



Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences

(Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi)

E-ISSN 2548-0006

*JAES*

*AÇEH*

# *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*

*Journal of Anatolian  
Environmental and Animal Sciences*

**Cilt/Volume 5 • Sayı/Number 1 • 2020**



**Sahibi**

Prof. Dr. Bülent VEREP

Prof. Dr. Fikri BALTA

**Sorumlu Yazı İşleri Müdürü**

**Baş Editör / Editor-in Chief**

Prof. Dr. Bülent VEREP

Recep Tayyip Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Bölümü, Deniz Biyolojisi Anabilim Dalı, 53100 Rize, Türkiye

**Baş Editör Yardımcıları / Co-Editor in Chief**

Prof. Dr. Fikri BALTA

Prof. Dr. Turan YÜKSEK

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, Türkiye  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Güzel Sanatlar Tasarım ve Mimarlık Fakültesi, Bitki Materyali ve Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Türkiye

**Editör Yardımcıları / Co-Editors**

Prof. Dr. Nüket SIVRI, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi  
Prof. Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veterinerlik Fakültesi  
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Prof. Dr. Süleyman AKHAN, Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Tamer AKKAN, Giresun University, Fen-Edebiyat Fakültesi  
Doç. Dr. Engin Derya GEZER, Karadeniz Teknik Ü. Orman Fakültesi,

**Editörler Kurulu / Editorial Boards**

Prof. Dr. Ahmet ALP, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi  
Prof. Dr. Athanasios KUNGOLOS, School of Engineering, Aristotle Univ. of Thessaloniki, Greece  
Prof. Dr. Cemalettin ŞAHİN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Davut TURAN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Gökhan ABAY, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Güzel San. Tas. ve Mim. Fakültesi  
Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Prof. Dr. Iliia TSACHEV, Trakia University Faculty of Veterinary Medicine  
Prof. Dr. İhsan AKYURT, Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi (Emekli Öğretim Üyesi)  
Prof. Dr. İlkay Erdoğan ORHAN, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Prof. Dr. Jinho JUNG, Korea University Env. Sci. and Eco. Eng.  
Prof. Dr. Levent BAT, Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Mehmet Salih ÇELİKKALE, KTÜ Deniz Bilimleri Fakültesi (Emekli Öğretim Üyesi)  
Prof. Dr. Muhammed TÜRKÖĞLU Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Deniz Bil. ve Tek. Fakültesi  
Prof. Dr. Muhammed BORAN, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN, Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi  
Prof. Dr. Nadir Başçınar, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Prof. Dr. Orhan Karşlı, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi  
Prof. Dr. Önder YILDIRIM, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Ricardo PEREZ ENRIQUEZ, Genetica Acuicola Programa de Acuicultura Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste Mexico.  
Prof. Dr. Semih ENGİN İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Şengül A. KARAOĞLU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi  
Prof. Dr. Şenol AKIN, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi  
Prof. Dr. Şevki Kayış Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Vagif ATAMOV, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Doç. Dr. Cengiz MUTLU, Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
Doç. Dr. Emre ÇAĞLAK, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Ertuğrul AĞIRBAŞ, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Doç. Dr. Huriye Arıman Karabulut, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Serkan KORAL, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Mehmet AYDIN, Ordu Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Ertuğrul TERZİ, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Christina EMMANOULI, Aristotle University of Thessaloniki School of Engineering  
Dr. Tuba ERGÜL KALAYCI, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

**Bölüm Editörleri / Section Editors**

Prof. Dr. Ali BİLGİN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Prof. Dr. Ahmet Mutlu GÖZLER, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Erol ÇAPKIN, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Prof. Dr. Fatih İSLAMOĞLU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Prof. Dr. Nadir Başçınar, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Prof. Dr. Ramazan SEREZLİ, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Prof. Dr. Serhat KÜÇÜKALİ, Çankaya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi  
Prof. Dr. Temel ŞAHİN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Denizcilik Fakültesi  
Doç. Dr. Aysun TÜRKMEN, Giresun Üniversitesi, Teknik Bilimler MYO  
Doç. Dr. Cemalettin BALTACI, Gümüşhane Üniversitesi, Gıda Bilimleri ve Mühendisliği  
Doç. Dr. Coşkun ERÜZ, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Doç. Dr. Ekrem Şanver ÇELİK, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bil. ve Tek. Fakültesi  
Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ, Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi  
Doç. Dr. Fatih Şaban Beriş, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Doç. Dr. Hacer EMİRAL Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi  
Doç. Dr. İlhan YANDI, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Denizcilik Fakültesi  
Doç. Dr. Kenan GEDİK, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. M. Mustafa AKİNER Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Doç. Dr. Raşan Evren MAZLUM, , Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Tülay ÇAĞATAY, Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Ügün AYATAN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Ahmet Raif ERYAŞAR, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Doç. Dr. Gülbin FIRİDİN GAZI ÜNİVERSİTESİ, Fen bilimleri enstitüsü, Çevre ABD.  
Dr. Arzu AYDIN UNCUMUSAOĞLU, Giresun Üniversitesi, Çevre Mühendisliği  
Dr. Şükri ÖNALAN, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Muhammed DUMAN, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Dr. Erhan ÇİLOĞLU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Denizcilik Fakültesi  
Dr. Engin Derya GEZER, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi  
Dr. Fatma Delihan SONAY, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Gökhan KALAYCI, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Hakan KARAOĞLU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Koray ÖZŞEKER, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Enstitüsü  
Dr. Oğuz KURDOĞLU, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi  
Dr. Ayşe DEMİRBAŞ, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Münevver ORAL, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Ög. Üyesi Salih KUMRU, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi  
Dr. Ög. Üyesi Şafak KALINDAMAR, Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Dr. Ömer Lütfü ÇORBACI, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Güzel San. Tas. ve Mim. Fakültesi  
Nimet Selda BAŞÇINAR, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü

**Yönetim Yeri Adres / Address**

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi,  
Zihni Derin Yerleşkesi, Fener Mah., 53100, Rize / Turkey.

**Tel:** 90 464 223 33 85-1438 ve 1436

**Fax:** 90 464 223 41 18

**İletişim:** vrepoglu@gmail.com, anatolianacademiccience@hotmail.com

**Yayın Türü:** Yaygın süreli ve hakemli

Tüm hakları saklıdır. Bu Derginin tamamı ya da Dergide yer alan bilimsel çalışmaların bir kısmı ya da tamamı 5846 sayılı yasanın hükümlerine göre Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi sahibi yazılı izni olmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayımlanamaz.

**İnternet Adreslerimiz / Web Addresses**

http://dergipark.gov.tr/jaes



İÇİNDEKİLER / TABLE OF CONTENTS

İçindekiler Contents	Makale Article	S/P. No
		1-3
Pelajik ve Bentik Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan Karbonikanhidraz Aktivitelerinin İrdelenmesi. Investigation of Purified Carbonic Anhydrase Activity from The Gills of Pelagic and Benthic Fish.	Araştırma Research	4-10
<b>Barbaros DİNÇER &amp; Pelin BİRİNCİ</b> Morphometric Aspects and Growth Parameters of the Wedge Clam ( <i>Donax trunculus</i> ) of the Black Sea, Turkey.	Research Araştırma	11-18
Karadeniz'deki (Türkiye) kum şırlanının ( <i>Donax trunculus</i> Linnaeus, 1758) büyüme ve morfometrik parametreleri. <b>Mehmet AYDIN, Evren TUNCA &amp; Nurten ESEN ERSOY</b> The Effects of Ecological Factors on Some Characteristic of Fruits in <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L. Populations in The Firtına Valley.	Research Araştırma	19*24
Firtına Vadisi'ndeki <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L. Populasyonlarında Ekolojik Faktörlerin Meyvelerin Bazı Özelliklerine Etkisi. <b>Filiz YÜKSEK</b> İzmit Körfezi'nde Çevresel Baskıların Etkileri. Effects of the Environmental pressures in Izmit Bay.	Araştırma Research	25-37
<b>Huri EYÜBOĞLU &amp; Ömer EYÜBOĞLU</b> Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (g6pd) Geninin Genomik Organizasyonu. Genomic Organisation of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (g6pd) Gene of Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ).	Araştırma Research	38-50
<b>Mehtap BAYIR</b> Cu, Zn ve Karışımlarının <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri. Effects of Cu, Zn and its mixtures on Hemocyte Types and Counts of <i>Galleria mellonella</i> L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae).	Araştırma Research	45-51
<b>Ayşe KARA, Benay TUNÇSOY &amp; Pınar ÖZALP</b> Büyük Ruminantia'da Fibula'nın Morfolojisi. Morphology of Fibula in Large Ruminantia.	Araştırma Research	52-55
<b>Murat KABAK, Sedef SELVİLER SİZER, Süleyman YÜKSEL &amp; Burcu ONUK</b> Atık Su Örneklerinde Bazı Ağır Metallerin İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile Belirlenmesi. Determination of Some Heavy metals In Waste Water Samples With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS).	Araştırma Research	56-60
<b>Zekeriyya BAHADIR</b> Effects of Macerate Oil of Garlic ( <i>Allium sativum</i> , Limne), Tunceli Garlic ( <i>Allium tuncelianum</i> , Kollman) and Onion ( <i>Allium cepa</i> , Limne) on Antioxidant Enzyme Activities of Rainbow Trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> L.).	Research	
Sarımsak ( <i>Allium sativum</i> , Limne), Tunceli Sarımsağı ( <i>Allium tuncelianum</i> , Kollman) ve Soğan ( <i>Allium cepa</i> , Limne) Masere Yağının, Gökkuşluğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> L.)'nin Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.	Araştırma	61-65
<b>Başar ALTINTERİM &amp; Önder AKSU</b> Felin İdiyopatik Sistitis Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. New Trends in the Treatment of Feline Idiopathic Cystitis.	Research Araştırma	66-73
<b>Zeynep Nurselin ÇOLAK &amp; Didem PEKMEZCİ</b> Detection of Hg <sup>2+</sup> in Aqueous Media by A New Xanthene Based Schiff Base Sensor.	Araştırma Research	74-79
Yeni Bir Skenten Bazlı Schiff Bazı Sensörü ile Sulu Ortamda Hg <sup>2+</sup> Tespiti. <b>Kaan KARAOĞLU</b> Length-Weight Relationships and Condition Factor of Four Different Sea Cucumber Species in the Aegean Sea.	Research Araştırma	80-85
Ege Denizi'ndeki 4 Farklı Deniz Hıyarı Türünün Boy-Ağırlık İlişkisi ve Kondisyon Faktörü. <b>Mehmet AYDIN</b> Anadolu mandası dışıklarından izole edilen termofilik <i>Campylobacter</i> türlerinin moleküler karakterizasyonu.	Araştırma Research	86-92
Molecular characterization of thermophilic <i>Campylobacter</i> species isolated from Anatolian buffalo feces. <b>Timur GÜLHAN, Merve Gizem SEZENER, Serhan AKGÖZ, Volkan Enes ERGÜDEN, Arzu FİNDİK &amp; Alper ÇİFTÇİ</b> Usage of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> as a probiotic in Sea bass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ).	Research Araştırma	86-99
Levrek balıklarında ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) probiyotik olarak <i>Lactobacillus rhamnosus</i> kullanımı. <b>Fatma ÖZTÜRK &amp; Ömer Memduh ESENDAL</b> Gökkuşluğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Yavrularında Görülen Gaz Kabarcığı Hastalığı ve Tedavisi Üzerine Bir Araştırma	Araştırma Research	100-105
A Study on Gas Bubble Disease and Treatment Observed in Rainbow Trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Fry <b>Fikri BALTA &amp; Zeynep DENGİZ BALTA</b> Lepistes Balıklarında Bazı Herbisitlerin Akut Toksik Etkisinin Araştırılması	Araştırma Research	106-114
A Research on Acute Toxic Effects of Some Herbicides on Guppies <b>Bülent VEREP &amp; Huri YILDIRIM</b>	Research	



## Pelajik ve Bentik Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan Karbonik anhidraz Aktivitelerinin İrdelenmesi [\*]

Barbaros DİNÇER\* Pelin BİRİNCİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 22.09.2019

Kabul/Accepted: 16.01.2020

Atf yapmak için: Dinçer, B. & Birinci, P. (2019). Pelajik ve bentik balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz aktivitelerinin irdelenmesi. Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi, 5(1), 4-10.

How to cite: Dinçer, B. & Birinci, P. (2019). Investigation of purified carbonic anhydrase activity from the gills of pelagic and benthic fish. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 4-10.

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-5411>  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5034-2154>

**\*Sorumlu yazarın:**

Barbaros DİNÇER

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Rize, Türkiye.

✉: [barbaros.dincer@erdogan.edu.tr](mailto:barbaros.dincer@erdogan.edu.tr)

Cep telefonu : +90 (535) 667 17 66

Telefon : +90 (464) 223 61 26/1785

Faks : +90 (464) 223 40 19

**Öz:** Bu çalışmada, denizel ortamda bentik bölgede yaşayan Mezgıt ve pelajik bölgede yaşayan Hamsi balıklarının solungaçlarından karbonik anhidraz (CA) saflaştırıldı ve karakterize edildi. Mezgıt balığı solungaçından elde edilen CA enzimi, Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid afinite kolonunda 14 kat ve %19,5 verimle saflaştırıldı. Hamsi balığı solungaçından elde edilen CA enzimi ise 17 kat ve %9,5 verimle saflaştırıldı. Mezgıt ve Hamsi balıklarının özgül aktiviteleri sırasıyla 126,4 EU mg protein<sup>-1</sup> ve 1000,0 EU mg protein<sup>-1</sup> olarak belirlendi. SDS-PAG Elektroforezi sonucunda her iki balığın solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidrazların altbirim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olan tek protein bantlarına sahip oldukları belirlendi. Solungaçlarından elde edilen CA'ların p-nitrofenil asetat substratı varlığında esteraz aktiviteleri pH 8,0'da ve 40 °C sıcaklıkta en yüksek olduğu belirlendi. Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından saflaştırılan CA' nın, p-nitrofenol asetat substratı varlığında *Km* ve *Vmaks* değerleri Lineweaver-Burk grafiğiyle hesaplandı ve sırasıyla *Km* değeri 0,08 mM ve 0,01 mM, *Vmaks* değeri 1x10<sup>7</sup> µM dak<sup>-1</sup> ve 2,5x10<sup>6</sup> µM dak<sup>-1</sup> olarak tespit edildi. Mezgıt ve Hamsi balıklarının solungaçlarından elde edilen CA' nın sırasıyla sülfanilamid inhibitörü varlığında 6,0 µM ile 4,0 µM ve asetazolamid inhibitörü varlığında ise 2,0 µM ile 2,0 µM IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Bentik, hamsi balığı, karbonik anhidraz, mezgıt balığı, pelajik.

## Investigation of Purified Carbonic Anhydrase Activity from The Gills of Pelagic and Benthic Fish

**Abstract:** In this study, carbonic anhydrase (CA) was purified and characterized from the gills of anchovy fish living in the pelagic region and whiting living in the benthic region in marine environment. The carbonic anhydrase from the whiting gill was purified 14 fold and 19.5% yield using Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity column. Also, carbonic anhydrase from the anchovy gill was purified 17 fold and 9.5% yield using same column. The specific activity of whiting and anchovy fish were determined as 126.4 EU mg protein<sup>-1</sup> and 1 000.0 EU mg protein<sup>-1</sup>, respectively. SDS-PAG Electrophoresis showed that the carbonic anhydrazes purified from the gills of both fish had single protein bands with a subunit molecular mass of approximately 29 kDa. In the presence of p-nitrophenyl acetate substratum of gills, esterase activities were found to be highest at pH 8.0 and 40 °C. The values of *Km* and *Vmax* of carbonic anhydrase from the gills of whiting and anchovy fish were calculated by Lineweaver-Burk graph in the presence of p-nitrophenol acetate substrate and *Km* values were determined as 0.08 mM and 0.01 mM respectively, *Vmax* value was 1x10<sup>7</sup> µM min<sup>-1</sup> and 2.5x10<sup>6</sup> µM min<sup>-1</sup>, respectively. It was determined that the CA obtained from the gills of whiting and anchovy fish had an IC<sub>50</sub> value of 6.0 µM to 4.0 µM against the sulfanilamide inhibitor, respectively and 2.0 µM to 2.0 µM, against the acetazolamide inhibitor.

**Keywords:** Anchovy, benthic, carbonic anhydrase, pelagic, whiting.

**\*Corresponding author's:**

Barbaros DİNÇER

Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Rize, Türkiye.

✉: [barbaros.dincer@erdogan.edu.tr](mailto:barbaros.dincer@erdogan.edu.tr)

Mobil telephone : +90 (535) 667 17 66

Telephone : +90 (464) 223 61 26/1785

Faks : +90 (464) 223 40 19

[\*] Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.



## GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su elektrolit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. Fizyolojik olarak karbondioksitin hidrasyonunu ve bikarbonatın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Enzim hemen hemen bütün dokularda mevcut olup hidrataz aktivitesinin yanında  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  oluşumunda da rol almaktadır (Wistrand, 1981; Beydemir vd., 2000; Chegwiddden vd., 2000).

İnsan eritrositlerden izole edilen ilk enzimler CA I ve II izoenzimleridir. CA' nın izolasyonunda en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntem 1970 lerde uygulanmaya başlanmış ve sonrasında bu yöntem geliştirilerek CA I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Günümüzde CA' nın 16 tane izoenzimi olduğu bilinmektedir (Supuran & Scozzafava, 2001; Supuran, 2008; 2017).

CA canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir. CA her canlı ve dokuda farklı izoenzime ve farklı kinetik özelliklere sahiptir. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek üzere pek çok organizma ve farklı dokularda CA' nın saflaştırılarak karakterize edildiği yüzlerce çalışma bulunmaktadır (Beydemir vd., 2000; Söyüt, 2006; Kolaylı vd., 2011; Dinçer vd., 2016). Ancak bugüne kadar mezgit ve hamsi balıklarının eritrositlerinde ve diğer dokularında CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca pelajik ve bentik bölgelerde yaşayan balık türlerinin CA aktiviteleri arasında bir farklılığın olup olmadığını ortaya koyan bir çalışma da bulunamamıştır. Mezgit denizel ortamda 30-300 m derinliklerde dip ve dibe yakın bölgelerde (Özdemir vd., 2018), hamsi ise gündüzleri 30-40 m derinlerde, geceleri yüzeye yakınlarda dolaşır (Satılmış ve Bat, 2010; Zehiroğlu, 2014). Bu iki balığın farklı derinliklerde yaşamalarından dolayı solunum sisteminin ilk temas yüzeyi olan solungaçlarındaki enzimlerin davranışları da farklılık olması beklenmektedir. Bu hipotezden yola çıkarak gerçekleştirilen bu çalışmada çok tüketilen balıklardan pelajik bir balık olan hamsi ve bentik bir balık olan mezgitin solungaçlarından sepharose-4B afinite kolon matriksi kullanılarak CA enzimleri saflaştırıldı ve karakterize edildi.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada kullanılan mezgit ve hamsi balıkları balıkçı teknesinden gününbirlik satın alınarak -70 °C'de muhafaza edildiler.

**Homojenatlarının Hazırlanması:** Solungaçlar neşter yardımıyla zedelenmeden dikkatlice alınarak kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl ile 3 'er defa yıkandı. Her iki balıktan da elde edilen solungaçlar, 3,0

g mL<sup>-1</sup> olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde blender ile parçalanarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar sıvı azot içinde 5 dakika bekletildikten sonra tekrar çözününceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Homojenatlar buz banyosu içinde 5'er dakika olmak üzere sonikasyona tabi tutuldular ve elde edilen süspansiyonlar 60 dakika 14500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı enzim kaynağı olarak kullanıldı (Pullan & Noltmann, 1985; Wistrand, 2002, Candan, 2013; Birinci, 2017).

**Sepharose-4B Afinite Kolonunun Hazırlanması:** Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi ile hazırlanır. Bu dolgu materyaline L-tirozin kovalent olarak takılmış olup sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlenmiştir. Bu durumda tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. Sülfanilamid CA'nın spesifik bir inhibitörü olup jelin yapısına bağlanarak enzimle yüksek oranda etkileşimi sağlamakta ve enzimin saflaştırılmasında en çok kullanılan yöntem olarak da bilinmektedir (Arslan vd.,1996; Bülbül vd., 2003).

**Solungaç Homojenatlarının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Elüsyonu:** Hazırlanan afinite jelinin kolona tatbikini takiben jel dengeleme tamponu (25 mM Tris/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,7) ile elüat akış hızı yine 20 mL sa.<sup>-1</sup> olacak şekilde kolon dengeye getirildi. Kolon aynı tampon içinde 24 saat +4 °C'de bekletildi.

Mezgit ve hamsi balıklarının solungaç homojenatları ayrı kolonlarda, aynı işlemler yapılarak, dengelenmiş kolona tatbik edildi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra sistemden yıkama tamponu (25 mM Tris/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,7) geçirilerek homojenattan kaynaklanan ve istenmeyen bileşikler kolondan uzaklaştırıldı.

Kolona tutturulmuş karbonik anhidraz enziminin afinite kolonundan elüsyonu için CA II elüsyon çözeltisi (0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/ 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH 5,6) tatbik edilmiştir (Aslan vd., 1996). 20 mL sa.<sup>-1</sup> akış hızında elüatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde bir fraksiyon toplayıcı yardımıyla alındı. Elüatlarda CA hidrataz aktivitesi gözlenen fraksiyonlar birleştirilerek amicon ultrafiltrasyon membranı (10.000 MWCO) kullanılarak 4.000xg'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkanarak tampon değiştirildi ve enzim çözeltisi 8,0 mL'ye kadar konsantre edildi (Dinçer vd., 2016).

Elüatların protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi (Lowry vd., 1951). Standart çalışma grafiği 1,0 mM stok bovine serum albümin (BSA) çözeltisi seyreltilerek hazırlandı.

**Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE):** Mezgit ve hamsinin solungaç homojenatlarının Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra sodyum dodesil sülfat

poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) uygulanarak enzimlerin saflaştırma dereceleri kontrol edildi.

**CO<sub>2</sub>-Hidratat Aktivitesi Tayini:** Metod, substrat olarak kullanılan CO<sub>2</sub>'ın hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH düşüşünden dolayı brom timol mavisi indikatöründe meydana gelen renk değişim süresinin ölçümüne dayanmaktadır (Maren, 1960). Ortamın pH'ının ayarlanmasında Veronal tamponu (0,25 M sodyum barbitat, pH 8,15) kullanıldı. Substrat çözeltisi olarak doygun CO<sub>2</sub> çözeltisi kullanıldı.

