit midesindeki α -amilaz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Tablo 1).

Tablo1. Kerevit midesindeki α -amilaz aktivitesinin eşey ve mevsime göre değişimi, (Ort. \pm S.H.) (U/mgprotein)

Eşey/Mevsim	Sonbahar	Kış	Yaz
Dişi	^a 0,013 \pm 0,0011 ^a	^b 0,007 \pm 0,0006 ^b	^b 0,003 \pm 0,0010 ^a
Erkek	^a 0,013 \pm 0,0035 ^a	^b 0,022 \pm 0,0026 ^a	^c 0,006 \pm 0,0006 ^a

Lipaz aktivitesi erkek kerevitlerde sonbahar mevsiminden kış mevsimine kadar artan ve kış mevsiminden yaz mevsimine kadar azalan bir grafik oluşturmuş, dişi bireylerde ise sonbahar mevsiminden yaz mevsimine kadar azalan bir grafik oluşmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. Kerevit midesinde farklı mevsimlerdeki lipaz aktivitesi (U/mg protein)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut sindirim enzimlerinin profili ve faaliyetleri başta olmak üzere sindirim sisteminde ortaya çıkan fizyolojik süreçler, türlerin geniş besin çeşitliliğinden faydalanmasını etkilemektedir. Farklı kabuklu türleri, farklı beslenme alışkanlıklarına ve yaşam alanlarını yansıtan bir dizi sindirim enzime sahiptir (Anonim, 2017; Coccia vd., 2011).....

Ayrıca, maksimum enzim aktivitesini belirleyebilmek için; farklı pH, sıcaklık ve reaksiyon sürelerinde denemeler yapılması da önemli taşımaktadır.....

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. (veya varsa proje desteği yazılmalı)

KAYNAKLAR

- Acar Kurt, E. (2016). Tatlısu İstakozu (*Astacus Leptodactylus* Eschscholtz, 1823)'nun sindirim enzim aktivitelerinin mevsimsel değişimi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Ackefors, H. (2000). Freshwater crayfish farming technology in the 1990s: a European and global perspective. *Fish and Fisheries*, 1(4), 337-359.
- Adebayo-Tayo, B.C., Onilude, A.A., & Etuk, F.I. (2011). Studies on microbiological, proximate mineral and heavy metal composition of freshwater snails from Niger Delta Creek in Nigeria. *AU J.T.* 14(4), 290-298. Technical Report 290.
- Alpbaz, A. (1993). *Kabuklu ve Eklembacaklı Yetiştiriciliği*. I. Baskı, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Bilgin, Ş., İzci L, Günlü A., & Bolat Y. (2008). Eğirdir gölü'ndeki tatlısu ıstakozu (*Astacus leptodactylus* Esch, 1823)'nun boy grubu ve eşeye göre bazı besin bileşenlerinin belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1(2), 63-68.
- Kolkovski, S. (1995). The mechanism of action of live food on utilization of microdiets in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Ph.D.Thesis. The Hebrew University, Jerusalem,120.
- Reynolds, J., & Souty-Grosset, C. (2011). *Management of freshwater biodiversity: Crayfish as bioindicators*. Cambridge University Press, Cambridge.



Author Guidelines

Page Size	:A4 (21 cm x 29.7 cm)
Edge Interval	:Top: 2.5, lower: 2.5, left:2.5, right:2.5 , shrinkage: 0
Font style	:Except for these, the entire article should be set to 11punto-the first line of the paragraph starting at 0,5cm-before the line spacing-0 single line before / after the line spacing.
Address writing	:University (institution)-Faculty-Department-Province (Must be written county in foreign publications)
Abstract	:The abstract should not exceed 250 words.
Key words	:It should contain at least 3 (three), maximum 5 (five) words.
Decimal notation	:In Turkish articles, "(comma)" should be ". (Dot)" in English articles.
Table	:The table should be centered on the page.In-table scripts should be set to max 10punto. Footer, 8 point, left side of table.
Figure	:The figure and the figure should be centered on the page
Examples in-text references representation	:(Bilgin et al., 2006; Küçük, 2008; Ekici and Koca, 2009; Güçlü, 2018a; Güçlü, 2018b; Anonymus, 2019), According Kubilay et al. (2006), According Boyacı and Durucan (2009) <i>etc.....</i>
Reference	:“APA” standard should be used. Journal names should be written clearly. No abbreviation should be made. https://www.adelaide.edu.au/writingcentre/referencing_guides/APA_styleGuide.pdf
How to Cite Something You Found on a Website in APA Style	https://blog.apastyle.org/apastyle/2010/11/how-to-cite-something-you-found-on-a-website-in-apa-style.html?_ga=2.171887075.2146134039.1550653734-57712603.1550653734

Sample Article

A Taxonomic Study on Zooplankton Fauna of Kiğı Dam Lake (Bingöl-Turkey)

Hilal BULUT

Firat University, Faculty of Fisheries, Elazığ, Turkey

*Sorumlu Yazar: hilalhaykir@gmail.com

Abstract

The present study was conducted to determine zooplankton fauna of Kiğı Dam Lake during September 2012 and August 2013 seasonally. The zooplankton samples were collected by using plankton net with the mesh size of 55µm horizontally and preserved in 4% formaldehyde. Total 22 taxa (16 Rotifera, 4 Cladocera, and 2 Copepoda) were identified in Kiğı Dam Lake.