Substrat ilavesinden hemen sonra vorteksleme yapılarak ve çözeltinin renginin karıştırma anından itibaren maviden sarımsı yeşile dönmesine kadar geçen zaman kronometre ile tespit edilir. Enzim ünitesi enzimsiz reaksiyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır. Enzim aktivitesi ölçümleri 25°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Bu aktivite "Wilbur-Anderson Aktivitesi" olarak bilinir (Wilbur ve Anderson, 1948).

$EU = (t_0 - t_c) / t_c$  (t<sub>0</sub> : Enzimsiz denemede ölçülen süre; t<sub>c</sub> : Enzim varlığında ölçülen süre)

**Esteraz Aktivitesi Tayini:** CA'nın esteraz aktivitesi, *p*-nitrofenil asetat (*p*-NFA) substratının 25°C' de 348 nm'deki absorbans değerindeki azalmayla tayin edilmektedir (Armstrong vd., 1966 , Verporte vd., 1967). Esteraz aktivitesi çalışmaları, 3 mM *p*-NFA substratı varlığında 1 M Tris-SO<sub>4</sub> Tamponunda (pH 9) 25°C' de Shimadzu UV-1601 marka ve model spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi.

Enzim ünitesi, 25°C' de 1 dakikadaki 348 nm' de absorbansda 0,001 birimlik azalmaya sebep olan enzim miktarı olarak belirlendi.

**pH Değişiminin Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesine Etkisinin Belirlenmesi:** Her iki solungaçtan izole edilen CA'ların farklı pH değerlerinde (pH 4,0-11,0) *p*-NFA substratı varlığında 348 nm' de esteraz aktivitelere

bakıldı. Ölçülen aktivite değerleri gözlenen en yüksek aktiviteye göre oranlanarak bağlı olarak hesaplanıp, grafikleri çizildi ve en yüksek aktivitenin gözlenmiş olduğu pH değeri CA'nın esteraz aktivitesi için optimal pH değeri olarak belirlendi.

**Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan CA'nın Esteraz Aktivitesi İçin K<sub>m</sub>, V<sub>maks</sub> ve K<sub>kat</sub> Değerlerinin Belirlenmesi:** Solungaçlardan saflaştırılan CA'ların esteraz aktiviteleri, *p*-NFA substratının en az 5 farklı konsantrasyonunda ve üç tekrar çalışmak suretiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü. Değişen substrat konsantrasyonuna karşı hız grafikleri Lineweaver-Burk'e göre çizildi. Grafikten K<sub>m</sub> ve V<sub>maks</sub> değerleri hesaplandı.

**Mezgit ve Hamsi Balıklarının Solungaçlarından CA'nın İnhibisyon Çalışması:** CA enziminin bilinen spesifik inhibitörleri sülfanilamid ve asetazolamid ile inhibisyon çalışması yapıldı. Hidratat aktivitesine inhibitörün etkisi yüzde olarak hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonuna karşı çizilen % inhibisyon grafiğinden yararlanılarak CA'nın hidratat aktivitesini % 50 inhibe eden inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) belirlendi (Karahalil, 2009; Dinçer vd., 2016) .

## BULGULAR

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerindeki protein miktarları sırasıyla 7,89 mg mL<sup>-1</sup> ve 1,83 mg mL<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

Mezgit ve hamsi solungaçlarından elde edilen özütlerdeki CA'nın hidratat aktivitesi mezgit için 71,1 EU mL<sup>-1</sup>, hamsi için 105,6 EU mL<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

Mezgit Balığı solungacı özütünden saflaştırılan CA'nın 126,4 EU mg protein<sup>-1</sup> özgül aktivite gösterdiği ve 14 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 1). Hamsi Balığı solungacı özütünden saflaştırılan CA'nın 1.000,0 EU mg protein<sup>-1</sup> özgül aktivite gösterdiği ve 17 kat saflaştığı belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 1.** Mezgit Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma aşamalarının verileri.

**Table 1.** Data of purification steps of CA enzyme purified from whiting gill.

	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	25	71,1	1775,5	7,9	197,3	9,0	100	1
Saf CA	8	13,9	111,2	0,11	0,88	126,4	19,5	14

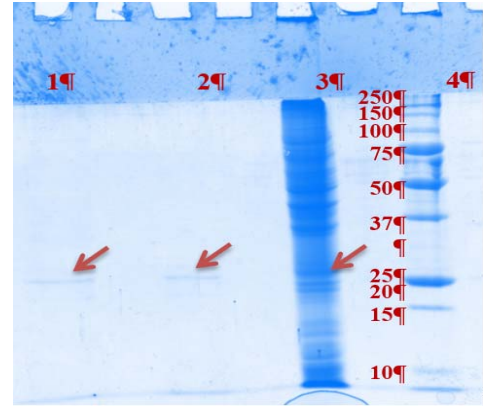
**Tablo 2.** Hamsi Balığı solungacından saflaştırılan CA enziminin saflaştırma aşamalarının verileri,

**Table 2.** Data of purification steps of CA enzyme purified from anchovy gill.

	Toplam hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam aktivite (EU)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg protein)	Verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	25	105,6	2640	1,8	45	58,7	100,0	1
Saf CA	8	10	80	0,01	0,08	1000,0	9,5	17

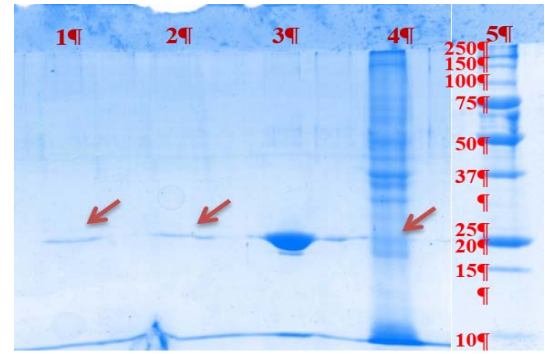
Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) eritrositlerinden CA Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonuyla, balık kanına göre 539 kat ve %29 verimle saflaştırılmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin 26.943 EU mg protein<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Ayrıca bir başka çalışmada Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*) solungacında CA' nın 222,2 EU/mg protein özgül aktivitesine sahip olduğu ve % 20,7 verimle ile 66 kat saflaştırıldığı belirtilmektedir (Candan, 2013; Dinçer vd., 2016). Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları CA enzimleri Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %9,1, %32,84 ve %83,6 verimlerle saflaştırılmıştır. Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokuları için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 84 ve 455 olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Kaya, 2011, Kaya vd., 2015). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 4318 EU mg protein<sup>-1</sup> olan, %38 verimle ve yaklaşık 2260 kat; böbrek dokusundan, spesifik aktivitesi 17 285 EU mg protein<sup>-1</sup> olan, %31,7 verimle ve yaklaşık 1800 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 2300 EU mg protein<sup>-1</sup> olan, %19 verimle ve yaklaşık 1080 kat; beyin dokusundan spesifik aktivitesi 2275 EU mg protein<sup>-1</sup> olan %22,5 verimle ve yaklaşık 1283 kat saflaştırılmıştır (Söyüt, 2006). Bir başka çalışmada gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla 422,5 EU mg protein<sup>-1</sup> spesifik aktivite, %20,9 verimle 222,4 kat saflaştırılmışlardır (Hisar vd., 2003). CA'ın aktivitesi ile saflaştırma katsayısı organizma veya doku değişikçe farklılık göstermektedir. Çalışmada kullanılan balıklardan elde edilen CA' ların eritrosit CA' larına göre daha düşük aktiviteye sahip oldukları fakat solungaç CA' ları ile paralellik gösterdikleri belirlendi.

Mezgit ve Hamsi özütlerinden elde edilen CA SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Elde edilen elektroforez jeli taranarak elektronik ortama aktarıldı. Yapılan SDS-PAGE elektroforezleri sonucunda her iki enzim içinde tek protein bandı gözlemlendi. Elektroforez kromatogramlarından hesaplanan Rf değerlerinden mezgit ve hamsi solungaçlarından saflaştırılan her iki CA'ın alt birim molekül kütlesi yaklaşık 29 kDa olarak hesaplandı (Şekil 1, Şekil 2). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından izole edilen CA enzimlerinin sırasıyla alt birim molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 29,4 kDa, 28,7 kDa, 30,3 kDa ve 29 kDa olduğu belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Mersin Balığı eritrositi (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011) ve solungacındaki (Dinçer vd., 2016) CA'ının molekül kütlelerinin yaklaşık 29 kDa olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Mezgit solungacından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Solungaç özütü; 4- protein standardı kDa cinsinden).

Figure 1. SDS-PAGE image of obtained proteins from whiting gill (1 and 2- purified CA; 3- Gill extract; 4- protein standard as kDa).



Şekil 2. Hamsi solungacından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü (1 ve 2- saflaştırılmış CA; 3- Saf CA standardı; 4- Solungaç özütü; 5- protein standardı kDa cinsinden).

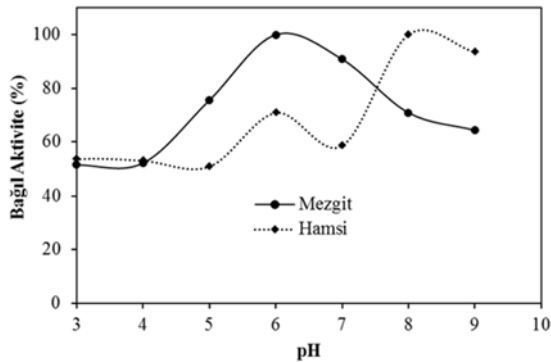
Figure 2. SDS-PAGE image of obtained proteins from anchovy gill (1 and 2- purified CA; 3- Gill extract; 4- protein standard as kDa).

Her iki balığın Solungaç dokularından izole edilen CA'nın esteraz aktivitesini pNFA substratı varlığında en yüksek pH 8,0 ve 40°C' de gösterdiği belirlendi (Şekil 3). Mezgit balığı solungacından saflaştırılan CA' nın p-NFA substratı varlığında yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $1,0 \times 10^7 \mu\text{M dak}^{-1}$ ,  $K_m$  değeri 0,08 mM,  $k_{kat}$   $3,3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{kat}/K_m$   $4,2 \times 10^8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  olarak hesaplandı (Şekil 4, Tablo 3). Hamsi balığı solungacından saflaştırılan CA ile yapılan kinetik çalışması sonucunda  $V_{maks}$  değeri  $2,5 \times 10^6 \mu\text{M dak}^{-1}$ ,  $K_m$  değeri 0,01 mM,  $k_{kat}$   $1,2 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{kat}/K_m$   $12,0 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  olarak hesaplandı (Şekil 5, Tablo 3).

Mersin Balığı eritrositinde saflaştırılan CA esteraz aktivitesine göre pH 9,0' da 30°C sıcaklıkta en yüksek esteraz aktivitesini gösterdiği belirtilmiştir. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  kinetik değerleri p-NFA substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla  $K_m$  4 mM ve  $V_{maks}$  20 000 mM dak<sup>-1</sup>,  $k_{cat}$  değeri  $20,8 \text{ s}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011). Karaca Mersini balığı solungacından saflaştırılan CA'nın en yüksek esteraz aktivitesini pH 6,0' da ve 40°C' de gösterdiği, kinetik çalışmalar sonucunda

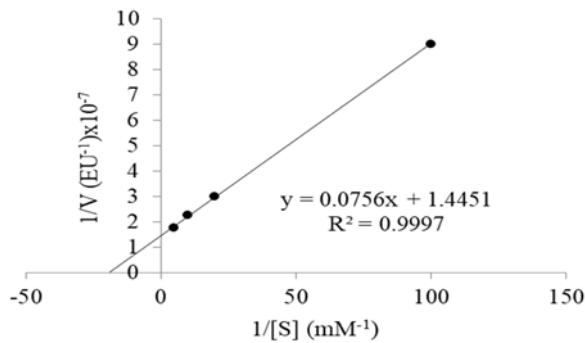
2,5 mM  $K_m$ ,  $5 \times 10^6 \mu\text{M} \text{dak}^{-1}$   $V_{maks}$  ve  $144\,408,6 \text{ s}^{-1}$   $k_{kat}$  değerine sahip olduğu belirtilmiştir (Candan, 2013; Dinçer vd., 2016). Gökkuşluğu alabalık CA esteraz aktivitesi optimal pH karaciğer dokusu için pH 8,5 olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için pH 9,0 olarak bulunduğu ve tüm dokularda  $40^\circ\text{C}$ 'de en yüksek aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-NFA için  $K_m$ ,  $V_{maks}$ ,  $k_{kat}$  ve özgülük sabiti ( $V_0$ ) değerleri belirlenmiştir. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin  $K_m$  değerleri sırasıyla 0,66, 0,40, 1,29 ve 0,92 mM olarak,  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,126, 0,097, 0,173, 0,207  $\mu\text{mol mg protein}^{-1} \text{dak}^{-1}$ ,  $k_{kat}$  değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8, 43,6  $\text{s}^{-1}$  ve özgülük sabitleri sırasıyla  $5 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2,2 \times 10^4$  ve  $4,7 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \text{s}^{-1}$  olarak belirtilmiştir (Söyüt, 2006). Hamsi balığı solungacının CA enzimi mezgit balığı solungacı CA'na göre hidrataz ve esteraz aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Literatürlerde yer alan diğer CA'lara göre iki CA nında oldukça hızlı katalizleme yeteneğinin olduğu görülmektedir.



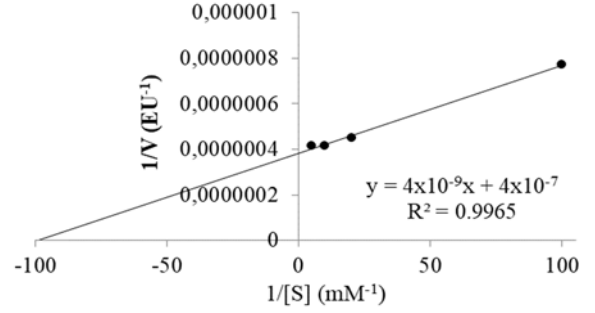
**Şekil 3.** Balıkların solungaçlarından saflaştırılan CA'ların pH ile aktivitelerinin değişimi.

**Figure 3.** Activity changing of CAs purified from the fish gills with pH.



**Şekil 4.** Mezgit solungacından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.

**Figure 4.** Lineweaver-Burk plot of CA purified from whiting gill in the presence of p-NFA substrate.



**Şekil 5.** Hamsi solungacından saflaştırılan CA'nın p-NFA substratı varlığındaki Lineweaver-Burk grafiği.

**Figure 5.** Lineweaver-Burk plot of CA purified from anchovy gill in the presence of p-NFA substrate.

**Tablo 3.** Saflaştırılan CA'ların p-NFA substratı varlığındaki kinetik verileri.

**Table 3.** Kinetic data of purified the CAs in the presence of p-NFA substrate.

Balık Türü	$V_{maks}$ ( $\mu\text{M}/\text{dak}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{kat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{kat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Mezgit	$1,0 \times 10^7$	0,08	$3,3 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
Hamsi	$2,5 \times 10^6$	0,01	$1,2 \times 10^{11}$	$12,0 \times 10^{12}$

CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine CA'nın bilinen inhibitörlerinden asetazolamid ve sülfanilamid etkisi incelendi. Elde edilen inhibisyon grafiklerine göre Mezgit balığı için asetazolamid  $\text{IC}_{50}$  değeri 2,0  $\mu\text{M}$ , sülfonamid için 4,0  $\mu\text{M}$ ; Hamsi balığı için asetazolamid  $\text{IC}_{50}$  değeri 2,0  $\mu\text{M}$ , sülfonamid için 6,0  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Mersin Balığı eritrositinden saflaştırılan CA'nın sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4,0  $\mu\text{M}$  ve 0,1  $\mu\text{M}$  gibi oldukça düşük  $\text{IC}_{50}$  değerlerine (Karahalil, 2009; Kolaylı vd., 2011), solungacından elde edilen CA'nın ise sırasıyla 13,0  $\mu\text{M}$  ve 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerlerine sahip olduğu belirtilmiştir (Dinçer vd., 2016). Her iki balığa ait solungaçlardan izole edilen CA'ların CA'nın bilinen inhibitörlerine karşı oldukça duyarlı olduğu gözlemlendi. İnhibisyon davranışları yönünden her iki balığın solungaçlarından izole edilen karbonik anhidrazların CA-II ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir.

## SONUÇ

Yapılan bu çalışmada mezgit ve hamsi balıklarının yaşama alanlarının denizde farklı olması münasebetiyle solungaçlardan izole edilen CA'ları da davranış olarak farklılık arz ettiği belirlendi. Solungaçlardan elde edilen CA'ların sülfanilamid inhibitörü bağlı sepharose 4B afinite kolonundan birbirlerine yakın saflaştırma katsayısına sahip olmalarına rağmen CA'nın, fizyolojik substratı  $\text{CO}_2$  ve p-NFA karşı ilgilerinin birbirinden farklı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, Her iki enziminde hidrataz ve esteraz aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu, bununla birlikte hamsi CA'sının mezgit CA'sına göre daha hızlı çalıştığı görüldü. Ayrıca enzimin bilinen inhibitörleri olan

sülfanilamid ile asetazolamid karşı her iki CA'nında oldukça duyarlı olduğu tespit edildi.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi destekleriyle gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. & Edsall, J.T. (1966).** Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5137-5145.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (1996).** New method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Science*, **26**(2), 163-166.
- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Özmen, I., Okuroğlu, M.E., Özdemir, H. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (2000).** Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacological Research*, **42**, 187-19.
- Birinci, P. (2017).** *Pelajik ve bentik balıklarının solungaçlarından saflaştırılan karbonikanhidraz aktivitelerinin irdelenmesi*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Rize, Türkiye, 75s.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, B., Çiftçi, M. & Küfrelioğlu, Ö.İ. (2003).** The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **18**(4), 371-375.
- Candan, G. (2013).** *Karaca mersini (Acipenser gueldenstaedtii) solungacından karbonik anhidrazın karakterizasyonu*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Rize, Türkiye, 70s.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. & Spencer, I.M. (2000).** In the carbonic anhydrase new horizons. *Chemistry Medicinal Research Reviews*, **23**, 146-189.
- Dinçer, B., Ekinci, A.P., Akyüz, G. and Kurtoğlu, I.Z. (2016).** Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of russian sturgeon fish (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **31**(6), 1662-1665.
- Hisar, O., Hisar, Ş., Yanık, T. & Aras, M. (2003).** Balık kan karbondioksitinin taşınması ve atılmasında karbonik anhidraz izoenzimlerinin fonksiyonları. *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, **34**(4), 387-393.
- Karahalil, F. (2009).** *Mersin Balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Trabzon, Türkiye, 88s.
- Kaya, E.D. (2011).** *Çipura (Sparus aurata) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, Türkiye, 173s.
- Kaya, E.D., Söyüt, H. & Beydemir, Ş. (2015).** The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **39**(2), 825-832.
- Kolaylı, S., Karahalil, F., Şahin, H., Dinçer, B. & Supuran, C.T. (2011).** Characterization and inhibition studies of an  $\alpha$  carbonic anhydrase from the endangered sturgeon species *Acipenser gueldenstaedtii*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **26**(6), 895-900.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Maren, T.H. (1960).** A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **130**(1), 26-29.
- Özdemir, S., Söyleyici, H., Özdemir Birinci, Z., Özsandıkçı, U. & Büyükdeveci F. (2018).** Karadeniz (Sinop-Samsun) kıyılarında avlanan mezgit (*Merlangius merlangus euxinus*) balığının aylık olarak boy-ağırlık ilişkileri ve boy kompozisyonunun tespiti. *Aquatic Research*, **1**(1), 26-37.
- Pullan, L.M. & Noltmann, E.A. (1985).** Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **839**(2), 147-154.
- Satılmış, H. & Bat, L. (2010).** Planktondaki hamsi. *Yunus Araştırma Bülteni*, **10**(2), 1-3.
- Söyüt, H. (2006).** *Gökkuşluğu alabalık dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin*



- incelenmesi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, Türkiye. 201s.
- Supuran, C.T. (2008).** Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and Activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168-181.
- Supuran, C.T. (2017).** Bortezomib inhibits mammalian carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 64-67.
- Supuran, C.T. & Scozzafava, A. (2001).** Carbonic anhydrase inhibitors, current medicinal chemistry-immunology. *Endocrine & Metabolic Agents*, 1, 61-97.
- Verporte, J.A., Mehta, S.T. & Edsall, J. (1967).** Esterase activities of human carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Wilbur, K. & Anderson, N. (1948).** Elektrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wistrand, P.J. (1981).** The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO<sub>2</sub> by the human erythrocyte., *Acta Physiologica*, 113(4), 417-426.
- Wistrand, P.J. (2002).** Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 107(2), 77-88.
- Zehiroğlu, A.M. (2014).** Hamsi etimolojisi. [www.academia.edu/9331292](http://www.academia.edu/9331292) (12 Eylül 2019).



## Morphometric Aspects and Growth Parameters of the Wedge Clam (*Donax trunculus*) of the Black Sea, Turkey

Mehmet AYDIN\* Evren TUNCA Nurten ESEN ERSOY

Fatsa Faculty of Marine Science, Ordu University, 52400 Turkey

Geliş/Received: 24.10.2019

Kabul/Accepted: 14.01.2020

How to cite: Aydın M., Tunca, E. & Esen Ersoy, N. (2020). Morphometric Aspects and Growth Parameters of the Wedge Clam (*Donax trunculus*) of the Black Sea, Turkey. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 11-18.

Atf yapmak için: Aydın M., Tunca, E. & Esen Ersoy, N. (2020). Karadeniz'deki (Türkiye) kum şırlanının (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) büyüme ve morfometrik parametreleri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 11-18.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0003-1163-6461>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-2842-2411>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-2899-5682>

**\*Corresponding author's:**

Mehmet AYDIN  
Fatsa Faculty of Marine Science, Ordu  
University, 52400 Turkey  
✉: [maydin69@hotmail.com](mailto:maydin69@hotmail.com)  
Mobile telephone : +90 (542) 435 62 80  
Fax : +90 (452) 423 50 53

**Abstract:** *Donax trunculus*, known as wedge clam, is an Atlantic-Mediterranean bivalve colonizing in fine sand beaches of the upper subtidal zone. Aim of this study is to determine the biometric features of wedge clam in sandy beaches, where they live in high-density, and the relationships between these features. The samples were collected for between March 2014-February 2015 from an unexploited population from Black Sea. A total of 11045 samples were collected during this study. The shell length, shell width, shell thickness and shell weight, total weight and meat weight were measured. SL changes between 4.5 and 35.5 mm with an average value of  $18.6 \pm 8.5$  mm. Average TW of the total sampling group was  $1.2 \pm 1.1$  g (0.007-4.64). Relationships between SL and SWe, SWi and SWe, ST and SWe were found as  $SWe=0.0001 SL^{2.9659}$  ( $R^2=0.98$ ),  $SWe=0.0002SWi^{3.3938}$  ( $R^2=0.97$ ) and  $SWe=0.0072ST^{2.6968}$  ( $R^2=0.89$ ), respectively. Average MW of wedge clam was calculated as  $0.2 \pm 0.2$  g (0.001-2.74). The relationships between growth parameters were detailed by cluster analyses (CA), correlation analyses and comparison analyses. Results of this study have an important contribution to the present knowledge on the morphometric aspects and the growth parameters of the wedge clam in the Black Sea.

**Keywords:** *Donax trunculus*, growth, morphometric, shell, length-weight relationships.

## Karadeniz'deki (Türkiye) kum şırlanının (*Donax trunculus* Linnaeus, 1758) büyüme ve morfometrik parametreleri

**Öz:** Kum şırları olarak bilinen, *Donax trunculus*, sıg kıyısız alanlarda kolinize olmuş Atlantik-Akdeniz kökenli bir çift kabuklu türdür. Bu çalışmada, dalga hareketlerinin çok yüksek olduğu kumsal alanlarda yaşayan, kum şırları türünün biyometrik özellikleri ve bu özelliklerin birbiriyle ilişkileri belirlenmiştir. Çalışma, Güney Karadeniz Bölgesi kıyılarında hiç sömürülmemiş kum şırları popülasyonunda 12 ay (Mart 2014-Şubat 2015) boyunca periyodik örnekleme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresi boyunca 11045 adet birey örneklendirilmiştir. Örneklenen bireylerde kabuk boyu, kabuk eni, kabuk kalınlığı, kabuk ağırlığı, toplam ağırlık ve et ağırlığı ölçümleri yapılmıştır. Kabuk boyları 4.5 ve 35.5 mm uzunlukları arasında değişmekte olup ortalama kabuk boyu  $18.6 \pm 8.5$  mm olarak hesaplanmıştır. Toplam ağırlık ortalaması ise  $1.2 \pm 1.1$  g (0.007-4.64) olarak belirlenmiştir. KB-W, KE-W ve KK-W arasındaki ilişki sırasıyla  $W=0.0001 KB^{2.9659}$  ( $R^2=0.98$ ),  $W=0.0002KE^{3.3938}$  ( $R^2=0.97$ ) ve  $W=0.0072KK^{2.6968}$  ( $R^2=0.89$ ) olarak tespit edilmiştir. Ortalama et ağırlığı ise  $0.2 \pm 0.2$  g (0.001-2.74) olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile kum şırlanının Karadeniz Bölgesi'ndeki popülasyonunun büyüme parametreleri ve morfometrik özelliklerinin belirlenmesi açısından önemli katkılar sağlamıştır.

**\*Sorumlu yazar:**

Mehmet AYDIN  
Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Ordu  
Üniversitesi, Ordu/Fatsa 52400, Turkey  
✉: [maydin69@hotmail.com](mailto:maydin69@hotmail.com)  
Cep telefonu : +90 (542) 435 62 80  
Faks : +90 (452) 423 50 53

**Anahtar kelimeler:** *Donax trunculus*, büyüme, morfometri, kabuk, boy-ağırlık ilişkisi.

## INTRODUCTION

Species *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 is widely distributed from Senegal, the north Atlantic Ocean coasts of France (Deval, 2009; Çolakoğlu, 2011) to the Black Sea and the Mediterranean Sea (Bayed & Guillou, 1985; Çolakoğlu, 2014). Özden et al., (2009) reported that it is a commercially important species that is found abundantly in the northern Sea of Marmara. It is known that, the densest populations are formed in sand and tidal zones, especially in high-energetic seas (Gaspar et al., 1999). It feeds on organic material, specially by filtering phytoplankton (Mouëza & Chessel, 1976). This species inhabits depths of 0-2 m in the Mediterranean Sea and 0-6 m in the Atlantic, generally forming stock in depths of 0-3 m (Gaspar et al., 2002a). There are stocks of *D. trunculus* in the coast of Turkey's Mediterranean Sea, Aegean Sea, Sea of Marmara and the Black Sea (Öztürk et al., 2014). Though it is not consumed as a food source in Turkey, it is extensively used for coastal fisheries as bait for pole or longlines. All the production is exported. There are legal legislations on the species in Turkey and it is illegal to harvest between 15<sup>th</sup> April – 31<sup>th</sup> August. Additionally, the minimum harvesting size is 2.5 cm (BSGM, 2016).

There are various studies conducted on wedge clam from the Atlantic Ocean (Bayed & Guillou, 1985; Bayed, 1991, 1998; Guillou & Bayed, 1991) and from the Mediterranean Sea (Mouëza, 1972; Mouëza & Chessel, 1976; Ansell & Bodoy, 1979; Neuberger-Cywiak et al., 1990; Deval, 2009; Hafsaoui et al., 2016).

In this study, some biological and biometric features of *D. trunculus* were examined. There is limited information on the species from Turkey. This study will be a first on the species for the Turkish coast of the southern Black Sea.

## MATERIAL AND METHOD

**Sampling Area:** Research was conducted between March 2014 – February 2015 in supralittoral sandy habitats between 0-1.5 m in depth, where the species is the densest, on the coast of Ordu, Black Sea (Figure 1).

Samples were collected with a hand dredge (1.3 cm mesh size) and sieves (1-10 mm mesh size). Samples were preserved in seawater and were examined the same day. Shell length (SL), shell width (SWi) and shell thickness (ST) of *D. trunculus* were measured with a digital compass with 0.1 mm sensitivity. After these measurements, samples were dried on drying paper and total weight (TW) of the individual was measured with a Precisa sensitive scale with a sensitivity of 0.01 g. Meat weight (MW) and shell weight (SWe) were also measured with the same scale for condition index. Length and weight relationship estimations were done by using Ricker (1975)'s exponential relationship models,

$$TW = a.SL^b \text{ or } \log TW = \log a + b (\log SL)$$

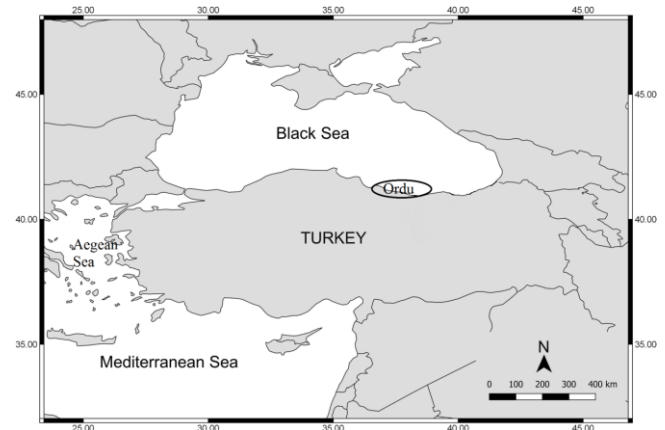


Figure 1. Sampling area.

Where a (intersection point) and b (slope) are regression constants, TW is total body weight (g) and SL is shell length (mm). The “b” value was tested by t-test to check whether it was significantly different from 3. When b = 3, it reflects an isometric growth, when it is b ≠ 3 it reflects an allometric growth (positive b > 3 or negative b < 3) (Froese, 2006; Aydın & Sözer, 2019).

Estimation of SL-SWi, SL-ST and ST- SWi relationships were done using linear relationship models,

$$(SWi = a + b.SL, ST = a + b.SL, ST = a + b.SWi)$$

To estimate the growth rate, SL and TW were used with the following equations:

$$\text{Shell length increase percentage} = [(SL_n - SL_{n-1}) / SL_{n-1}] \times 100,$$

$$\text{Weight increase percentage} = [(TW_n - TW_{n-1}) / TW_{n-1}] \times 100$$

*D. trunculus* condition index (CI) ratio was estimated using TW, MW and SWe (Çolakoğlu & Tokaç, 2011),

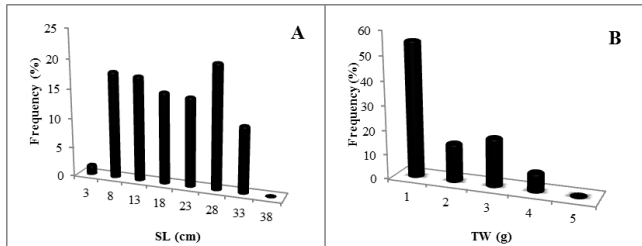
$$CI = MW / (TW - SWe) \times 100$$

SPSS Statistical Package and MS Office-Excel software were used for data analyzes. Distribution of the data was checked, and monthly averages of the data were compared. Due to high sample numbers, Kolmogorov-Smirnov test was chosen amongst the distribution tests and found out that the data showed nonparametric distribution. Nonparametric tests were used to compare monthly averages. To determine if there were differences between months and seasons, Kruskal Wallis test was used, and Mann Whitney-U test was used to determine which months and seasons were different (Aydın et al., 2014). All these tests were conducted within 95 % confidence level on SPSS v.21 (IMB, USA). Correlation analysis were done to evaluate the relationships between parameters. Spearman correlation analysis was chosen because the data were nonparametric. Cluster analysis was used for evaluation of similarities

among variables. Ward method was used with Euclidean Distance, and Z-score correction was also done for cluster analysis (Tunca et al., 2016).

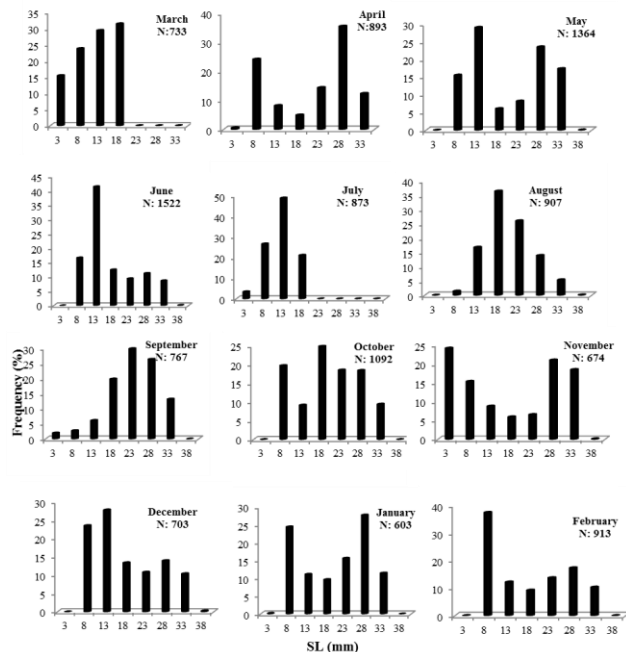
**RESULTS**

**Length and weight frequency distribution:** In total 11045 individuals of *D. trunculus* were sampled and shell lengths ranged between 4.5 and 35.5 mm. The length and weight frequencies of *D. trunculus* are given in Figure 2.



**Figure 2.** *D. trunculus* length frequency (A) weight frequency (B).

**Monthly length frequency distribution:** Monthly length frequencies of the samples are given in Figure 3.



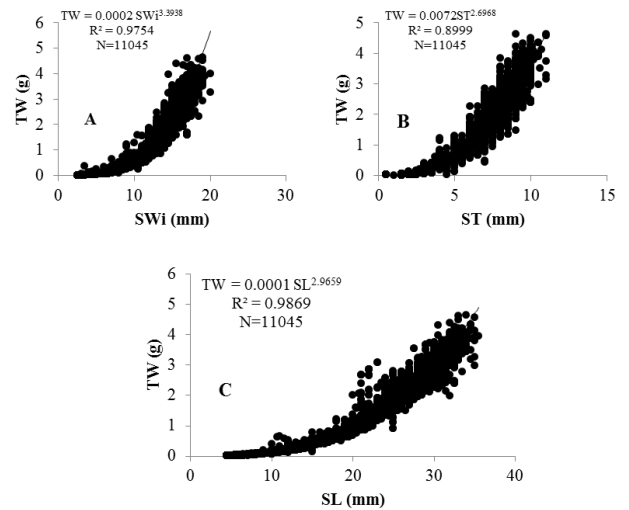
**Figure 3.** Monthly length frequencies.

**Biometric data:** The average shell length was calculated as 18.6±8.5 mm (min: 4.5 - max: 35.5). The average total weight was 1.2±1.1 g (0.007-4.64). Biometric measurements of all the samples are given in Table 1.

**Table1.** *D. trunculus* biometric measurements.

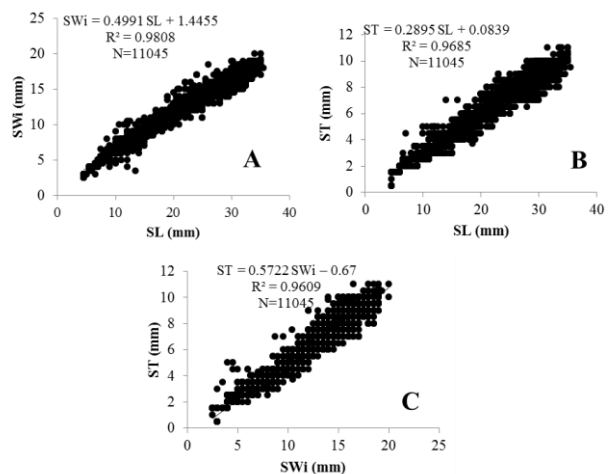
	SL (mm) N:11045	SWi (mm) N:11045	ST (mm) N:11045	TW (g) N:11045	MW (g) N:8092	SW (g) N:6903
Mean	18.6±8.5	10.7±4.3	5.5±2.5	1.2±1.1	0.2±0.2	0.7±0.7
Minimum	4.5	2.5	0.5	0.007	0.001	0.007
Maximum	35.5	20	11	4.64	2.74	2.95

In this study, the relationship between SWi and TW showed positive allometry ( $b>3$ ), and negative allometry between ST and TW, and SL and TW ( $b<3$ ) (Figure 4).



**Figure 4.** Relationships between shell width – total weight (A), shell thickness - total weight (B), shell length – total weight (C).

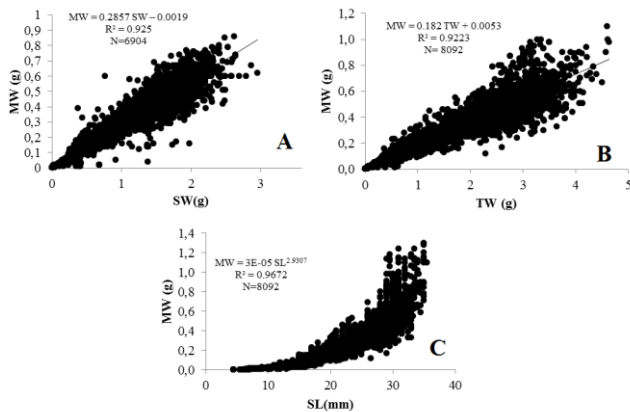
Linear relationships were identified between SL and SWi, SL and ST and SWi and ST for all the *D. trunculus* samples (Figure 5).



**Figure 5.** Relationships between shell length – shell width (A), shell length – shell thickness (B) shell width – shell thickness (C).

Linear relationships were identified between SW and MW and TW and MW. An exponential function was fitted for the relationship between SL and MW (Figure 6).

**Growth Rate:** The growth rate was estimated using SL and TW. The highest growth rate by weight was estimated for the 10-15 mm length group (326.3 %) and the lowest for the 35-40 mm length group (23.1 %). The highest growth by length was estimated for 5-10 mm length group (63.1 %) and the lowest was estimated for 30-35 mm length group (13.0 %) (Table 2).



**Figure 6.** Relationships between shell weight – meat weight (A), total weight – meat weight (B), shell length – meat weight (C)

**Table 2.** Growth performance value of *D. trunculus*.

SL (mm)	N	%	Mean SL (mm)	Mean TW (g)	Increasing in length (%)	Increasing in weight (%)
0-5	191	1.73	4.5 ± 0.01	0.02 ± 0.001	-	-
5-10	2005	18.15	7.3 ± 0.9	0.05 ± 0.02	<b>63.1</b>	160.0
10-15	1957	17.72	11.7 ± 1.5	0.2 ± 0.1	59.9	<b>326.3</b>
15-20	1704	15.43	17.2 ± 1.5	0.6 ± 0.2	46.9	201.5
20-25	1654	14.98	22.1 ± 1.4	1.3 ± 0.3	28.3	116.7
25-30	2292	20.75	27.4 ± 1.4	2.3 ± 0.4	23.8	81.7
30-35	1232	11.16	30.9 ± 1.0	3.1 ± 0.3	<b>13.0</b>	32.5
35-40	10	0.08	35.1 ± 0.2	3.8 ± 0.5	13.4	<b>23.1</b>
<b>Total</b>	<b>11045</b>	<b>100</b>	<b>18.62±8.47</b>	<b>1.17±1.12</b>	<b>35.5</b>	<b>134.5</b>

**Condition Index:** The condition index, that represents the fullness of the soft tissue in the shell cavity of a bivalve mollusk, is expressed as the rate of occupancy using the method of condition index by weight, was calculated by examining 6929 individuals. The highest average value was estimated for May (121.3±18.2) and the lowest was August (42.8±19.82) (Table 3).

**Statistical Analyzes:** The monthly average values of the parameters are given in Table 3.

**Table 3.** Monthly comparison of size parameters and condition index (p <0.05)

	Mar. (A)	Ap. (B)	May (C)	Jun. (D)	Jul. (E)	Aug. (F)	Sep. (G)	Oct. (H)	Nov. (I)	Dec. (J)	Jan. (K)	Feb. (L)	
SL (mm) (N:11045)	Mean	18.79	20.3	19.18	16.04	19.55	19.87	19.05	22.47	17.26	16.55	19.27	16.63
	Min.	4.5	4.5	8	8	6.5	6.5	5.5	4.5	5	4.5	4.5	6.5
	Max.	34	34	35.5	35	35	35	33.5	34.5	35	35	34	34
	S.D.	0.34	0.30	0.24	0.2	0.23	0.18	0.23	0.23	0.42	0.33	0.37	0.3
	Dif.	A <sup>c,f,g,k</sup>	B <sup>c</sup>	C <sup>b,e,g,k</sup>	D <sup>ij</sup>	E <sup>a,c,f,g,k</sup>	F <sup>a,c,k</sup>	G <sup>a,c,e,k</sup>	H	I <sup>d,j,l</sup>	J <sup>d,i,l</sup>	K <sup>a,c,e,f,g</sup>	L <sup>j</sup>
SWi (mm) (N:11045)	Mean	10.80	11.52	11.07	9.63	11.27	11.45	10.96	12.76	9.87	9.56	10.91	9.54
	Min.	2.5	2.5	5.5	5.5	4.2	4.	3.5	3	3	3	2.5	4
	Max.	19	20	19	18.5	19	18.5	18.6	20	19.3	19.3	17.5	19
	S.D.	0.17	0.15	0.12	0.1	0.12	0.09	0.11	0.12	0.22	0.17	0.19	0.16
	Dif.	A <sup>c,f,g,k</sup>	B <sup>c</sup>	C <sup>b,e,f,g</sup>	D <sup>ij</sup>	E <sup>a,c,f,g,k</sup>	F <sup>a,c,e,k</sup>	G <sup>a,c,e,k</sup>	H	I <sup>d,j,l</sup>	J <sup>d,i,l</sup>	K <sup>a,e,f,g</sup>	L <sup>j</sup>
ST (mm) (N:11045)	Mean	5.6	6	5.7	4.8	5.7	5.7	5.52	6.62	4.84	4.83	5.66	5
	Min.	1.5	1.5	2.5	2.5	2	2	1.5	1.5	0.5	1.5	1	2
	Max.	11	10	10	10.5	11	11	10	10.2	11	10.5	10	10
	S.D.	0.09	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.14	0.1	0.11	0.09
	Dif.	A <sup>c,f,g,k</sup>	B <sup>c,k</sup>	C <sup>b,e,f,g</sup>	D <sup>ij,l</sup>	E <sup>a,c,f,g,k</sup>	F <sup>a,c,e,k</sup>	G <sup>a,c,e,k</sup>	H	I <sup>d,j</sup>	J <sup>d,i,l</sup>	K <sup>a,b,e,f,g</sup>	L <sup>d,j</sup>
TW (g) (N:11045)	Mean	1.35	1.53	1.35	0.79	1.14	1.05	1.12	1.5	1.23	0.93	1.27	1
	Min.	0.014	0.014	0.054	0.054	0.061	0.027	0.022	0.01	0.019	0.007	0.007	0.02
	Max.	4.64	4	4.08	4.34	4.62	4.58	3.95	4.22	4.28	3.9	3.77	4.4
	S.D.	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	0.04
	Dif.	A <sup>c,f,g,k</sup>	B <sup>c</sup>	C <sup>b,f,g</sup>	D	E <sup>a,f,g,k</sup>	F <sup>a,c,e,k</sup>	G <sup>a,c,e,k</sup>	H	I <sup>j,l</sup>	J <sup>i,l</sup>	K <sup>a,e,f,g</sup>	L <sup>j</sup>
CI (N:6929)	Mean	59.5	61.9	121.3	73.8	56.2	42.8	55.4	46.1	52.3	51.2	44.9	53.8
	Min.	16.7	12.5	15.6	17.5	16.8	15.4	14.2	8.7	16.3	16.3	13	11.5
	Max.	209.1	191.7	273.9	175.6	224.0	172.7	120.3	206.1	221.4	192.3	133.3	260.0
	S.D.	20.94	23.33	18.2	46.29	22.56	19.82	24.58	17.45	19.66	16.77	19.28	24.80
	Dif.	A <sup>b</sup>	B <sup>a*</sup>	C	D	E <sup>i,j,l</sup>	F	G <sup>i,j</sup>	H <sup>*</sup>	I <sup>e,g,i,l</sup>	J <sup>e,g,i,l</sup>	K <sup>h</sup>	L <sup>s,i,j</sup>

Explanations: A capital and a superscript letters denote comparisons between two months. There is no statistical difference at the level of 95 % between a capital letter and each superscript letter.

Given the morphometric data, statistically significant largest *D. trunculus* values were in October (Table 3). April and May followed October, and the lowest values were in June. In case of condition index, it was different and the highest statistically significance value of condition index was May, while the lowest was August. Seasonal comparison of SL, SWi and ST were as Spring = Autumn > Summer > Winter, and for TW it was as Spring > Autumn > Winter > Summer. Unlike the other parameters, TW was found significant and a statistical difference was found between Spring and Autumn.