Keywords: Kiğı Dam Lake, species distribution, zooplankton.

INTRODUCTION

The majority of zooplankton (Copepoda, Cladocera and Rotifera) transform the phytoplankton to animal protein (Çirik and Gökpinar, 1993), and they play a significant role in food chain. It was reported that some species are the indicators of water quality, and eutrophication due to their sensitivity to environmental changes and therefore zooplankton studies on lakes have acquired significant importance (Berzins and Pejler, 1987; Mikschi, 1989).

Many studies were carried on zooplankton in Turkey (Özdemir and Şen, 1994; Göksu et al., 1997, 2005; Saler and Şen, 2002; Bozkurt and Sagat, 2008; Bulut and Saler, 2013a, 2013b; 2014a, 2014b; Saler et al., 2015a, 2015b). No previous research about zooplankton of Kiğı Dam Lake has been recorded. In this study zooplankton species and their seasonal variations of Kiğı Dam Lake have been investigated.

MATERIAL and METHODS

Kiğı Dam Lake was built on Peri Stream between 1997 and 2003. The maximum water capacity is 507.55 hm³ and has surface area 8.35 km² and maximum depth of 168 m (Şimşek, 2016) (Figure.1). The species were identified according to Edmondson (1959), Flössner (1972), Ruttner-Kolisko (1974), Kiefer (1978), Koste (1978), Negrea (1983), Segers (1995), and Einsle (1996).



Figure1. Stations of Kiğı Dam Lake

Acta Aquatica Turcica

Phone : +90 246 211 86 76 Fax: +90 246 211 86 97

<http://dersipark.gov.tr/actaquatr>
actaquatr@isparta.edu.tr

RESULTS

A total of 22 taxa consisting of 16 Rotifera, 4 Cladocera and 2 Copepoda species were identified in the Dam Lake (Table 2).

The lowest numbers of taxa were recorded in winter at first stations (4 species). Some water quality parameters (pH, dissolved oxygen, and surface water temperature) were measured at study field (Table 3).

Table 3. Seasonal changes of water quality parameters in Kiğı Dam Lake

	Autumn	Winter	Spring	Summer
Water temperature (°C)	16	7.2	17.2	22.5
pH	7.0	6.8	6.9	7.3
D.O (mgL-1)	6.2	7.3	6.0	5.2

DISCUSSION

Zooplankton is known as the indicator of trophic status of aquatic habitats. They are also used to signify the water quality in freshwater systems. *K. cochlearis* and *P. dolichoptera* from Rotifera are indicators of productive habitats, while *N. acuminata* and *N. squamula* are indicators of cold waters (Kolisko, 1974). In Kiğı Dam Lake *K. cochlearis*, *P. dolichoptera* and *N. squamula* were observed.

In Murat River (Bulut and Saler, 2014a), Kalecik Dam Lake (Bulut and Saler, 2013b), Peri Stream (Saler et al., 2011), that were located in the same region with Kiğı Dam Lake, rotifers were recorded as dominant species as to number of individuals and abundance, followed by Cladocera and Copepoda species.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by BAP of Trakya University (project number 2011-130). This work was presented as an oral presentation in the II. International Congress on Fisheries and Aquatic Research held in Nevşehir, Turkey on July 12-15, 2018 and its summary were published.

REFERENCES

- Berzins, B., & Pejler, B. (1987). Rotifer occurrence in relation to pH. *Hydrobiologia*, 147, 107-116.
- Blacher, E.C. (1984). Zooplankton trophic state relationships in North and Central Florida Lakes. *Hydrobiologia*, 109, 251-263.
- Bulut, H. & Saler, S. (2013a). Ladik Gölü (Samsun) zooplanktonu üzerine ilk gözlemler. *Su Ürünleri Mühendisleri Dergisi*, 51,74-78.
- Bulut, H., & Saler, S. (2013b). Kalecik Baraj Gölü (Elazığ- Türkiye) zooplanktonu. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 25 (2), 99-103.
- Cirik, S., & Gökpınar, Ş. (1993). *Plankton Bilgisi ve Kültürü*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi. Yayınları: 19, İzmir.
- Einsle, U. (1996). *Copepoda: Cyclopoida, Genera Cyclops, Megacyclops, Acanthocyclops. Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*, No.10 SPB Academic Publishing. pp 82 (in London).
- Göksu, M.Z.L., Çevik, F., Bozkurt, A., & Sarıhan, E. (1997). Seyhan Nehri'nin (Adana il merkezi sınırları içindeki bölümünde) Rotifera ve Cladocera faunası. *Turkish Journal of Zoology*, 21, 439-443.