In general, high correlation was found for all months and in the total (Table 4). The highest value was found as 1.00 (a hundred percent) in May between TW and SWe. The lowest correlation value was 0.749, between ST

and SWe in June. June is also notable for SWe showing the lowest correlation with other parameters. Another low correlation was observed between MW with other parameters in November. Given the annual comparison, though correlation between MW and SWe values were strong when compared to the correlation between the other parameters, it was found to be relatively weaker.

In case of cluster analyses; there were two different clusters, SL, SWi and ST measurements formed a cluster and BW, SW and MW formed the other (Figure 7). The strongest relation was observed between SL and SWi with 10.29, value of the closest Euclid distance (Table 5). Relatively the furthest distance to other parameters was observed for MW. These results also show parallelism to the annual correlation values.



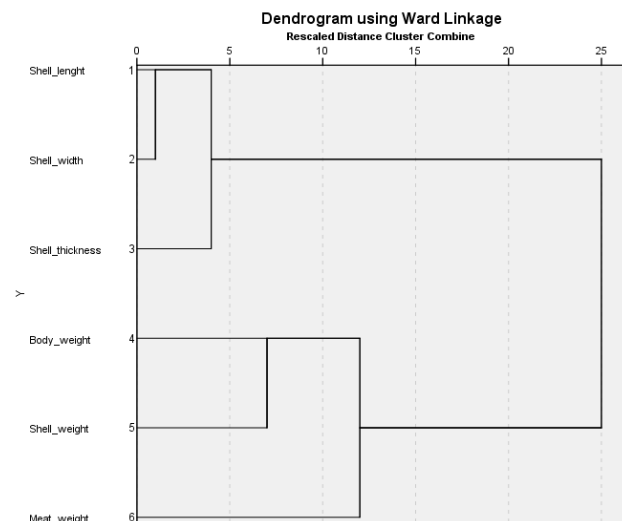
**Table 4.** Correlation between monthly and annual parameters.

March							April							May						
SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW	
SL	1						1							1						
SWi	0.969**	1					0.963**	1						0.985**	1					
ST	0.954**	0.962**	1				0.953**	0.955**	1					0.984**	0.981**	1				
BW	0.977**	0.972**	0.963**	1			0.968**	0.963**	0.965**	1				0.988**	0.983**	0.983**	1			
SWe	0.893**	0.928**	0.949**	0.917**	1		0.903**	0.939**	0.900**	0.899**	1			0.998**	0.998**	0.994**	10.000**	1		
MW	0.980**	0.973**	0.921**	0.967**	0.834**	1	0.987**	0.976**	0.939**	0.954**	0.865**	1		0.960**	0.958**	0.935**	0.960**	0.954**	1	
June							July							August						
SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW	
SL	1						1							1						
SWi	0.969**	1					0.963**	1						0.985**	1					
ST	0.954**	0.962**	1				0.953**	0.955**	1					0.984**	0.981**	1				
BW	0.977**	0.972**	0.963**	1			0.968**	0.963**	0.965**	1				0.988**	0.983**	0.983**	1			
SWe	0.893**	0.928**	0.949**	0.917**	1		0.903**	0.939**	0.900**	0.899**	1			0.998**	0.998**	0.994**	10.000**	1		
MW	0.980**	0.973**	0.921**	0.967**	0.834**	1	0.987**	0.976**	0.939**	0.954**	0.865**	1		0.960**	0.958**	0.935**	0.960**	0.954**	1	
September							October							November						
SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW	
SL	1						1							1						
SWi	0.991**	1					0.980**	1						0.985**	1					
ST	0.985**	0.981**	1				0.963**	0.954**	1					0.983**	0.976**	1				
BW	0.996**	0.991**	0.988**	1			0.993**	0.982**	0.970**	1				0.993**	0.987**	0.987**	1			
SWe	0.997**	0.989**	0.991**	0.998**	1		0.975**	0.967**	0.959**	0.981**	1			0.929**	0.880**	0.882**	0.955**	1		
MW	0.959**	0.952**	0.941**	0.963**	0.974**	1	0.950**	0.939**	0.931**	0.951**	0.961**	1		0.854**	0.821**	0.819**	0.860**	0.869**	1	
December							January							February						
SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW	
SL	1						1							1						
SWi	0.992**	1					0.987**	1						0.994**	1					
ST	0.989**	0.986**	1				0.973**	0.972**	1					0.944**	0.943**	1				
BW	0.998**	0.992**	0.991**	1			0.995**	0.990**	0.977**	1				0.997**	0.996**	0.947**	1			
SWe	0.975**	0.964**	0.953**	0.986**	1		0.984**	0.977**	0.962**	0.991**	1			0.994**	0.993**	0.925**	0.998**	1		
MW	0.934**	0.919**	0.910**	0.939**	0.945**	1	0.958**	0.955**	0.933**	0.964**	0.960**	1		0.986**	0.985**	0.910**	0.988**	0.989**	1	
Annual																				
SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW		SL	SWi	ST	BW	SWe	MW	
SL	1						1							1						
SWi	0.990**	1					0.987**	1						0.994**	1					
ST	0.984**	0.981**	1				0.963**	0.954**	1					0.983**	0.976**	1				
BW	0.992**	0.988**	0.984**	1			0.993**	0.982**	0.970**	1				0.993**	0.987**	0.987**	1			
SWe	0.973**	0.970**	0.965**	0.974**	1		0.984**	0.977**	0.962**	0.991**	1			0.994**	0.993**	0.925**	0.998**	1		
MW	0.978**	0.975**	0.968**	0.980**	0.969**	1	0.958**	0.955**	0.933**	0.964**	0.960**	1		0.986**	0.985**	0.910**	0.988**	0.989**	1	

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Table 5.** Cluster analyses matrix of measured parameters.

	Shell length (SL)	Shell width (SWi)	Shell thickness (ST)	Total weight (TW)	Shell weight (SW)	Meat weight (MW)
Shell length	0.000					
Shell width	10.288	0.000				
Shell thickness	13.629	16.125	0.000			
Total weight	25.084	29.429	24.672	0.000		
Shell weight	31.969	35.074	31.556	22.098	0.000	
Meat weight	33.582	36.473	33.598	25.838	30.842	0.000



**Figure 7.** Cluster analyses dendrogram of the measured data.

**DISCUSSION**

Total of 11045 individuals of *D. trunculus* were measured. In other studies, conducted on *D. trunculus*, number of examined individuals were 995 individuals from

Black Sea by Yılmaz (2005), and from Sea of Marmara; 4624 individuals by Çolakoğlu (2011), 3428 individuals by Çolakoğlu and Tokaç (2011), 2098 individuals by Deval (2009) and 2558 individuals by Çolakoğlu (2014). Among the number of individuals examined in Turkey. This study is the highest and study by Deval (2009) second.

The shell length of *D. trunculus* individuals were found between 4.5-35.5 mm in this study, where it was conducted on sandy habitats of the coastal areas of Ordu in Black Sea. The average shell length was estimated as 18.6±8.5 mm. According to the study by Yılmaz (2005) conducted at Şile coasts of west Black Sea, the smallest individual was measured to be 11.6 mm and the largest 43.1 mm. Çolakoğlu & Tokaç (2011) estimated the average length 28.7 mm, and the length range as 13 - 42 mm for Sea of Marmara. Another study, from northern Sea of Marmara by Deval (2009) found the length range was between 3-44.8 mm (L<sub>average</sub>= 24.7 mm). Çolakoğlu (2014) reported the length range to be between 10-42 mm. The other studies from other seas reported the highest estimated length (L<sub>∞</sub>) as 52.84 mm by Mazé & Laborda (1988) from Atlantic Ocean coasts, and the lowest estimated length (L<sub>∞</sub>) as 35.9 mm by Bodoy (1982) from the Mediterranean Sea. In another study from the Spanish coasts the length range was found between 5 – 45 mm (Huz et al., 2002), and in the studies from the coasts of southern Portugal the length range was found between 8.9-44.3 mm (L<sub>average</sub>= 26.5 mm) and 16-44 mm (L<sub>average</sub>= 27.3 mm) (Gaspar et al. 2002a), and the maximum length as 31 mm (Gaspar et al., 2003). In a study conducted in the southern Adriatic coasts of

Italy, the maximum length was reported as 37 mm (Zeichen et al., 2002). The maximum length values were found in this study therefore, it can be said that, they are similar, when compared with “ $L_{\infty}$ ” values reported from Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Though when compared with studies conducted in Sea of Marmara, the individuals from Sea of Marmara seem to be larger than the population from the Black Sea. In both studies from Sea of Marmara, the average length and maximum length were reported to be larger. This difference is due to using different sampling gears. In this study, due to a different sampling gear, smaller individuals were sampled which resulted in smaller average length. Especially in Turkey, the study conducted in Sea of Marmara indicated that individuals in Sea of Marmara are larger from the individuals in Black Sea. It can be said that the main reasons for this difference are environmental variables such as salinity, temperature, oxygen and the difference in sampling depth and gear.

The highest growth rate in length was found in 5-10 mm length group. Neuberger-Cywiak et al., (1990) found similar results and reported the highest growth rate at the first 2.5 months, and Hafsaoui et al., (2016) reported the highest growth rate within the first year. Individuals within the length group 25-30 mm constitutes 20.75 % of overall samples. The ratio of the individual identified as juveniles (< 15 mm) corresponds to 40.9 % of the overall sample. The length at maturity was identified from Algeria by Moueza & Frenkiel-Renault (1973) as 16 mm, from Spain by Tirado & Salas (1998) as 13.3, from Portugal by Gaspar et al., (1999) as 13 mm, from Italy by Zeichen et al., (2002) as 18 mm and from Şile Black Sea coast of Istanbul by Yilmazer (2005) as 18.9 mm. The length group within this study, which had the highest number of individuals (25-30 mm), was found to be higher from the reported length at maturity from other studies. Çolakoğlu (2011) reported the weight range between 0.26 – 17.22 g and the average weight as 3.04 g. In this study, the average weight was found to be  $1.2 \pm 1.1$  g (0.007 – 4.64 g). There is a notable difference between Çolakoğlu (2011) and this study. This difference is due to difference in sampling gears. Since metal sieves were used in this study, the number of small sized individual was very high. A 33.5 % of the total sampling of this study (3684 individuals) is lower than the smallest individual reported by Çolakoğlu (2011) (0.26 g).

Additionally, Çolakoğlu (2011) reported the relationships between SL and TW as  $TW = 0.153 SL^{2.73}$  ( $R^2 = 0.95$ ), between ST and TW as  $TW = 0.667 ST^{2.68}$  ( $R^2 = 0.93$ ), and between SWi and TW as  $TW = 3.12 SWi^{2.30}$  ( $R^2 = 0.86$ ). In this study the relationships were estimated between SL and TW as  $TW = 0.0001 SL^{2.96}$  ( $R^2 = 0.9659$ ), between ST and TW as  $TW = 0.0072 ST^{2.6968}$  ( $R^2 = 0.8999$ ), and between SWi and TW as  $TW = 0.0002 SWi^{3.3938}$  ( $R^2 =$

0.9754). In both studies, except for the relationships between SWi-TW, all showed negative allometry.

The “b” value of the relationship between SL and MW was estimated as 2.9659 ( $b < 3$ ). The other studies from various areas on this species also reported the “b” value  $b < 3$  and growth as negative allometry (Guillou, 1980; Bayed, 1990; Mazé & Laborda, 1990; Deval, 2009; Çolakoğlu, 2011; Çolakoğlu & Tokaç, 2011; Çolakoğlu, 2014). The studies reported as the “b” value changing between 2.5-3.5 and value being smaller than 3 indicate negative allometry (Ricker, 1975; Çolakoğlu, 2011).

In this study, a strong linear relation was observed between SL and SWi ( $SWi = 0.4991 SL + 1.4455$ ,  $R^2 = 0.98$ ). Çolakoğlu (2011) reported the relationship between SWi and SL as  $SWi = 0.556 SL + 0.0962$  ( $R^2 = 0.87$ ). The study conducted at the coasts of Portugal reported the relationship between length and width as  $\text{Log } SWi = -0.067 + 0.888 \text{ Log } SL$  ( $R^2 = 0.934$ ) (Gaspar et al. 2002b). When all these studies are compared, the strongest relationship between SL and SWi was from this study. It is known that the difference in regression constants can be the result of difference in environmental factors effecting the species growth (Parsons et al., 1990).

Çolakoğlu (2011) reported an exponential relationship between SWi and SL ( $SWi = 0.658 SL^{0.965}$  ( $R^2 = 0.918$ )). In this study, the regression coefficient was found as  $R^2 = 0.98$  and can be said that the linear relationship between SWi and SL is stronger.

Çolakoğlu (2011) reported the condition index of *D. trunculus* the highest in April (95.6) in the Marmara Sea, and the lowest in July (53.9). However, Deval (2009) study from the northern Sea of Marmara reported that the condition index starts to increase in February, reaching its highest in May and lowest in August. In this study, the estimated condition index of *D. trunculus* was maximum in May ( $121.3 \pm 18.2$ ), and minimum in August ( $42.8 \pm 19.82$ ). The results showed similarity with Deval (2009) study. Since the reproduction season showed parallelism with the period of maximum condition index value, it can be said that the reproduction season is between May and August. The studies conducted in other areas also reported that the reproduction season is between May and August (Bayed, 1990; Gaspar et al., 1999; Zeichen et al., 2002). Similarly, the study conducted on Şile coasts of Black Sea reported the reproduction season between May and August (Yilmazer, 2005). Studies from other areas reported that the reproduction period is in spring and summer seasons (Zeichen et al., 2002; Deval, 2009), and the low growth period is the result of low condition values of the reproduction period.

Results of this study have an important contribution to the present knowledge on the morphometric aspects and the growth parameters of the wedge clam in the

southern Black Sea region. Additionally, this study shows importance as being the first study conducted from the southern Black Sea.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ordu University Scientific Research Coordination Unit with the project No. TF-1606

#### REFERENCES

- Ansell, A.D. & Bodoy, A. (1979).** Comparison of events in the seasonal cycle for *Donax vittatus* and *D. trunculus*. In: *Cyclic phenomena in marine plants and animals, Proceedings of the 13th European Marine Biology Symposium*. Naylor, E, Hartno, R.G. (Eds). Pergamon Press, Oxford, New York, 191-198.
- Aydın, M., Karadurmuş, U. & Tunca, E. (2014).** Biological characteristics of *Pachygrapsus marmoratus* in the southern Black Sea (Turkey). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **94**, 1441-1449. DOI: [10.1017/S0025315414000253](https://doi.org/10.1017/S0025315414000253).
- Aydın, M. & Sözer, A. (2019).** The Length-weight relationship and condition factor of striped sea bream *Lithognathus mormyrus* (L., 1758) in the southern Black Sea Region. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*. DOI: [10.35229/jaes.565282](https://doi.org/10.35229/jaes.565282).
- Bayed, A. & Guillou, J. (1985).** Contribution à l'étude des populations du genre *Donax*: la population de *D. trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdiya (Maroc), *Annales de l'Institut Océanographique*, **61**(2), 139-147.
- Bayed, A. (1990).** Reproduction de *Donax trunculus* sur la cote Atlantique marocaine. *Cah Biol Mar*, **31**, 159-170.
- Bayed, A. (1991).** *Étude écologique des écosystèmes de plages de sable fin de la côte atlantique marocaine: Modèles de zonation, Biotypologie, Dynamique de populations*. PhD. Thesis. University of Mohammed V, Rabat. 229pp.
- Bayed, A. (1998).** Variabilité de la croissance de *Donax trunculus* sur le littoral marocain. *CIHEAM-Options méditerranéennes*, **35**, 11-23.
- Bodoy, A. (1982).** Croissance saisonnière du bivalve *Donax trunculus* L. en Méditerranée nord-occidentale (France). *Malacologia*, **22**(1-2), 353-358.
- BSGM, (2016).** Fisheries statistics, Web:<http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagM enuVeriler/BSGM.pdf>
- Çolakoğlu, S. (2011).** *Çanakkale Boğazı ile Batı Marmara'da kum midyesi (Chamelea gallina, L., 1758) ve kum şırlanının (Donax trunculus, L., 1758) stok tahmini*. PhD thesis, Ege University, Institute of sciences, 120s. (In Turkish)
- Çolakoğlu, S. & Tokaç, A. (2011).** Some population parameters of the wedge clam (*Donax trunculus* L., 1758) in the west Marmara Sea. *EgeJFAS*, **28**(2), 65-70.
- Çolakoğlu, S. (2014).** Population structure, growth and production of the wedge clam *Donax trunculus* (Bivalvia, Donacidae) in the West Marmara Sea, Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **14**, 221-230. DOI: [10.4194/1303-2712-v14\\_1\\_24](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_24).
- Deval, M.C. (2009).** Growth and reproduction of the wedge clam (*Donax trunculus*) in the Sea of Marmara, Turkey. *Journal Applied Ichthyology*, **25**(5), 551-558. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2009.01258.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01258.x).
- Froese, R. (2006).** Cube Law, Condition Factor and Weight–Length Relationships: History, Meta-Analysis and Recommendations. *Journal Applied Ichthyology*, **22**(4), 241-253. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x).
- Gaspar, M.B., Ferreira, R. & Monteiro, C.C. (1999).** Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fish Res.*, **41**(3), 309-316. DOI: [10.1016/S0165-7836\(99\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00017-X).
- Gaspar, M.B., Chicharo, L.M., Vasconcelos, P., Garcia, A., Santos, A.R. & Monteiro, C.C. (2002a).** Depth segregation phenomenon in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) populations of the Algarve coast (southern Portugal). *Scientia Marina* **66**(2), 111-121. DOI: [10.3989/scimar.2002.66n2111](https://doi.org/10.3989/scimar.2002.66n2111).
- Gaspar, M.B., Santos, M.N., Vasconcelos, P. & Monteiro, C.C. (2002b).** Shell morphometric relationships of the most common bivalve species (Mollusca: Bivalvia) of the Algarve coast (southern Portugal). *Hydrobiologia*, **477**, 73-80. DOI: [10.1023/A:1021009031717](https://doi.org/10.1023/A:1021009031717).
- Gaspar, M.B., Santos, M.N., Leitão, F., Chicharo, L., Chicharo, A. & Monteiro, C.C. (2003).** Recovery of substrates and macro-benthos after fishing trials with a new Portuguese clam dredge. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **83**, 713-717. DOI: [10.1017/S0025315403007690h](https://doi.org/10.1017/S0025315403007690h).

- Guillou, J. (1980).** *Les peuplements de sables fins du littoral nord-Gascogne*. PhD. Thesis. University of Bretagne occidentale. 209 pp.
- Guillou, J. & Bayed, A. (1991).** Contraintes du milieu sur les populations de *Donax trunculus* L. et *Donax venustus* Poli, du littoral atlantique marocain. *Oceanol Acta* **14**(3), 291-298.
- Hafsaoui, I., Draredja, B., Lasota, R., Como, S. & Magni, P. (2016).** Population dynamics and secondary production of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the Gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Mediterranean Marine Science*, **17**(3), 738-750. DOI: [10.12681/mms.1760](https://doi.org/10.12681/mms.1760).
- Huz, R., Lastra, M. & López, J. (2002).** The influence of sediment grain size on burrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae). *Journal of Sea Research*, **47**, 85-95. DOI: [10.1016/S1385-1101\(02\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(02)00108-9).
- Mazé, R. & Laborda, A.J. (1988).** Aspectos de la dinámica de población de *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Donacidae) en la ría de el Barquero (Lugo, NO España). *Investment Pesquera*, **52**, 299-312.
- Mazé, R.A. & Laborda, A.J. (1990).** Cambios estacionales de una población de *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Pelecypoda: Donacidae) en la ría de El Barquero (Lugo, NO. De Espana). *Scientia Marina*, **54**(2), 131-138.
- Mouëza, M. (1972).** Contribution a l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque, Lamellibranche), dans l'Algérois: écologie en baie de Bou-Ismael. *Tethys*, **4**, 745-756.
- Mouëza, M. & Frenkiel-Renault, L. (1973).** Contribution a l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusques:Lamellibranches) dans l'Algérois: la reproduction. *Cahiers de Biologie Marine*, **14**, 261-283.
- Mouëza, M. & Chessel, D. (1976).** Contribution à l'étude de la biologie de *Donax trunculus* L. (Mollusque Lamellibranche) dans l'Algérois: analyse statistique de la dispersion le long d'une plage en baie de Bou-Ismaïl. *Journal of Experiment at Marine Biology and Ecology*, **21**, 211-221. DOI: [10.1016/0022-0981\(76\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90116-7).
- Neuberger-Cywiak, L., Achituv, Y. & Mizrahi, L. (1990).** The ecology of *Donax trunculus* Linnaeus and *Donax semistriatus* Poli from the Mediterranean coast of Israel. *Journal of Experiment at Marine Biology and Ecology*, **134**(3), 203-220. DOI: [10.1016/0022-0981\(89\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90070-1).
- Özden, Ö., Erkan, N. & Ulusoy, S. (2009).** Seasonal variations in the macronutrient mineral and proximate composition of two clams (*Chamelea gallina* and *Donax trunculus*). *Journal International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **60**(5), 402-12. DOI: [10.1080/09637480701772945](https://doi.org/10.1080/09637480701772945).
- Öztürk, B., Doğan, A., Bakır, B.B. & Salman, A. (2014).** Marine molluscs of the Turkish coasts: an updated checklist. *Turkish Journal Zoology*, **38**(6), 832-879. DOI: [10.3906/zoo-1405-78](https://doi.org/10.3906/zoo-1405-78).
- Parsons, T.R., Takahashi, M. & Hargrave, B. (1990).** *Biological oceanographic processes*. Third edition, Pergamon press, Great Britain, 330p.
- Ricker, W.E. (1975).** Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **191**, 382.
- Tirado, C. & Salas, C. (1998).** Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L. 1758 (bivalvia: Donacidae) in the littoral of Malaga (Southern Spain). *Journal of Shellfish Research*, **17**, 169-176.
- Tunca, E., Aydın, M. & Şahin, Ü.A. (2016).** Interactions and accumulation differences of metal(loid)s in three sea cucumber species collected from the Northern Mediterranean Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 21020-21031. DOI: [10.1007/s11356-016-7288-7](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7288-7).
- Yilmazer, N. (2005).** *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) *ovarymunun morfolojisi ve oogenezinin ince yapısı*. Istanbul University. Institute of sciences. PhD thesis. 116p (in Turkish).
- Zeichen, M.M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A. & Ardizzone, G.D. (2002).** Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **54**, 971-982. DOI: [10.1006/ecss.2001.0868](https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0868).



## The Effects of Ecological Factors on Some Characteristic of Fruits in *Vaccinium arctostaphylos* L. Populations in The Firtına Valley<sup>[\*],[\*\*]</sup>

Filiz YÜKSEK\*

Directorate of Eastern Black Sea Forestry Research Institute, General Directorate of Forestry, 61040, Trabzon/Turkey.

Geliş/Received: 27.10.2019

Kabul/Accepted: 22.01.2020

How to cite: Yüksek F. (2020). The Effects of Ecological Factors on Some Characteristic of Fruits in *Vaccinium arctostaphylos* L. Populations in The Firtına Valley. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 19-24.  
Atıf yapmak için: Yüksek F. (2020). Firtına Vadisi'ndeki *Vaccinium arctostaphylos* L. Populasyonlarında Ekolojik Faktörlerin Meyvelerin Bazı Özelliklerine Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 19-24.

\* <https://orcid.org/0000-0003-3275-642X>

**\*Corresponding author's:**

Filiz YÜKSEK  
Directorate of Eastern Black Sea Forestry  
Research Institute, General Directorate of  
Forestry, 61040, Trabzon/Turkey  
✉: [filiz6153@gmail.com](mailto:filiz6153@gmail.com)

**Abstract:** In this study, it was aimed to determine the effect of environmental factors such as altitude, geological formation and canopy cover on certain properties of fruit in the whortleberry populations in the Firtına Valley. For this purpose, total 30 sampling plots with three replicates were taken in three different level of altitude (1000-1200 m, 1300-1500 m, 1800-1900 m. a.s.l.), in two different geological formations (Kaçkar Granitoyidi and Çatak) and in two different canopy covers (0% and 40-60%). Three sampling parcels were chosen for sampling in each of sampling plots. Fruit characteristics such as width, height, weight, dry matter amount of fruit were measured in fruit samples collected from sampling plots. As well as the time to start the ripening of the fruit was determined. Obtained results showed that fruit width varied between 4.04 and 12.91 mm, fruit length ranged from 4.94 to 13.92 mm, the 100 berry weight varied between 24.61 and 87.05 g, and the total dry matter amount varied between 10.14% and 17.35%. It was determined that ecological factors, especially altitude, significantly changed fruit characteristics. Fruit width, fruit height and 100 berry weight showed irregular change with increasing altitude. It was observed that the canopy cover negatively affected the properties of the fruit. Pomologically, the best fruit characteristics in the populations were found on the Çatak geological formation in the second elevation level (1300-1500 m a.s.l.). The wild Caucasian whortleberry populations in the second elevation level should be selected as one of the genetic resource conservation areas in the valley. Furthermore this population may have promising genotypes that contribute to plant breeding programs.

**Keywords:** Altitude, canopy, Firtına valley, fruit traits, geological formation, *Vaccinium arctostaphylos*.

## Firtına Vadisi'ndeki *Vaccinium arctostaphylos* L. Populasyonlarında Ekolojik Faktörlerin Meyvelerin Bazı Özelliklerine Etkisi

**Öz:** Bu çalışmada; Firtına vadisi'ndeki ayı üzümü populasyonlarında rakım, jeolojik formasyon ve kapalılık gibi çevresel faktörlerin meyvenin bazı özellikleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, üç farklı yükselti kademesinde (1000-1200 m, 1300-1500 m, 1800-1900 m), iki farklı jeolojik formasyonda (Kaçkar Granitoyidi ve Çatak) ve iki farklı meşçere kapalılığında (% 0 ve % 40-60) üç tekrarlı olmak üzere toplam otuz adet deneme alanı alınmıştır. Her bir deneme alanında örnekleme için üç alt parsel seçilmiştir. Deneme alanlarından toplanan meyve örnekleri üzerinde; meyvenin genişliği, boyu, ağırlığı, kuru madde miktarı gibi meyve özellikleri ölçülmüştür. Ayrıca meyvelerin olgunlaşmaya başlama zamanı da belirlenmiştir. Araştırma sonucunda; meyve genişliğinin 4.04 ila 12.91 mm, meyve uzunluğunun 4.94 ila 13.92 mm arasında, 100 meyve ağırlığının 24.61 ile 87.05 g arasında ve toplam kuru madde miktarının % 10.14 ile % 17.35 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ekolojik faktörlerin, özellikle de yükseltinin, meyve özelliklerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirdiği tespit edilmiştir. Yükselti arttıkça, meyve genişliği, meyve boyu ve 100 meyve ağırlığı değerlerindeki değişimin düzensiz olduğu görülmüştür. Ayrıca, meşçere kapalılığının meyvenin özelliklerini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Pomolojik olarak, populasyonlardaki en iyi meyve özellikleri, Çatak jeolojik formasyonunun ikinci yükselti kademesinde (1300-1500 m) bulunmuştur. İkinci rakımdaki bu doğal ayı üzümü populasyonları, vadideki genetik kaynak koruma alanlarından biri olarak seçilebilir. Ayrıca, bu populasyon bitki yetiştirme programlarına katkıda bulunabilecek umut verici genotiplere sahip olabilir.

**\*Sorumlu yazar:**

Filiz YÜKSEK  
Directorate of Eastern Black Sea Forestry  
Research Institute, General Directorate of  
Forestry, 61040, Trabzon/Turkey  
✉: [filiz6153@gmail.com](mailto:filiz6153@gmail.com)

**Anahtar kelimeler:** Firtına vadisi, jeolojik formasyon, kapalılık, meyve özellikleri, *Vaccinium arctostaphylos*, yükselti.

[\*], [\*\*] This study was prepared by adapting a part of the PhD Thesis titled "The Investigations on Effect of Some Ecological Factors on Plant and Fruit Properties in Whortleberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.)" Populations Naturally Growing in Firtına River Basin.

[\*\*] Abstract of this paper was published in Abstract Book of International Forestry & Environment Symposium (IFES) 2017.



## INTRODUCTION

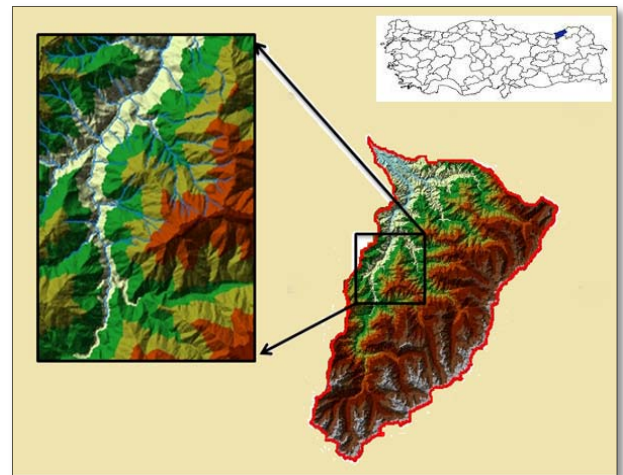
Non-timber forest products (NTFP) have been harvested by human populations for subsistence use and trade over thousands of years. The harvest of wild non-timber forest products (NTFP) represents an important source of income to millions of people worldwide (Ticktin, 2004). While until 1990, the wood raw material was considered the most important forest product in Turkey, in recent years, awareness and demand towards non-wood forest products are increasing (Fidan et al., 2013) and especially the use and trade of natural products is increasing (Yaldız et al., 2010a). Also, these products contribute significantly to the increase of local peoples income (Yaldız et al., 2010b). So it is suggested to increase the studies on medicinal aromatic species in sustainable rural development and alleviating poverty (Yüksek et al., 2017). Thus, researches on new species that would provide non-wood raw materials from forest have been increased. *Vaccinium arctostaphylos* L. which is the member of Ericaceae family is a deciduous shrub that has been newly discovered as medical and aromatic plant. It grows under forest canopy and in gaps, spreads from the seaside up to 1830 meters above sea level in fir, spruce, and beech stands in the Black Sea Region (Davis, 1978; Kayacık 1981; Anşın & Özkan, 2006). Many studies have been reported about its medical and aromatic value (Ayaz et al., 2001; Hasanloo et al., 2011; Ayaz et al., 2005; Koca & Karadeniz, 2009; Navar & Amin, 2004; Sedaghatoor et al., 2006). However, investigation on adaptation, propagation, and harvesting techniques in *Vaccinium arctostaphylos* are insufficient. In order to be successful in the researches conducted in this regard, the information about the performance of the plant in its natural habitat should be taken into consideration. Because, the quantity and quality of the plant are not only related with the genetic characteristics but also related with the environmental factors (Close & McArthur, 2002; Jakola et al., 2004; Latti et al., 2008; Zhu et al., 2010; Körner, 2007). Therefore, it is very important to know the changing characteristics of the plant against the different ecological factors in determining the direction and severity of the interventions for various purposes. Effective harvesting and production techniques can be developed by using this information. Despite the importance of phenotypic plasticity in fruit traits such as fruit mass being widely recognized, remarkably little is known about the environmental factors that affect fruit characteristics in the case of wild fruits (Pato & Obes, 2012).

Main goal of the the study is to determine the effect of environmental factors such as altitude, geological formation and canopy cover on some fruit characteristics of the whorthleberry populations in the Firtina valley.

## MATERIAL AND METHOD

The study area is located in Çamlıhemşin Province (40°58'11"N -40 59'40"E and 41° 00' 42"N-40°57'05"E) in eastern Blacksea region in Turkey (Figure 1). Climate of study area is sub-oceanic. The mean annual temperature is 6°C and the total mean annual precipitation is 2745 mm (Yüksek, 2013). The study area is usually covered with snow from December through May or June. Geologically, experimental sites are defined as Çatak and Kaçkar Granitoyidi geologic formations (Güner, 1983; Gedik et al., 1992; Okay & Şahintürk, 1997; Yalçınlar, 1952). The vegetation in the study area is dominated by pure *Picea orientalis* L. stands and mixed *Picea orientalis* L. *Fagus orientalist* Lipsky stands. The canopy layer was dominated by *Picea orientalis* L. in sampling plots.

The most common understory species were *Vaccinium arctostaphylos* L., *Rhododendron ponticum* L., *Rhododendron luteum* Sweet, *Sorbus aucuparia* L., *Ilex aquifolium* L., *Laurocerasus officinalis* Roemer, *Campanula* sp., *Epigaea* sp., *Carex* sp., *Hypericum* sp (Yüksek, 2013).



**Figure 1.** Study area (Yüksek, 2013).

In order to determine possible differences in berry traits, 30 sampling plots in total with three replicates were taken in three different altitude levels (1000-1200 m, 1300-1500 m, 1800-1900 m. a.s.l.), in two different geological formations (Kaçkar Granitoyidi and Çatak) and in two different canopy covers (0% and 40-60%). All sampling plots were similar as topographic factors (e.g. slope, hillside and aspect). Three sub-sampling parcels were randomly chosen in each sampling plots for obtaining data. After ripening the fruits, mature berries were harvested from sampling plots. Width, length, weight, and dry matter amount of berry were determined in laboratory. Fruit weight was measured by using a digital balance with a sensivity of 0.001 g. The length and width of berries were measured by using a digital calliper with a sensivity of 0.01 mm. The

amount of dry matter of the fruits was determined as % by weight loss (Yamankaradeniz, 1982; Günay, 2009). Statistical analysis of the data was carried out using SPSS for Windows version 15.0. Three-way (factorial) ANOVA test was used to determine the effect of altitudes, geological formations and canopy cover on berry characteristics. Duncan tests were used to separate the averages of the

dependent variables (berry characteristics) which were significantly affected by factors.

## RESULTS

The mean widths of berries harvested from sample plots were given in Table 1.

**Table 1.** Some properties of berries harvested from sample plots.

Mean width of berry (mm)		N	Mean	Min.	Max.	Stan. Dev.
Canopy Cover (%)	0	2250	9.18 <sup>a</sup>	4.45	12.91	±1.233
	40-60	1350	7.01 <sup>b</sup>	4.04	10.63	±1.324
Geological Formation	Kaçkar Granitoyidi	1440	7.79 <sup>b</sup>	4.04	12.91	±1.707
	Çatak	2160	8.76 <sup>a</sup>	5.04	12.50	±1.485
Altitude Group (m)	I. (1000-1200)	1440	8.03 <sup>c</sup>	4.04	12.30	±1.870
	II. (1300-1500)	1440	8.64 <sup>a</sup>	4.06	12.91	±1.495
	III. (1800-1900)	720	8.50 <sup>b</sup>	5.97	12.50	±1.306
Mean length of berry (mm)		N	Mean	Min.	Max.	Stan. Dev.
Canopy Cover (%)	0	2250	9.90 <sup>a</sup>	6.50	13.92	±1.31
	40-60	1350	7.46 <sup>b</sup>	4.94	12.94	±1.22
Geological Formation	Kaçkar Granitoyidi	1440	8.93 <sup>b</sup>	5.24	13.92	±1.82
	Çatak	2160	9.02 <sup>a</sup>	4.94	13.45	±1.69
Altitude Group (m)	I. (1000-1200)	1440	8.76 <sup>b</sup>	4.94	13.50	±1.87
	II. (1300-1500)	1440	9.15 <sup>a</sup>	5.24	13.92	±1.64
	III. (1800-1900)	720	8.91 <sup>a</sup>	5.83	13.45	±1.57
Mean weight 100 berry (g)		N	Mean	Min.	Max.	Stan. Dev.
Canopy Cover (%)	0	450	56.43 <sup>a</sup>	31.70	87.05	±10.054
	40-60	225	43.29 <sup>b</sup>	24.61	69.23	±8.068
Geological Formation	Kaçkar Granitoyidi	270	51.42 <sup>a</sup>	24.61	87.05	±11.425
	Çatak	405	53.81 <sup>a</sup>	26.63	80.36	±11.201
Altitude Group (m)	I. (1000-1200)	270	50.67 <sup>b</sup>	28.68	87.05	±10.696
	II. (1300-1500)	270	53.43 <sup>a</sup>	24.61	77.36	±11.708
	III. (1800-1900)	135	52.07 <sup>a</sup>	26.63	76.25	±11.327
Total dry matter (%)		N	Mean	Min.	Max.	Stan. Dev.
CanopyCover (%)	0	450	13.32 <sup>a</sup>	10.14	17.35	±1.73
	40-60	225	13.09 <sup>a</sup>	10.21	17.13	±1.66
Geological Formation	Kaçkar Granitoyidi	270	13.43 <sup>a</sup>	10.23	17.18	±1.70
	Çatak	405	13.13 <sup>a</sup>	10.14	17.35	±1.70
Altitude Group (m)	I. (1000-1200)	270	13.42 <sup>a</sup>	10.15	17.35	±1.84
	II. (1300-1500)	270	13.54 <sup>a</sup>	10.22	17.13	±1.58
	III. (1800-1900)	135	12.30 <sup>b</sup>	10.14	15.79	±1.32

\*Different letters indicate significant differences between factors (P < 0.05).

Fruit width ranged between 4.04 mm and 12.91 mm. The lowest value of fruit width was obtained at 1000-1200 meters above sea level in Kaçkar Granitoyidi geological formation under 40-60 % canopy cover. The highest fruit width was obtained at 1300-1500 meters above sea level in Kaçkar Granitoyidi geological formation under 0 % canopy cover. The highest mean of berry width was obtained at 1300-1500 meters above sea level under 0

% canopy cover in Çatak geological formation. Berry width was significantly affected by canopy cover, geological formations and altitude. Also the effect of altitude was not linearly (Table 1).

The mean length of berries harvested from sample plots was given in Table 1. Fruit length ranged between 4.94 mm and 13.92 mm. The lowest fruit length is in the first group altitude, in Çatak geological formation and in

40-60 % canopy cover. The highest fruit length is in the second group altitude in Kaçkar Granitoyidi geological formation and in 0% canopy cover. The highest mean of berry length is 0% canopy cover, in Çatak geological formation and in the second altitude group (Table 1). Berry length was significantly affected by canopy cover, geological formations and altitude. Also the effect of altitude was not linearly (Table 1).

The mean 100 berry weight was given in Table 1. 100 berry weight ranged between 24.61 gr and 87.05 g. The lowest 100 berry weight is in the second group altitude in Kaçkar Granitoyidi geological formation and in 40-60 % canopy cover. The highest 100 berry weight is in the first group altitude in Kaçkar Granitoyidi geological formation and in 0% canopy cover. The highest mean of 100 berry weights is 0 % canopy in Çatak geological formation and in the second altitude group. According to altitude group, mean 100 berry weight first significantly increased, then decreased (Table 1).

The total dry matter amount of berries harvested from sample plots is given in Table 1. The total dry matter amount of fruit ranged between 10.14 % and 17.35 %. The only altitude has a significant influence on the total dry matter amount of berry (Table 1). First ripen time of berry is given in Figure 2. Altitude and canopy cover has an influence at the mature time of berry.

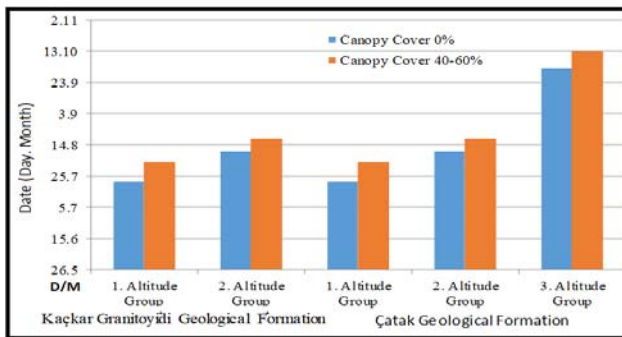


Figure 2. First ripen time of berry in research area.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, it was found that fruit width varied between 4.04 and 12.91 mm, fruit length ranged from 4.94 to 13.92 mm, the 100 berry weight varied between 24.61 and 87.05 g, and the total dry matter amount varied between 10.14% and 17.35%. While İslam et al. (2009) found that 100 berry weight ranged between 32.08 g and 100.5 g, Patan (2017) also found similar results to our research. As the altitude increased, fruit width, fruit height and 100 berry weight showed irregular change. Fruit mass is a plastic trait influenced by environmental factors like nutrient availability (Pato & Obeso, 2012). So it was determined that ecological factors, especially altitude,

change statistically fruit characteristics. Gülsoy et al. (2013) reported that environmental factors affect the physical properties of the fruit. Likewise Torland and Birks (1996) found that mean seed weight are more strongly influenced by altitude which largely reflects the climatic severity at the site. In this research, it was observed that the canopy negatively affects the properties of the fruit. An increase in fruit yield was reported by Moola and Mallik (1998) in wild velvetleaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides* Michx.) following canopy disturbance. Berry production by *V. myrtilloides* does improve significantly following artificial canopy disturbance; especially with partial cutting. This positive effect may be in response to increased light availability in canopy openings as indicated by the relationship between berry production and the number of reproductive shoots (Moola & Mallik, 1998). Similarly, shade significantly affected the growth of the 'bluecrop' blueberry and photosynthetic capacity was significantly depressed by shade (Kim et al., 2011). Altitude, especially high elevation, significantly affected the total dry matter amount of berries. This result may be related to environmental conditions in the high elevation. Because total dry matter amount influence fruit weight. So fruit mass may be influenced by the number of seeds per fruit. The number of seed is related to pollination and low temperatures limited their seed production (Torland, 2001).

As a result, pomologically, the best fruit characteristics in the populations were found on the Çatak geological formation at the second elevation (1300-1500 m a.s.l.). The wild Caucasian whortleberry populations in the second altitude group can be selected as one of the genetic resource conservation areas in the valley. Furthermore this population may have promising genotypes that contribute to plant breeding programs.

## REFERENCES R

- Anşin, R. & Özkan, Z.C. (2006). *Tohumlu bitkiler (spermatophyta) odunsu taksonlar*. KTÜ Basımevi, Orman Fakültesi Yayını, No:19, Trabzon, 262s.
- Ayaz, A.F., Kadioğlu, A., Bertoft, E., Acar, C. & Turna, İ. (2001). Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in two blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* and *V. myrtillos*) native to Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29, 137-141.
- Ayaz, A.F., Hayırlioğlu-Ayaz, S., Gruz, J., Novak, O. & Strnad, M. (2005). Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

- fruit by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8116-8122.
- Close, D.C. & McArthur, C. (2002).** Rethinking the role of many plant phenolics-protection from photodamage not herbivores. *Oikos*, **99**,166-172.
- Davis, P.H. (1978).** *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Ed. P.H. Davis, 6, at the University press, Edinburg.
- Fidan, M.S., Öz, A., Adanur, H. & Turan, B. (2013).** Gümüşhane yöresinde yetişen bazı önemli odun dışı orman ürünleri ve kullanım miktarları. *GÜFBED/GUSTIJ*, **3(2)**, 40-48.
- Gedik, A, Ercan, T, Korkmaz, S. & Karataş, S. (1992).** Rize-Fındıklı-Çamlıhemşin arasında (Doğu Karadeniz) yeralan mağmatik kayaların petrolojisi ve doğu pontitlerdeki bölgesel yayılımlar. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, **C-35**, 15-38.
- Gülsoy, S., Özkan, G., Özkan, K. & Genç, M. (2013).** Menengiç (*Pistacia terebinthus* L. subsp. *palaestina* (Boiss.) Engler) meyvelerinin bazı fiziksel ve fizikokimyasal özellikleri üzerine ekolojik faktörlerin etkisi. *SDU Faculty of Forestry Journal*, **14**, 15-23.
- Günay, K. 2009.** *Variation in important fruit quality characteristics in 'Hayward' (A. deliciosa Plach L.) kiwifruit of different elevations and directions in Ordu (Turkey) province*. M.Sc. Thesis, Ordu University, Institute of Science, Ordu, Turkey, 65pp.
- Güner, S. (1983).** Rize-Çayeli-Fındıklı yöresinin jeolojisi, M.T.A. Yayınları, Proje Yılı 1982-82-13b, Yayın No. 82-13b, Trabzon.
- Hasanloo, T., Sepehrifar, R. & Hajimehdipoor, H. (2011).** Levels of phenolic compounds and their effects on antioxidant capacity of wild *Vaccinium arctostaphylos* L. (Qare-Qat) collected from different regions of Iran. *Turk J. Biol.*, **35**, 371-377.
- İslam, A., Çelik, H. & Serdar, U. (2009).** Evaluation of *Vaccinium arctostaphylos* selections from The Artvin and Trabzon provinces of Turkey. *ISHS Acta Hort.*, **810**, 129-132.
- Jaakola, L., Riihinen, K., M., Karenlampi, S. & Hohtola, A. (2004).** Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, **218**, 721-728.
- Kayacık, H. (1981).** Orman ve park ağaçlarının özel sistematığı, 2. Cilt Angiospermae (Kapalı Tohumlular), Bozak Matbaası, Orman Fakültesi Yayını, No: 287 İstanbul, 231pp.
- Kim, S.J., Yu, D.J., Kim, T.C. & Lee, H.C. (2011).** Growth and photosynthetic characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* cv. *Bluecrop*) under various shade levels. *Scientia Horticulturae*, **129**, 486-492.
- Koca, İ. & Karadeniz, B. (2009).** Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in The Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, **121**, 447-450.
- Körner, C. (2007).** The use of 'altitude' in ecological research. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **22(11)**, 569-574.
- Latti, A.K., Ruhmen, K.R. & Kamulainen, P. S. (2008).** Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 190-196.
- Moola, F.M. & Mallik, A.U. (1998).** Morphological plasticity and regeneration strategies of velvet leaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides* Michx.) following canopy disturbance in boreal mixedwood forests, *Forest Ecology and Management*, **111**, 35-50.
- Navar, N. & Amin, G. (2004).** Anthocyanins from *Vaccinium arctostaphylos* berries. *Pharmaceutical Biology*, **42(4-5)**, 289-291.
- Okay, A.I. & Şahintürk, Ö. (1997).** Geology of the eastern pontides, in a.g. robinson, ed., regional and petroleum geology of The Black Sea and Surrounding Region. *AAPG, Memoir*, **68**, 291-311.
- Patan, Z. (2017).** *Determination on pomological and morphological characteristics of Vaccinium spp grown in Doğan kent, Giresun province*. M.Sc. Thesis, Ordu University, Institute of Science, Ordu, Turkey, 69pp.
- Pato, J. & Obeso, J.R. (2012).** Fruit mass variability in *Vaccinium myrtillus* as a response to altitude, simulated herbivory and nutrient availability. *Basic and Applied Ecology*, **13**, 338-346.
- Sedagathoor, S., Kashi, A.K., Talaei, A.R. & Khalghi, A. (2006).** Essential oils of qare-qat (*Vaccinium arctostaphylos*) shoots and chemical composition of berries. *International Journal of Agriculture & Biology*, **8(1)**, 45-46.
- Ticktin, T. (2004).** The ecological implications of harvesting non-timber forest products. *Journal of Applied Ecology*, **41(1)**, 11-21.
- Totland, Ø. & Birks, H.J.B. (1996).** Factors influencing inter-population variation in *Ranunculus acris* seed production in an alpine area of southwestern Norway. *Ecography*, **19(3)**, 269-278.
- Totland, Ø. (2001).** Environment-dependent pollen limitation and selection on floral traits in an Alpine species. *Ecology*, **82**, 2233-2244.

- Yalçınlar, İ. (1952).** İspir-Pazar-Arhavi ve Yusufeli Bölgesinin Jeolojisi. M.T.A. Rapor No: 2022, Ankara.
- Yamankaradeniz, R. (1982).** *Researches on composition and use possibilities of naturally grown rosehip in Erzurum region.* Ph.D. Thesis, Atatürk Üniv., Institute of Science, Erzurum, Turkey, 120pp.
- Yaldız, G., Yüksek, T. & Şekeroğlu, N., (2010a).** Importance of medicinal and aromatic plants in development of forest and costal villiages of Rize province. III. National Black Sea Forestry Congress, 20-22 May 2010, Volume: III 1176-1186pp.
- Yaldız, G., Yüksek, T. & Şekeroğlu, N. (2010b).** Medicinal and aromatic plants in flora of Rize province and their usage areas, III. National Black Sea Forestry Congress, 20-22 May 2010, Volume: III, 1100-1114pp.
- Yüksek, F. (2013).** *The investigations on effect of some ecological factors on plant and fruit properties in whortleberry (Vaccinium arctostaphylos L.) populations naturally growing in Firtına river basin.* Ph.D. Thesis, Karadeniz Technical University, Institute of Science, Trabzon, Turkey, 181pp.
- Yüksek T., Yüksek, F. & Kurdoğlu, O. (2017).** Natural resource problems and suggestions for resolving these problems in Firtına watershed. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, 2(1), 1-6.
- Zhu, J., T., Yi Li, X., Ming Zhang, X., Jiang Zeng, F., Sha Lin, L., Gong Yang, S., Wei Gui, D. & Wang, H. (2010).** Ecophysiological adaptation of *Calligonum roborovskii* to decreasing soil water content along an altitudinal gradient in the Kunlun Mountains, Central Russian. *Journal of Plant Physiology*, 57(6), 826-832.





## İzmit Körfezi' nde Çevresel Baskıların Etkileri

Huri EYÜBOĞLU<sup>1\*</sup> Ömer EYÜBOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Deniz ve Kıyı Yönetimi Dairesi Başkanlığı, 06510 Ankara/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, 40100, Kırşehir/ TÜRKİYE

Geliş/Received: 21.11.2000

Kabul/Accepted: 13.02.2020

Atıf yapmak için: Eyüboğlu, H. & Eyüboğlu, Ö. (2020). İzmit Körfezi' nde Çevresel Baskıların Etkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 25-37.

How to cite: Eyüboğlu, H. & Eyüboğlu, Ö. (2020). Effects of the Environmental pressures in Izmit Bay. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 25-37.

<https://orcid.org/0000-0003-0128-5872>  
 <https://orcid.org/0000-0002-4893-916X>

**\*Sorumlu yazarın:**

Huri EYÜBOĞLU  
Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Deniz ve  
Kıyı Yönetimi Dairesi Başkanlığı, 06510  
Ankara/TÜRKİYE  
 [huri.eyuboglu@csb.gov.tr](mailto:huri.eyuboglu@csb.gov.tr)  
Cep telephone : +90 (506) 645 28 06

**Öz:** İzmit Körfezi, gerek coğrafi konumu gerekse Türkiye'nin en önemli sanayi alanını barındırması itibari ile lojistik sektöründe çok önemli bir potansiyele sahiptir. Körfez, coğrafi konum olarak İstanbul ve Kocaeli şehirleri arasında bulunmakta olup Marmara denizinin doğusunu oluşturmaktadır. Sanayi yatırımlarının kentsel alanla iç içe olması, yoğun sanayinin getirdiği çevre kirliliği, gemi inşa sanayisinin büyümesi ve dolgu taleplerinin kıyı alanları ve ekosistemler üzerindeki olumsuz baskısı ve Petro-Kimya tesislerinin varlığı nedeni ile etrafında kurulu bulunan 35 adet liman-iskele ve pek çok sanayi tesisiyle İzmit Körfezi; ekonomik açıdan önem taşımakla beraber yoğun sanayileşme ve yıllık 12.000-15.000 arası gemi trafiği sonucu çevresel kirlilik yönünden risk altındadır. Körfez noktasının birinci derece deprem kuşağında olması ve büyük aktif fayların varlığı ise bu riski tetiklemektedir. 1999 depremi ve sonuçları bunun en önemli göstergesidir.

Bu derlemenin amacı, evsel veya endüstriyel girdilerdeki değişimlerin ve diğer çevresel baskıların Körfez su kalitesine ve ekosistemine etkilerini ortaya koymak ve bu yönde alınması gereken önlemlerin belirlenerek daha sonra yapılacağı öngörülen çalışmalar için örnek teşkil etmekte olup Körfez'de kirliliğe ilişkin değerlendirmelerin ortaya konulması, alınacak önlemlere ilişkin strateji ve politikaların oluşturulmasında son derece önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ekolojik kalite durumu, İzmit körfezi, ötrofikasyon.

## Effects of the Environmental pressures in Izmit Bay

**Abstract:** The Izmit Bay, as well as its geographic location to have Turkey's most important industrial areas in the logistics sector has a very important potential. The Bay is located between the cities of Istanbul and Kocaeli in terms of geographical location and constitutes the east of Marmara Sea. Due to the fact that industrial investments are intertwined with urban areas, environmental pollution caused by intensive industry, recent growth of shipbuilding industry and negative pressure of filling requirements on coastal areas and ecosystems and the presence of Petro-Chemical facilities in Izmit Gulf which has 35 port-pier and many industrial facilities installed around it, is at risk as a result of intensive industrialization and 12.000-15.000 ship traffic annually. Although being economically important, environmental pollution is noticeable. The fact that the Bay point is in the first degree earthquake zone and the presence of large active faults triggers this risk. The 1999 earthquake and its consequences are the most important indicators of this.

The aim of this review paper is to find out the effects of changes in domestic or industrial inputs and other environmental pressures on the Bay waters' quality and ecosystem and to determine the measures to be taken and to set an example for the studies that will be carried out in the future. It is important that to present the Bay's pollution assessments and develop strategies and policies regarding the measures to be taken.

**Keywords:** Ecological quality status, eutrophication, İzmit Bay.

**\*Corresponding author's:**

Huri EYÜBOĞLU  
Ministry of Environment and Urbanization,  
Department of Marine and Coastal  
Management, Ankara/TÜRKİYE  
 [huri.eyuboglu@csb.gov.tr](mailto:huri.eyuboglu@csb.gov.tr)  
Cep telephone : +90 (506) 645 28 06

## GİRİŞ

İzmit Körfezi, Marmara Denizi'nin Kuzeydoğusunda, 50 km uzunluğunda yarı kapalı bir su kütlesi olup 310 km<sup>2</sup>'lik bir alana sahiptir (Orhon vd., 1984). Körfez, ortama arıtılmadan verilen evsel ve endüstriyel atıklar nedeniyle uzun süreden beri aşırı kirlenme baskısı altında olup bu durum körfezde su kalitesi üzerinde olumsuz etki göstermekte ve ciddi besin elementi girişine sebebiyet vermektedir. Kirlenmenin azaltılması ve kontrol altına alınması için bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu bağlamda 1970'li yıllardan beri, İzmit Körfeziyle ilgili detaylı bilgiler elde edilmiştir. Kirlenmenin kontrol altına alınabilmesi ve tedbirlerin belirlenmesi amacıyla denizlerimizin oşinografik yapısının, kirlilik durumunun, kirliliğin zamana bağlı olarak gösterdiği değişimin, biyolojik çeşitliliğin ve çeşitliliği sınırlayan etkiler ile kirlilik yaratan kaynakların kirlilik yükünün belirlenmesi gerekmektedir (Avaz vd., 2014).

Marmara Denizi'nin bir parçası olan İzmit Körfezi'nde 1970 döneminden beri ötrofikasyon olayı yaşanmaktadır. Bu zamana kadar evsel atıklar, çevrede bulunan derelerin getirdiği kimyasal atıklar ve liman işletme tesislerinin getirdiği atıklar, bu kirliliğin artmasında en büyük etkenler arasındadır. Körfezin sularına bırakılan organik kökenli atıklar, bazı balık türlerinin bu su kütlesinden uzaklaşmasına veya kaybolmasına yol açmış, buna karşın organik atıklardan yararlanan ve kirli sulardan etkilenmeyen başta bazı algler olmak üzere, belirli türlerde kütleli çoğalmalar gözlenmeye başlanmıştır.

İzmit Körfezinde, deniz kirlenmesinde önemli rol oynayan diğer bir etken de, çözünmüş veya dispersiyon halindeki petrol hidrokarbonların yoğunluğundaki artıştır. Özellikle gemi trafiğinin belirgin bir şekilde artmaya başladığı 70'li senelerin başlarından itibaren Petrol hidrokarbonlarının kirletici etkisi hızla devam etmiştir. Petrol hidrokarbonları, gittikçe artan deniz trafiği ve bilinçli olarak veya kaza sonucu denize bırakılan atıklardan kaynaklanmıştır. Körfez, iki tabakalı bir su kütlesine sahip olup, üst tabaka suları Karadeniz kaynaklı, kalınlığı genelde 10-15 metre ve tuzluluğu yaklaşık % 24 olan bir su kütlesidir. Alt tabaka suları ise 25-30 metre derinlikte ve Akdeniz kaynaklı, tuzluluğu yaklaşık % 38.5 olan daha yoğun bir su kütlesidir. Etrafında kurulu bulunan liman-iskele ve pek çok sanayi tesisiyle İzmit Körfezi; ekonomik açıdan önem taşımakla beraber yoğun sanayileşme ve gemi trafiği sonucu çevresel kirlilik yönünden risk altındadır (Avaz vd., 2014)

İzmit körfezi, taşıma kapasitesinin üstündeki girdilere bağlı olarak aşırı besin elementi planktonik aktivite üzerinde olumsuz sonuçlar doğurarak aşırı çoğalmaya neden olmakta, sonucunda da özellikle körfezlerin iç kesimlerinde hipoksik veya anoksik koşullar oluşmaktadır ki bunun neticesinde de azoik sistemler ortaya çıkmaktadır (Balkış,

2003; Sur vd., 2006). Olumsuz durumun düzelmesi için, bu bölgelerdeki evsel ve endüstriyel atıksu uygulamalarının çevresel mevzuata uygun olarak düzenlenmesi önem arz etmektedir.

Klorofil-a denizlerde birincil üretimin en önemli göstergelerinden olup, aşırı yükselmesi, ötrofikasyonu işaret etmektedir. Marmara Denizi genelinde birincil üretimin belirlenmesi için tüm istasyonlarda, ışık geçirgenliği dikkate alınarak, 50 m derinliğe kadar klorofil-a ölçümleri yapılmıştır. Klorofil-a'nın düşey dağılımına bakıldığında genelde yüzeyde yüksek bir artış göstermektedir. Yatay dağılım incelendiğinde ise ötrofikasyonun yüksek olduğu İzmit Körfezi'nde en yüksek klorofil a ölçümleri yapılmıştır.

Bu değerlendirme 2005-2006 ve 2009 yılında yapılan araştırmalar ile benzerlik göstermektedir. Sanayinin olduğu yerlerde daha çok temizlik amaçlı atık sulara karışan deterjanlı sular veya temizlik ürünlerinin elde edildiği üretim fabrikalarının atık suları, kanalizasyon ve evsel atıksular direk veya dolaylı olarak (nehir yoluyla taşınması gibi) denize ulaşmakta ve yerleşim yerine yakın olan istasyonları etkileyerek anyonik deterjan (AD) miktarlarını artırmaktadır. Yüzey aktif maddelerden biri olan anyonik deterjanlar, endüstride (üretim yapılan fabrikalarda ve temizlik amaçlı) ve evsel kullanımlar sonucu diğer yüzey aktif maddelerle birlikte kanalizasyon sistemlerine karışmaktadır. Açık istasyonlarda yüzey sularındaki yüksek Anyonik deterjan değerleri gemilerin kullanım sularının denize boşaltıldığına işaret etmektedir. 2010 yılında İzmit Körfezi girişindeki istasyonda yüzey suyundaki AD, dip suyundan ve diğer istasyonların yüzey sularından daha düşüktür fakat İzmit Körfezi girişindeki istasyonunda dip suyu AD değeri körfezin diğer istasyonlarının dip suyundaki AD değerlerinden yüksek ölçülmüştür (Sur vd., 2010).

2010 yılında, deniz tabanı yüzey sedimentinde ölçülen metal değerlerine göre; Körfez' de sedimentin oldukça kirlenmiş olduğu tespit edilmiş olup bölgede özellikle liman ve tersane faaliyetlerinin yoğun olmasından ötürü artış olduğu tespit edilmiştir. İzmit Körfezi istasyonlarına ait deniz suyu örneklerinde tespit edilen toplam petrol hidrokarbon (DDPH; çözünmüş / dağılmış) miktarlarının dağılımında tespit edilen değerler kabul edilebilir limit değerini aşmamışken, kış sonunda İzmit dış Körfez (27.3-47.3 µg/L) ve Orta Körfez'de (35.2 µg/L) istasyonları yüzey ve dip sularında, limit değerinin yaklaşık 2.7-3.7 katı artışlar tespit edilmiştir (Sur vd., 2010).

Ayrıca atıksuların Körfezin su kalitesi üzerindeki etkilerini izleyebilmek amacıyla su kalitesi ve taşınımı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Körfez üzerine baskı teşkil eden kirlilik kaynakları belirlenerek Körfezin su kalitesi açısından durumu tespit edilmiş (Morkoç vd., 1995) ve atıksu girdisinde yerleşim birimlerinden kaynaklı nüfusun etkisi görülmüştür. İzmit Körfezi'nde insan kaynaklı oluşan

ötrofikasyonun kontrol edilebilmesi için öncelikle, evsel ve endüstriyel atıkların içerisinde bulunan besin elementlerinin ileri arıtma teknikleriyle arıtılmasının gerçekleştirilmesi ve ekosisteme olan baskı ve etkilerin saptanması ve su kalitesinin bozulmasına neden olan kirlilik riskine karşı önlemlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Diğer taraftan Körfez' e ilişkin kirlilik izleme veri ve değerlendirmeleri yapılacak her türlü bilimsel araştırmalara, belirlenecek politikalara, uygulanacak yasal düzenlemelere ya da düzeltim çalışmalarına önemli altlık oluşturacaktır.

**İzmit Körfezi'nin Kirlilik Durumu:** İki tabakalı bir su kütleline sahip İzmit Körfezi'nin hidrografik özellikleri genelde Marmara Denizi'ne benzemektedir. Üst tabaka Karadeniz kaynaklı olup kalınlığı genelde 10-15 metre arasında değişmektedir. 25-30 metre derinlikten başlayan alt tabakayı Akdeniz kaynaklı, tuzluluğu yaklaşık % 38,5 olan daha yoğun bir su kütlesi oluşturur (Kahraman vd., 2013).

Bu iki tabaka arasında ise haloklin olarak adlandırılan ve iki farklı su kütlelerinin karışımının meydana getirdiği bir geçiş tabakası mevcuttur. Bu üç tabakanın kalınlığı körfezde meteorolojik koşullara bağlı olarak mevsimsel değişim göstermektedir.

Üst tabaka kalınlığının arttığı yaz döneminde yüzey suyu tuzluluğu genellikle % 22-24 iken, sıcaklığın düşmesi ve rüzgârın etkisinin neden olduğu sonbahar- kış karışımı sonucu yüzey suyu tuzluluğu Marmara'da olduğu gibi, İzmit Körfezi'nde de artış göstermektedir. İzmit Körfezi'nin Körfezi çevreleyen kıyılarda eğim değişkenlik göstermekle beraber genel olarak doğu baseninin çevresinde eğiminin %1'den az olduğu söylenebilir. Körfezin biyokimyasal özelliklerinin mevsimsel değişimi iki tabakalı akıntı sisteminde kontrol edilmektedir.

Körfez' de çözünmüş oksijen, yere ve zamana bağlı değişim göstermektedir. Marmara Denizine benzer şekilde Çözünmüş Oksijen(ÇO) değerleri Doğu kesimi hariç termoklin tabakasından itibaren aşağıya doğru ani bir azalma gösterir. İki tabakalı Körfez sularının Marmara açık deniz sistemi ile su değişiminin çok zayıf ve akıntı rejiminin oldukça yavaş özellikle yaz sonlarına doğru alt ve ara tabaka sularında çözünmüş oksijen konsantrasyonunun zaman zaman ölçüm sınırının altına düşmesine neden olmaktadır. Az tuzlu üst tabaka suları organik maddece ve oksijence zengindir. Alt tabaka suları genelde Marmara dip suları özelliğini taşımaktadır; oksijence çok fakir, fakat besin elementlerince zengindir. Ara tabakada oksijen çöküşü olur ve zaman zaman oksijensiz koşullar oluşabilmektedir (Avaz vd., 2011).

Marmara Denizinde Ağustos 2014 de yapılan örneklemede doygun çözünmüş oksijen değerlerinin en düşük olduğu alan İzmit Körfezidir. İzmit iç ve orta körfezde yer alan istasyonların derin tabakalarında çözünmüş oksijen değeri 10% dan azdır (Beken vd., 2014). Bu sonuç İzmit İç

Körfez'de ışık geçirgenliğinin düşük olduğunun da bir göstergesidir.

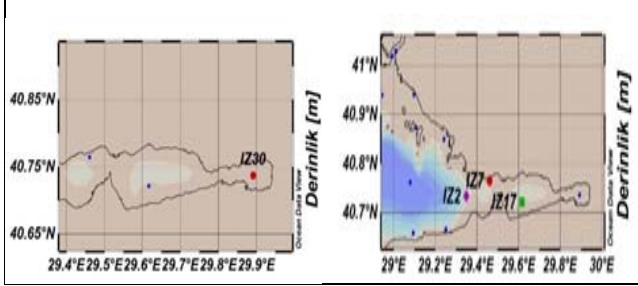
Çevre ve şehircilik Bakanlığı koordinasyonunda TÜBİTAK/MAM tarafından gerçekleştirilen Marmara Denizi Bütünleşik kirlilik İzleme çalışmasında (Beken vd., 2018) İç körfez' de Seki Disk Derinliği 4 m iken orta körfez' de 6 m yi bulmuştur. Yine bu çalışmada, İzmit İç Körfezde yer alan istasyonda, yüzeyde 7,9 mg/L olan ÇO derişimleri ara tabakada hızla 0,5 ve alt suda da 0,29 mg/L gibi çok düşük değerlere inmektedir. Marmara Denizinde en düşük ÇO değerlerinin gözleendiği bölge İzmit Körfezi olup, bu durum Körfezin yoğun endüstriyel ve evsel etki alanında olduğunun göstergesidir. İzmit Körfezi orta ve dış kesimde yer alan istasyonlarda, yüzeyde 7,8 ile 8,1 mg/L olan ÇO değerleri ara tabakada 1-2 mg/L seviyesine inmiş, derin suda da <1 mg/L seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Marmara Denizinde en düşük ÇO değerlerinin gözleendiği bölge İzmit Körfezi olup, bu durum Körfezin yoğun endüstriyel ve evsel etki alanında olduğunun göstergesidir.

İzmit Körfezinde 2007-2013 yılları arasında yapılan aylık deniz izleme çalışmalarında Körfez sularının ışık geçirgenliği 1 ile 13 m arasında değişkenlik göstermiştir. En düşük Seki Disk ölçümleri Körfez'in doğusunda gözlenmiş olup en yüksek değerler ise yaz ve sonbahar aylarında 8,5 ile 13 m arasında körfezin batısında Marmara'ya çıkış kesiminde yer alan istasyonlarda gözlenmiştir (Ediger vd., 2013). İzmit Körfezinde 2007-2013 yılları arasında fitoplankton biyokütle göstergesi olan klorofil-a değerleri ise üst su kolonunda yüksek değerlerde olup, tabakalaşmanın başladığı derinlikten itibaren değerlerin hızlı düşmekte olduğu belirlenmiştir. 2017-2018 yılları arasında, İzmit Körfezinin orta kısmında yer alan İZ25 /İZ17 istasyonlarındaki dip su ÇO değerleri kıştan yaza 1.3 mg/L'den <0.2 mg/L 'ye gerilemiştir.

İzmit Körfezi sanayi açısından oldukça gelişmiştir. Körfezde yer alan Kocaeli ve Yalova illerinde önemli sanayi faaliyetleri bulunmaktadır. Söz konusu illerde bulunan sanayi kuruluşlarından kaynaklı atıksular körfezin su kalitesini olumsuz etkilemektedir.

Yerli vd., (2006) tarafından yapılan çalışmada, İzmit Körfezi besin elementleri açısından üç kısımda incelenmiş olup batı bölümünde, yüzeyde minimum seviyelerdeki besin elementlerinin 20 m den itibaren artış gösterdiği, alt sularındaki besin elementlerinin derişimlerinin ise organik maddelerin ayrışarak inorganik maddelere dönüşmesi nedeniyle daha yüksek değerlere ulaştığı saptanmıştır. Bu durumu kış döneminde uzun süren yağışlardan sonra yazın Karadeniz'den Marmara'ya üst akıntılarla taşınan besin elementlerinin fitoplankton tarafından hızla tüketildiği için yüzey suyunda az miktarda bulunduğunu söyleyebiliriz.

İzmit Körfezi' nde besin elementlerinin (nitrat, fosfat ve silikat) dağılımı iki tabakalı deniz ekosistemlerinin tipik özelliklerini ve derinlik değişimlerini yansıtmaktadır. İzmit İç Körfezde yer alan İZ30 istasyonda, yüzeyde 0,09 olan DIP derişimleri ara tabakada hızla 0,62 $\mu$ Mve alt suda da 1,06 $\mu$ M yükselmiştir. TP değerleri yüzey, ara ve derin suda 1,16; 1,19 ve 1,43  $\mu$ M olarak belirlenmiştir (Beken vd., 2014).



**Şekil 1.** İzmit İç Körfez'de yer alan İZ30 istasyonu ve İzmit Körfezi orta ve dış kesimde yer alan İZ2, İZ7 ve İZ17 nolu istasyonları (Beken vd., 2014).

**Figure 1.** İZ30 station in Izmit Inner Bay and İZ2, İZ7 and İZ17 stations in the middle and outer parts of Izmit Bay (Beken et al., 2014).

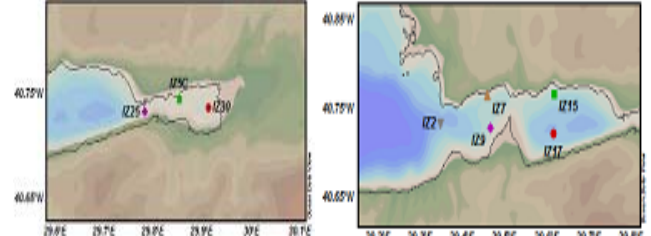
İzmit Körfezi orta ve dış kesimde yer alan İZ2, İZ7 ve İZ17 nolu istasyonlarda yüzeyde 0,02-0,06  $\mu$ M seviyesinde olan DIP değerleri, ara tabakada 0,1-0,3  $\mu$ M civarında, derin suda ise 0,1-1,5  $\mu$ M aralığındadır. TP değerleri yüzeyde 0,3-0,5  $\mu$ M, ara tabakada 0,6-0,9  $\mu$ M, derin suda 1,3-1,9  $\mu$ M aralığında olup derişimlerin yüzeyden derine doğru artmakta olduğu gözlenmiştir (Beken vd., 2014). Son 5 yılın yaz dönemi fitoplankton bolluğu değerlerine göre en yüksek hücre bollukları genel olarak 2015 yılında görülmüştür. Sadece İzmit iç körfezde bulunan İZ30 istasyonunda (1.537.670 hücre/L) 2018 yılında en yüksek bolluk değeri tespit edilmiştir. Özetle; 2018 yılı bolluk değerlerinin 2014, 2016, 2017 yıllarına kıyasla yüksek; 2015'e kıyasla düşük olduğu görülmektedir.

Su Çerçeve Direktifinde su kalite parametreleri içinde biyolojik kalite unsuru olarak fitoplanktonun önemli yer tuttuğu bilinmektedir. Sucul ekosistemlerin korunması için oldukça önem arz eden izleme çalışmalarında fitoplanktonun incelenmesi suların ekolojik kalite durumunun belirlenmesinde önemli veriler sağlamaktadır.

Fitoplanktonlar tarafından en önce tercih edilen fosfor bileşiği olan orto-fosfat (PO<sub>4</sub>-P) azota göre daha düşük derişimlerde bulunur. 2018 yılında, TÜBİTAK/MAM tarafından yürütülen Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme çalışmasında Şekil 2' de verildiği üzere Körfezde 8 istasyonda izleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

İzmit İç Körfezde yer alan İZ30 no'lu istasyonda, Yüzeyde 0,09 olan DIP derişimleri ara tabakada hızla 0,62 $\mu$ Mve alt suda da 1,06 $\mu$ M yükselmiştir. TP değerleri yüzey, ara ve derin suda 1,16; 1,19 ve 1,43  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. İzmit Körfezi orta ve dış kesimde yer alan

İZ2, İZ7 ve İZ17 no'lu istasyonlarda yüzeyde 0,02-0,06  $\mu$ M seviyesinde olan DIP değerleri, ara tabakada 0,1-0,3  $\mu$ M civarında, derin suda ise 0,1-1,5  $\mu$ M aralığındadır. TP değerleri yüzeyde 0,3-0,5  $\mu$ M, ara tabakada 0,6-0,9  $\mu$ M, derin suda 1,3-1,9  $\mu$ M aralığındadır. Derişimlerin yüzeyden derine doğru artmakta olduğu gözlenmiştir (Beken vd., 2018).



**Şekil 2.** İzmit İç Körfez (İZ30, İZ25, İZ5) ve İzmit Orta ve Dış Körfezde (İZ2, İZ7, İZ9, İZ15 ve İZ17) izleme istasyonları (Beken vd., 2018).

**Figure 2.** Izmit Inner Bay (İZ30, İZ25, İZ5) and Middle and Outer Monitoring stations in Izmit Bay (İZ2, İZ7, İZ9, İZ15 and İZ17) (Beken et al., 2018).

İzmit İç Körfezde yer alan istasyonlarda yüzeyde NH<sub>4</sub> 2-3  $\mu$ M, TP ise 1  $\mu$ M olarak ölçülmüştür. İzmit orta ve dış körfezde (İZ2, İZ7, İZ9, İZ15 ve İZ17) derinliğe karşı NO<sub>3</sub>+NO<sub>2</sub>-N ( $\mu$ M), NH<sub>4</sub>-N ( $\mu$ M), Si ( $\mu$ M), PO<sub>4</sub>-P ( $\mu$ M), TP ( $\mu$ M) özellikle İZ15 istasyonunda yüksek olup NH<sub>4</sub>-N değerleri yüksek ve salınımlıdır. İZ17 ve İZ7 istasyonlarında kış dönemi de yüksek NH<sub>4</sub>-N bulunmuştur ve derin olan İZ2 ve İZ17 istasyonlarının dip sularındaki ÇO değerleri kritiktir. Çözünmüş Oksijen (mg/L) değişimleri İZ17 'de 150 m (dip 157 m) kış döneminde 1.0 mg/L, ilkbaharda 0.7 mg/L ve yazın 0.2 mg/L seviyelerinde ÇO ölçülmüştür (Beken vd., 2018).

TÜBİTAK/ MAM tarafından 2000-2002 yılları arasında yürütülen izleme çalışmalarında, en yüksek Klorofil-a değerleri 2001 yılının Mart ayında Batı, Orta ve Doğu körfezde sırasıyla yaklaşık 7, 18 ve 15 ug/l olarak ölçülmüştür. 2006 yılında tamamlanan "Marmara Çevre Master Planı ve Yatırım Stratejisi Marmara Denizi Havzası (MEMPHIS) projesi" kapsamında gerçekleştirilen izleme çalışması sonuçları da bu değerlerle uyumlu bulunmuş olup bahsedilen çalışma sonuçlarına göre hesaplanan TRIX indeks değerinin 4,7 ile 5,9 arasında değiştiği saptanmıştır. Değerlerden de anlaşılacağı üzere Körfez ötrofikasyon riski ile karşı karşıyadır.

2007-2008 yıllarında, Körfezde TÜBİTAK /MAM tarafından gerçekleştirilmiş olan izleme çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalarda TRIX indeks değerleri (4,1 -6,8), klorofil-a değerleri (5-20 $\mu$ g/l) ve oksijen sonuçları önceki çalışmalara ait sonuçları desteklemektedir. Diğer taraftan, 2014 yılında gerçekleştirilen izleme çalışmalarında Körfez' de TRIX indeksi önceki yıllarla karşılaştırılmış (Tablo 1) ve İç Körfez' in Ötrofik olduğu değerlendirilmiştir (Beken vd., 2014).

**Tablo 1.** Körfez’ de istasyonlarda TRİX indeksinin, önceki yıllarla karşılaştırılması.

**Table 1.** Comparison with TRİX index figures this year and previous years in İzmit Bay’s stations.

İstasyon	Ağustos 2011	Ağustos 2013	Ağustos 2014	Değerlendirme
İZ 30	5,05	5,27	5,49	5-6 Kötü
İZ2	3,27	3,65	5,34	<4 Çok İyi; 4-5 İyi
İZ17	4,46	4,22	5,22	4-5 İyi; 5-6 Kötü
İZ7	-	-	5,37	4-5 İyi

İzmit Körfezi’nde kirliliği oluşturan kaynaklar; insan metabolik atıkları, deterjanlar, tarımsal faaliyet, erozyon, endüstriyel kaynaklardır. İzmit Körfezi çevresinde endüstriyel faaliyetler çok yoğundur. Endüstriler yoğun olarak İzmit, Gebze ve Körfez ilçelerinde toplanmışlardır.

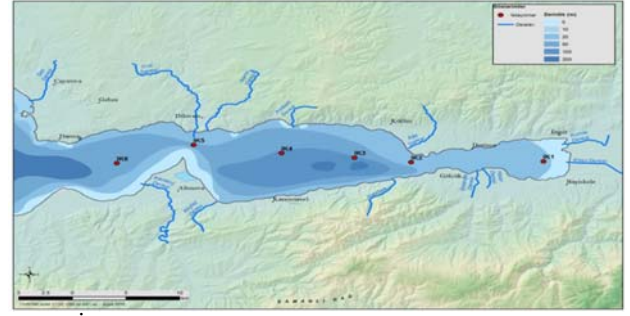
Diğer taraftan, içlerinde petrol ve petrol ürünlerinin de elleçlendiği yaklaşık 40 liman işletme tesisi ile birlikte tersane ve yat çekek yerleri, iskeleler, balıkçı barınakları, marinaların yer aldığı İzmit Körfezi’nde 2013 yılı verilerine göre yıllık yaklaşık olarak 62 milyon ton yük elleçlenmektedir (Şahin, 2015).

Kimya, metal, deri, gıda, tekstil, OSB (Organize Sanayi Bölgesi), ulaşım araçları, elektronik, maden, çimento, kağıt, ilaç, Petrol rafinerileri ve yan ürünler, gübre, çimento OSB, plastik gibi çok çeşitli ve karışık atıksular denize verilmektedir (Ayaz, 2019).

İzmit körfezinde noktasal deşarjlar, havza yolu ile taşınımlar ve Karadeniz yüzey suyu girdilerine bağlı besin ve organik madde zenginleşmesi (kış karışımları ile alt suların yüzey sularına taşınımları da ekleyince) ışıklı yüzey sularının ötrofikasyona maruz kalmasına neden olabilmektedir. Bu durum, özellikle su dolaşımının da sınırlı olduğu daha sığ körfez sularını daha fazla etkilemektedir.

Bunun sonucunda, özellikle yaz-sonbahar dönemlerinde ötrofikasyonun etkisi ile körfezde oksijen seviyesinde ciddi düşüşler görülmektedir (ara ve alt tabakalarda). Bölgenin uzun süredir endüstriyel anlamda hızlı bir gelişme geçirmesi, yoğun bir kirlenme baskısına sebep olmuştur. Kirlenmenin kontrolü ve azaltılması için 1970’li yıllarda Körfez’in oşinografik özellikleri belirlenmiş ve bazı biyolojik çalışmalarda bulunulmuştur. Bu çalışmaların akabinde, bir model yardımıyla da Körfez’in oşinografisi, kirliliği ve özümleme kapasitesi ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (Oguz ve Sur, 1986).

Kahraman vd., (2016) tarafından Körfez’de görülen yoğun müsilajların bir sonucu olarak İzmit Körfezi’nin su kalitesi izleme çalışmaları 2007 yılında başlatılmıştır. 2014 yılında ve sonrasında “Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği” üzerinde çalışılmış olup Su kalitesini belirleyen İzmit Körfezi’nin fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametrelerinin izlenmesi yıl boyunca belirli bir derinlikte toplam 6 deniz istasyonunda mevsimsel performans göstermiştir.



**Şekil 3.** İzmit Körfezi örnekleme noktaları (Kahraman vd., 2016).  
**Figure 3.** The sampling points in İzmit Bay (Kahraman et al., 2016).

Bu çalışmaların yanı sıra Kahraman vd., (2016) tarafından yapılan İzleme programında; sıcaklık, tuzluluk, pH, geçirgenlik, çözülmüş oksijen, oksijen satürasyonu, besinler, klorofil-*a*, fitoplankton, makrofit, bentik omurgasızlar, çökeltiler ve biyotada kirlleticiler incelenmiştir. Ayrıca, 8 akarsuda mevsimsel örnekleme yapılmış olup Körfez suyunun kalitesi sürekli izlenerek, evsel ve endüstriyel girdilerde meydana gelen değişikliklerin Körfez suyu kalitesi ve ekosistemi üzerindeki etkileri gözlenmiştir.

İzmit Körfezi’nde su kalitesinin en önemli göstergelerinden biri olan çözülmüş oksijen değerleri sürekli bir düşüş göstermiştir. Bu düşüş İzmit Körfezi gibi yarı kapalı havzalarda besin girdisi ve karışımın etkisiyle besin zenginleşmesine sebebiyet vermekte olup bu da fitoplankton artışını teşvik etmektedir. Fitoplanktonik organizmaların üreme hızları çok yüksek ve yenilenme süreleri çok kısa olduğundan, ani bir besin yükselmesinde diğer koşullar da uygun ise, kısa sürede çok yüksek yoğunluklara ulaşabilmektedir.

Okay vd., (2001) tarafından yapılan değerlendirmede, Körfez’de birincil üretim yapan organizmaların (fitoplankton) göstergesi olan Klorofil-*a* değerinde geçmiş yıllara göre önemli artışların yaşandığı gösterilmiştir. 1999 yılında (deprem sonrası) üretimde bir düşüş kaydedilmiştir. Klorofil-*a* seviyelerinin 1980’li yıllardan beri İç Körfez’de yüksek olduğunu söylemek mümkündür fakat Orta Körfez’de görülen artış özellikle 90’lı yıllardan sonra ivme kazanmıştır. İzmit Körfezi çevresinde bulunan endüstrilerden ve yerleşim birimlerinden kaynaklanan atık sularındaki kirlenme özelliğe sahip maddelerden önemli bir kısmı artılmadan körfezin üst sularına verilmektedir.

İzmit iç körfezde su kalitesinin daha da kötü olmasının nedeni, dip suların düşük oksijenle ve Karadeniz’den giren üst tabaka sularının İstanbul mega kenti atık suları ile daha da kirlenerek körfeze ulaşmasıdır. Körfeze Direk etkisi olan Kocaeli iline ait arıtma tesislerinin mevcut durumu ve nüfus bilgisi (Kandıra hariç) göz önüne alındığında Körfeze yılda 7200 ton BOI, 7200 ton AKM,



1999 ton azot (TN) ve 526 ton fosfor (TP) girmekte olduğu söylenebilir (Avaz vd., 2014).

Diğer taraftan İki tabakalı körfez sularının Marmara açık deniz sistemi ile su değişiminin çok zayıf ve akıntı rejimi oldukça yavaş olması özellikle yaz sonlarına doğru alt ve ara tabaka sularında çözülmüş oksijen konsantrasyonunun zaman zaman ölçüm sınırının altına düşmesine neden olmaktadır.

Birbirine dair geçişlere bağlı üç basenden oluşan İzmit Körfezi'nin doğu kesimi sıg ve eğim (<%1) düşüktür. Körfez, kentsel, endüstriyel kaynaklı ve derelerin taşıdığı kirleticilerin sürekli etkisi altındadır. Özellikle yaz aylarında

oksijen eksikliğine bağlı balık ölümleri gözlemlenmektedir. Ayrıca son yıllarda sık sık meydana gelen red tide (zararlı alg patlamaları) olayları ve görünürlüğü azalması Körfezin orta ve iç kesiminde ötrofikasyon sürecinin başlamış olduğunu göstermektedir. Bu nedenle Kentsel Atıksu Arıtımı Yönetmeliği kriterlerine göre iç (doğu) ve orta basende yer alan kıyısız bölge "hassas alan" olarak tanımlanmıştır. İzmit Körfezi kıyısız alanlarda kentsel atık su arıtma tesisi (KAAT) durumu değerlendirilmiş (Avaz vd., 2011) ve hassas alanlara göre değerlendirilen ve olması gereken KAAT arıtma seviyeleri Şekil 4' te belirlenmiştir.



Şekil 4. İzmit Körfezi KAAT arıtma seviyeleri (Avaz vd., 2011).

Figure 4. Treatment Levels of WWTP's in İzmit Bay (Avaz et al., 2011).

"İzmit Körfezi'nin Atıklarından Arındırılması Projesi", Kocaeli ve Yalova illerine bağlı Yarımca-Altınova yerleşim beldeleri arasında kalan 27 belediye sınırları içerisindeki endüstriyel ve evsel atıksuların arıtılmadan doğrudan körfeze ya da körfeze boşalan derelere verilmesi nedeniyle kirlenen İzmit Körfezi'nin atıksularla kirlenmesinin önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, Körfez Kolektör Hattı ve 8 adet Atıksu Arıtma Tesisi Projesi hayata geçirilmiştir. Arıtılmadan derelere, dereler vasıtasıyla da denize (körfeze) deşarj olan ve körfezdeki kirlilik yükünü arttıran atık sular, arıtma tesislerinde arıtıldıktan sonra deşarj edilmeye başlanmış ve İzmit Körfezine akan tüm derelerin ıslahı sağlanmıştır (Önem, 2015).

Yüzey sularının, yağın yağmur sularıyla birlikte kontrolsüz olarak denize deşarj olmasını engellemek için liman ve iskelelerde bariyerler yaptırılmıştır. Liman ve iskelelere 30 adet Atık su arıtma tesisi yaptırılmıştır. Arıtma tesisinin yapılmasına gerek duyulmayan yerlerde ise çöktürme havuzları yaptırılmıştır.

Kocaeli Büyükşehir Belediyesince Gebze İlçesi'nde bir adet Atıksu Arıtma tesisi yapılmıştır. İzmit Körfezi'ni kuşaklama mantığı ile çeviren 22 adet atıksu arıtma tesisi sayesinde % 99 arıtma oranına ulaşılmıştır. Bu yatırımlar neticesinde 2016 yılında % 45 olan İleri biyolojik arıtım oranının 2017 yılı sonunda % 65'e ulaşması; nihai hedef olarak da 2020 yılında % 95 olması hedeflenmiştir (Bostan, 2017).

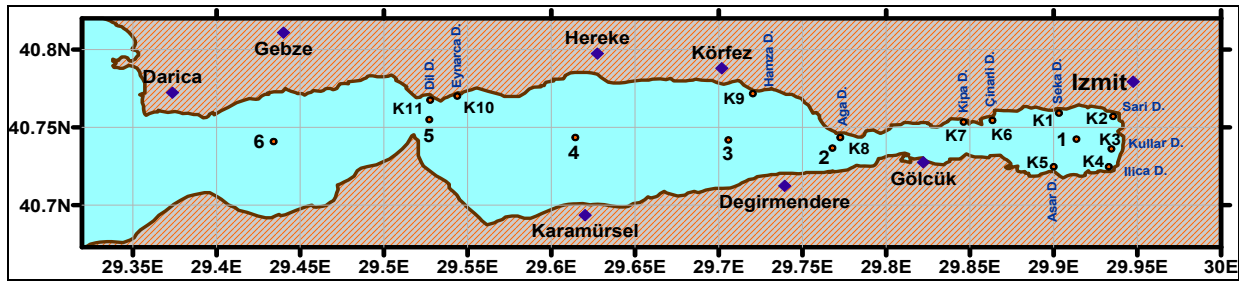
Ancak, kentsel atıksu deşarjları devreye girmesine rağmen, Marmara'nın sınırlı atıksu özümleme üstünde anorganik+organik besin tuzları girdisinin göreceli artarak devam ettiği anlaşılmaktadır. Bu olumsuz gelişmeden özellikle İzmit Körfezi ekosistemi ve dip suları etkilenmektedir. Marmara Denizi ekolojik durumun düzelmesi için karasal baskıların azaltılmasına yönelik ciddi yönetim planlamalarına ihtiyaç olduğu açıktır. Ancak, bunun gerçekleşmesi, düzenli veri toplanması ve süreç çalışmalarıyla desteklenen ve doğrulanmış ekosistem temelli su kalitesi modelleme çalışmalarının yapılması ve sürekliliğinin sağlanması ile mümkün görünmektedir.



Körfezin su kalitesi, kıyı bölgelerinin sunduğu imkânlar nedeniyle hızla artan endüstriyel faaliyetler, deniz taşımacılığı, iç bölgelerden nehir ve dereler vasıtasıyla gelen tarımsal, evsel ve endüstriyel kirlilik gibi çeşitli kaynaklardan olumsuz etkilenmektedir. Kirliliğin kontrol altına alınabilmesi için bir strateji oluşturulmalıdır. Bu amaçlar doğrultusunda, 2005 yılında Avrupa Yatırım Bankası ile Marmara Çevre Master Planı ve Yatırım Stratejileri – MEMPIS Projesi” gerçekleştirilmiştir. Proje çerçevesinde, Marmara Denizi oşinografisinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik durumun tespiti amacıyla, Marmara Denizi Hidrodinamik ve Su Kalitesi Modeli geliştirilmiştir. Marmara Denizi Kirlilik İzleme çalışması MEMPIS Projesinin devamı niteliğindedir. Bu proje ile Marmara Denizi'nin oşinografik yapısının, deniz ortamındaki kirlilik durumunun, kirliliğin zamana bağlı olarak gösterdiği değişimin, biyolojik-çeşitliliğin ve çeşitliliği sınırlayan etkilerin belirlenebilmesi ve bu etkenlere ilişkin veri setlerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

Ediger vd., (2013) tarafından İzmit Körfezinde 2007-2013 yılları arasında izleme çalışmalarında ışık geçirgenliğinin 1 ile 13 m arasında değişkenlik gösterdiği ve en düşük Seki Disk ölçümlerinin Körfez'in doğusunda yer alan istasyonda, en yüksek değerlerin ise yaz ve sonbahar aylarında 8,5 ile 13 m arasında körfezin batısında Marmara'ya çıkış kesiminde yer alan istasyonlarda gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Okuş ve Taş (2001) tarafından 2002'de yapılan çalışma, mevcut fitoplankton miktarı ve dağılımının azalması, besin elementlerinin azalmaması Körfez'in doğu kesiminde ciddi bir ötrofikasyonun olduğunu göstermiştir.



Şekil 5. İzleme İstasyonlarının Konumu (Ediger vd.,2013).

Figure 5. Location of Monitoring Stations (Ediger et al., 2013).

İzmit Körfezinde 2007-2013 yılları arasında fitoplankton biyokütle göstergesi olan klorofil-a değerleri üst su kolonunda yüksek değerlerde olup, tabakalaşmanın başladığı derinlikten itibaren değerler hızlı düşmekte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca klorofil-a derişimlerinin İstanbul Boğazından, Çanakkale Boğazına doğru azaldığı belirlenmiştir. Genel olarak Karadeniz'in etkisi altındaki doğu baseninde fitoplankton biyo-kütlesini temsil eden klorofil-a derişimleri batı baseninde elde edilen değerlere) oranla daha yüksektir. İzmit Körfezinde 2007 yılından günümüze değin gerçekleştirilen aylık deniz izleme

Kapalı bir yapı gösteren doğu kesimine gelen evsel ve endüstriyel atık suların, ortamdaki besin elementleri konsantrasyonunu ciddi anlamda değiştirdiği gözlenmiştir. Besin elementleri konsantrasyonunun, sürekli plankton patlamalarının yaşandığı orta ve iç kısımlarda düşük seviyede olduğu ileri sürülmektedir. Körfezde son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda toplam fitoplankton içinde zararlı türlerin kayda değer bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bununla beraber, 2007-2008 yıllarında körfezde gözlenen musilaj olayı göz önünde bulundurulduğunda körfezde fitoplankton yoğunluğunda artış olması Körfez için ciddi bir ötrofikasyon riski oluşturmaktadır. Bu değişimlere bağlı olarak fitoplankton üretimini kontrol eden besin elementleri zaman içerisinde değişebilmektedir. Bu kapsamda İzmit Körfezi'nde daha önce yapılan çalışmalarda sınırlayıcı besin elementi 20 yıl içerisinde tamamen değişmiştir.

2007-2012 yılları arasında yürütülen İzmit Körfezi Su Kalitesinin ve Karasal Girdilerin İzlenmesi ve Kirliliğin Önlenmesine Yönelik Önerilerin Geliştirilmesi projesi kapsamında Şekil 5' te verilen deniz suyu kalitesinin yapıldığı örnekleme noktalarında deniz su kalitesi göstergeleri olarak oksijen durumu, besin maddeleri (azotlu ve fosforlu bileşikler, silikat), su kolonundaki ışık geçirgenliği, klorofil-a, toplam organik karbon, askıda katı madde ve petrol hidrokarbonları seviyesi ile fitoplankton tür ve çeşitliliği izlenmiş ve ayrıca Körfezin akıntı rejimi mevsimlik olarak belirlenmiştir.

Deniz çalışmalarına ilave olarak Körfeze girdi sağlayan 12 derede su kalite parametreleri (Toplam fosfor, azot, kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyacı, toplam organik karbon) izlenmiştir.

çalışmalarında ölçülen yüzey klorofil-a derişimleri aralığı 0,1 ile 38 µg/L olarak saptanmıştır. En yüksek klorofil-a derişimi (38 µg/L) Şubat 2010 ayında iç körfezde yer alan istasyonda gözlenirken en düşük derişimler (0,1 µg/L) yaz aylarında körfezin Marmara Denizine çıkış kesiminde yer alan istasyonların yüzeyinde gözlenmiştir (Ediger vd., 2013).

Yarı kapalı ve özel yapısı nedeniyle suların fazla karışmadığı İzmit Körfezi'nde ötrofikasyon; su ürünleri, turizm ve rekreasyon değerlerinin yitilmesiyle sonuçlanan önemli bir ekonomik sorun olarak ortaya çıkar. Okay vd.,

(2001) tarafından Karasal girdilerden kaynaklı Körfez sularına giren askıda katı madde (AKM), toplam azot (TN) ve biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) yükleri hesaplanarak 1984 ve 1995 yılı ölçümleri ile karşılaştırılmıştır. Bu ölçümlerin sonuçlarına göre, Körfezin doğusundaki atık yüklerinin azalmasına karşın, batısına boşalan Dilderesi'nden önemli ölçüde artış olması Körfez sularını etkilemiştir. Bu da ötrofikasyonu İzmit Körfezi için kalıcı bir hale getirmiştir. 2007 yılından beri kesintisiz olarak Körfezde yapılan çalışmalar sonucunda Körfeze akan derelerin körfeze önemli ölçüde karasal kirlilik taşıdığı tespit edilmiş bazı derelerin ıslah çalışmalarının yapılması gerekliliği önerilmiştir.

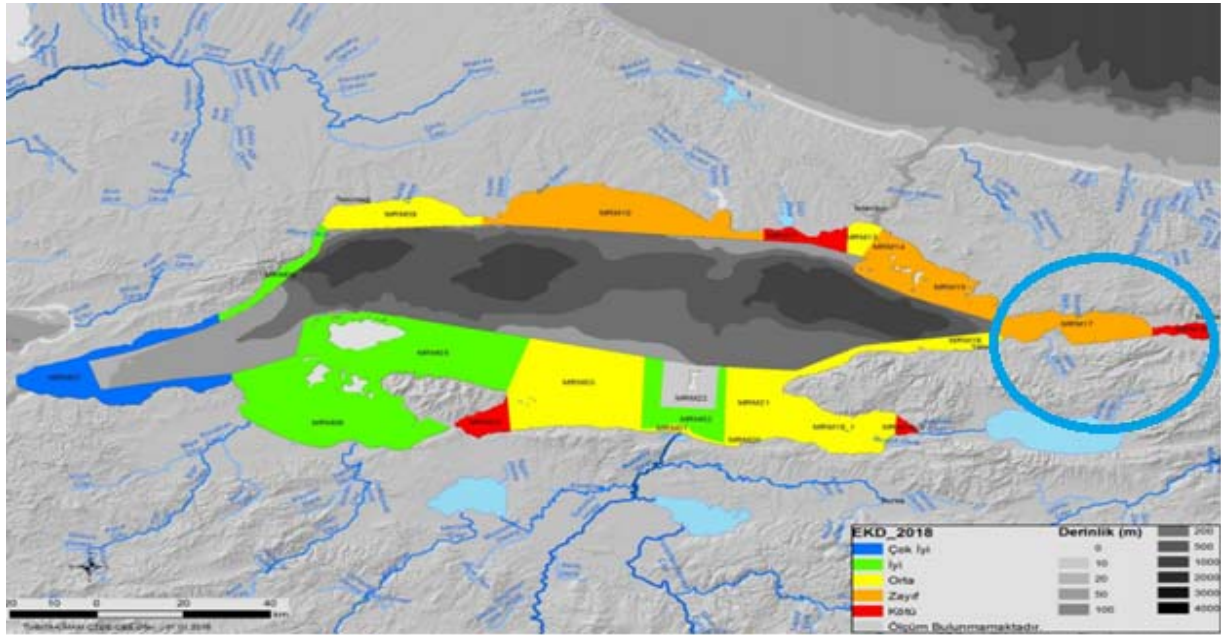
Su Çerçeve Direktifinde su kalite parametreleri içinde biyolojik kalite unsuru olarak fitoplanktonun önemli yer tuttuğu bilinmektedir. Sucul ekosistemlerin korunması için oldukça önem arz eden izleme çalışmalarında fitoplanktonun incelenmesi suların ekolojik kalite durumunun belirlenmesinde önemli veriler sağlamaktadır.

Körfeze ilişkin biyolojik kalite elemanları (Klorofil-a, makro flora ve makrozoobentos) ile destekleyici göstergelerden toplam fosfor, nitrat ve nitrit azotu, seki disk

derinliğine dayandırılan ortak ekolojik kalite değerlendirmesi yapılmıştır.

Bu çalışma ilk kez Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Koordinasyonunda TÜBİTAK/MAM tarafından yürütülmüş olan “Deniz ve Kıyı Suları Kalite Durumlarının Belirlenmesi ve Sınıflandırılması Projesi(DEKOS Projesi)” ile yapılmıştır. DEKOS Projesi ile İstasyonlarda klorofil-a sonuçlarına göre İzmit Körfezinde iki Su Yönetim Birimi oluşturulmuş olup Şekil 6’da verilmektedir.

MRM16 Su yönetim birimini temsil eden İç Körfezin su kalitesi Su Çerçeve Direktifi sınıflandırmasında “Kötü Su Kalitesi” olarak değerlendirilmiştir. Bunun nedeni bentik kalitenin daha da azalmış olmasıdır. Akabinde yıllara sarı olarak gerçekleştirilen Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme Programı çerçevesinde güncellenmiştir. 2018 yılında, Körfezde iki su yönetim birimini temsil eden 8 istasyonda örnekleme yapılmıştır (Beken vd., 2018). Bentik kalite 2017 yılında orta (Beken vd.,2017), 2016 yılında ise zayıf olarak değerlendirilmiştir (Beken vd., 2016). M17 su yönetim birimini temsil eden orta ve dış körfez ise “Zayıf Su Kalitesi” olarak Tablo 2’de değerlendirilmiştir.



Şekil 6. İzmit Körfezi Kıyı Su Kütleleri Ekolojik Kalite Değerlendirme(Beken vd., 2013).

Figure 6. Coastal Water Bodies Ecological Quality Assessment in Izmit Bay (Beken et al., 2013).

Tablo 2. İzmit Körfezi Kıyı Su Yönetim Birimlerinin 2018 yılı Ekolojik Kalite Durum Değerlendirmesi.

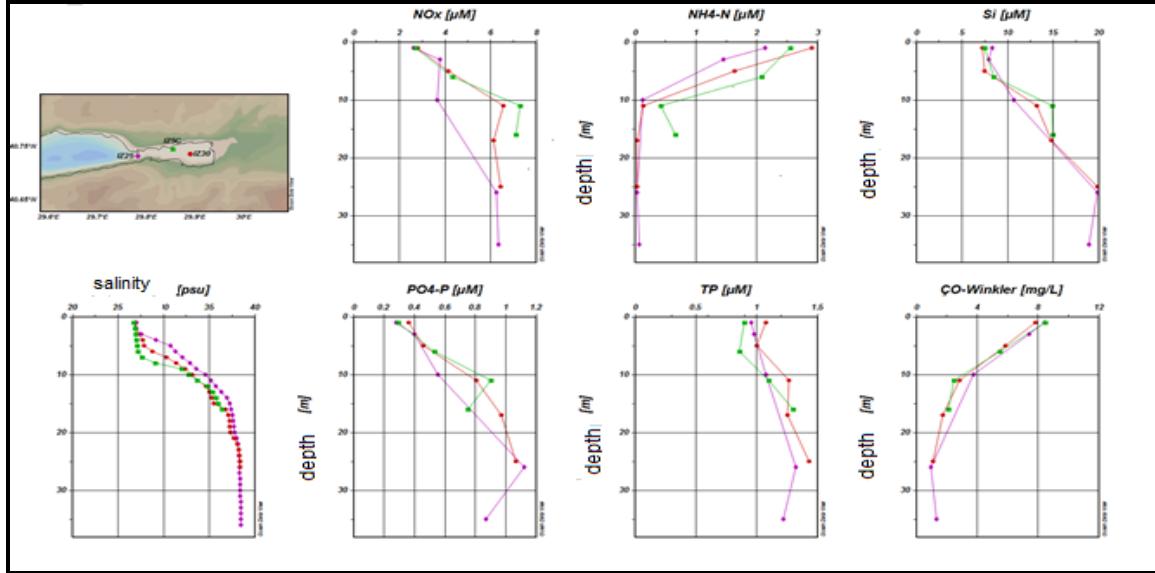
Table 2. Ecological Quality Status Assessment of Coastal Water Management Units in Izmit Bay in 2018.

Su Yönetim Birimleri	TP( $\mu\text{gr-at/L}$ )	NOx( $\mu\text{gr-at/L}$ )	SDD(m)	Klorofil( $\mu\text{g/L}$ )	
	(TP ve NOx kış/İlkbahar,SDD yaz)			İlkbahar(Kış)	(Yaz)Sonbahar
MRM16: İZ30,İZ25,İZ5C	0,98/1,24	3,46/0,05	2,6	5,7(5,05)	(2,78)
MRM17:İZ17, İZ7, İZ2, İZ15, İZ9	0,93/0,50	4,33/0,05	4,2	3,84(4,03)	(0,86)

MRM16 su yönetim biriminde yer alan iç körfezde; PO4-P ( $\mu\text{M}$ ), TP ( $\mu\text{M}$ ) ve Çözülmüş Oksijen ( $\text{mg/L}$ ) değişimleri Şekil 7’ de verilmiştir. İstasyonların tümünde kış döneminde yüzeyde NH4 2-3  $\mu\text{M}$ , TP ise 1  $\mu\text{M}$  olarak ölçülmüştür. MRM17 su yönetim biriminde bulunan ölçüm istasyonlarında Şekil 8’ de görüldüğü üzere kış döneminde, Fosforlu bileşiklerin İZ15 istasyonunda yüksek olduğu tespit edilmiştir. İZ17 ve İZ7 istasyonlarında kış dönemi de yüksek

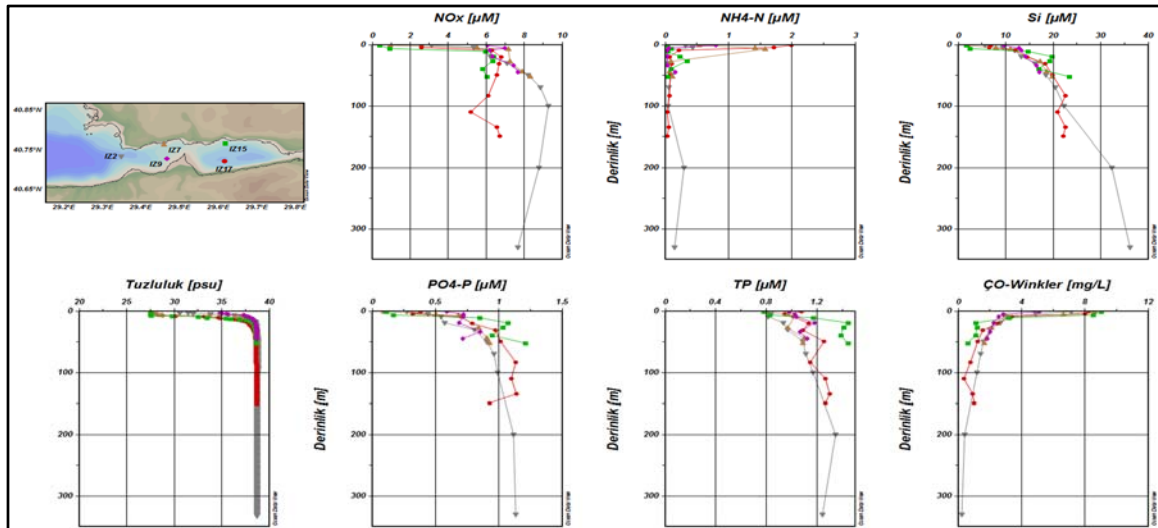
NH4-N bulunmuştur. Derin olan İZ2 ve İZ17 istasyonlarının dip sularındaki ÇO değerleri düşük olup kritik seviyededir.

İZ17 ‘de kış döneminde 1.0  $\text{mg/L}$ , ilkbaharda 0.7  $\text{mg/L}$  ve yazın 0.2  $\text{mg/L}$  seviyelerinde ÇO ölçülmüştür (Beken vd.,2018). Bu sonuçlar Körfezin su kalitesinin iyi olmadığını bir göstergesi olup Körfez üzerinde kara kökenli kirleticiler ve limancılık faaliyetinden kaynaklı kirlilik etkendir.



Şekil 7. MRM16’da bulunan istasyonlara ait 2018-Kış besin elementleri ve çözülmüş oksijen konsantrasyonlarının düşey dağılımları (Beken vd., 2018).

Figure 7. Vertical distribution of nutrients and dissolved oxygen concentrations of stations in MRM16 in 2018’s winter (Beken et al., 2018).



Şekil 8. MRM17’de bulunan istasyonlara ait 2018-Kış besin elementleri ve çözülmüş oksijen konsantrasyonlarının düşey dağılımları (Beken vd., 2018).

Figure 8. Vertical distribution of nutrients and dissolved oxygen concentrations of stations in MRM17 in winter in 2018 (Beken et al., 2018).

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Yarı kapalı bir körfez olan İzmit Körfezi kıyılarında çok yoğun endüstri kuruluşları ve bunun yanı sıra yoğun denizcilik faaliyetlerinin baskısı kirletici seviyelerindeki artışa sebebiyet vermektedir.

Gerçekleştirilen izleme çalışmaları sonucunda İzmit Körfezi çevresinde yoğun endüstri faaliyetlerinden dolayı iç körfezde Civa, Nikel, Bakır ve Arsenik’ te artışın olduğu söylenebilir. Nitekim son yıllarda yapılan çalışmalar da bunu desteklemektedir.

İzmit İç körfezinde (Cıva, Çinko, Nikel, Bakır ve Arsenik) yoğunlaştığı ve sediman metal içerikleri Al ile normalize edilerek, şeyl ortalamasına göre hesaplanan metal zenginleşme faktörleri karşılaştırıldığında; “yüksek” zenginleşmenin Cıva elementi için gözlemlendiği söylenebilir. Körfezde sediman örneklerinin metal içerikleri Tablo 3’ te

**Tablo 3.** İzmit Körfezi 2016 yılı sediman örneklerinin metal içerikleri(mg/kg ka) (Beken vd., 2016).  
**Table 3.** Metal contents of sediment samples (mg/kg ka) in İzmit Bay in 2016 (Beken et al., 2016).

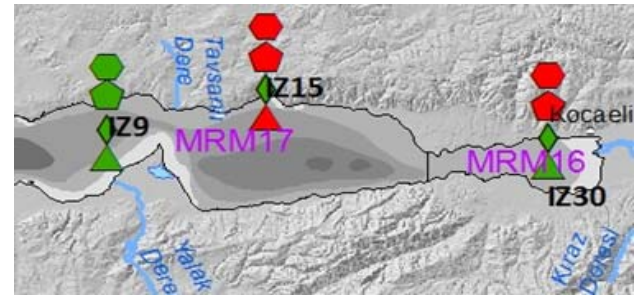
İstasyon Adı	R	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	Hg
İZ30	R1	10,99	0,363	19,23	77,26	72,11	45639	459,2	47,95	28,18	139,16	1,105
	R2	11,13	0,877	17,37	83,43	87,05	42223	401,7	50,95	36,87	214,71	3,133
	R3	10,65	0,893	18,76	76,10	75,50	45341	430,8	45,09	33,30	243,51	3,056
İZ15	R1	13,96	15,99	15,99	95,83	61,32	40035	476,7	58,27	53,52	180,34	1,130
İZ19	R1	9,28	17,18	17,18	88,97	75,83	42469	489,4	49,79	24,70	104,76	0,064

İzmit Körfezinde genel olarak 16 PAH bileşeninin toplamına bakıldığında Toplam petrol hidrokarbonlarında olduğu gibi, İzmit iç körfezde yüksek derişimlerin olduğu tespit edilmiştir. Sanayinin yoğun olduğu İzmit Körfezinde PAH kirliliği riskinin yüksek olduğu limanların bulunduğu bölgelerde (örneğin İzmit Rafineri Bölgesi) örnekleme istasyonlarının artırılması gerekmektedir. PCB bileşenlerin toplam değerleri incelendiğinde ise genel olarak tüm istasyonlarda, ekosisteme etki açısından etki sınırının altında olduğu tespit edilmiştir. Sadece İzmit Körfezi’nde (İZ30-İZ15) ERL(Effects Ranges Low) değerinin üstünde toplam PCB değerlerine ulaşılmıştır. DDT ve türevlerinin tüm istasyonlarda türevlerinin toplamının ekosisteme etki açısından etki sınırının üstünde olduğu gözlenmektedir. Diğer organoklorlu pestisitler incelendiğinde (a-BHC, b-BHC, d-BHC, Lindane, Endrin ve Aldrin) İzmit Körfezinde derişimlerinin ERL üstünde olduğu belirlenmiştir. Toplam petrol hidrokarbon açısından en fazla sedimanda birikimin İzmit iç körfez, rastlandığı tespit edilmiştir. PCB bileşenlerin toplam değerleri incelendiğinde genel olarak tüm istasyonlarda, ekosisteme etki açısından etki sınırının altında olduğu tespit edilmiştir. Sadece İzmit Körfezi’nde (İZ30-İZ15) ERL(Effects Ranges Low) değerinin üstünde toplam PCB değerlerine ulaşılmıştır.

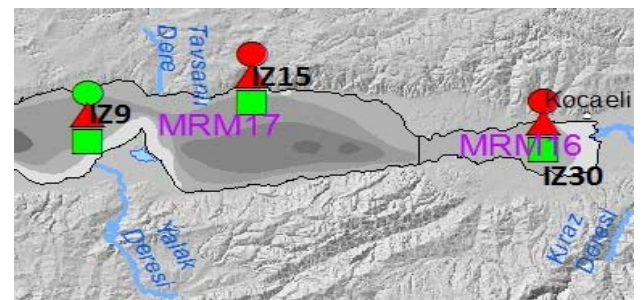
Mevcut durum değerlendirildiğinde evsel atıksulardan kaynaklı baskının yanı sıra endüstrilerden yoğun kirletici yükünün geldiğini ayrıca, gemi trafiği ve limancılık faaliyetleri de göz önünde bulundurulduğunda ciddi kirletici yükünün körfez üzerinde baskı unsuru oluşturduğunu söyleyebiliriz. Diğer bir konu ise Körfezin bulunduğu havza içerisinde çok sayıda dere ve küçük

verilmektedir. Gerçekleştirilen izleme çalışmalarında 2017 ve 2018 yıllarında sedimanda metal ve organik kirleticilerin durum değerlendirmesi yapılmamıştır. İzmit Körfezinin bu çerçevede durum değerlendirmesinde 2016 verileri dikkate alınmıştır.

akarsu bulunmaktadır. Bu akarsu ve derelerin büyük bir bölümü Körfeze ulaşmadan önce geçtikleri bölgedeki birçok sanayi tesisi ve yerleşim alanı tarafından atıksuların taşınımı amaçlı olarak kullanılmakta ve bu yükler Şekil 11’ de görüldüğü üzere Körfeze taşınmaktadır (Beken vd., 2016).

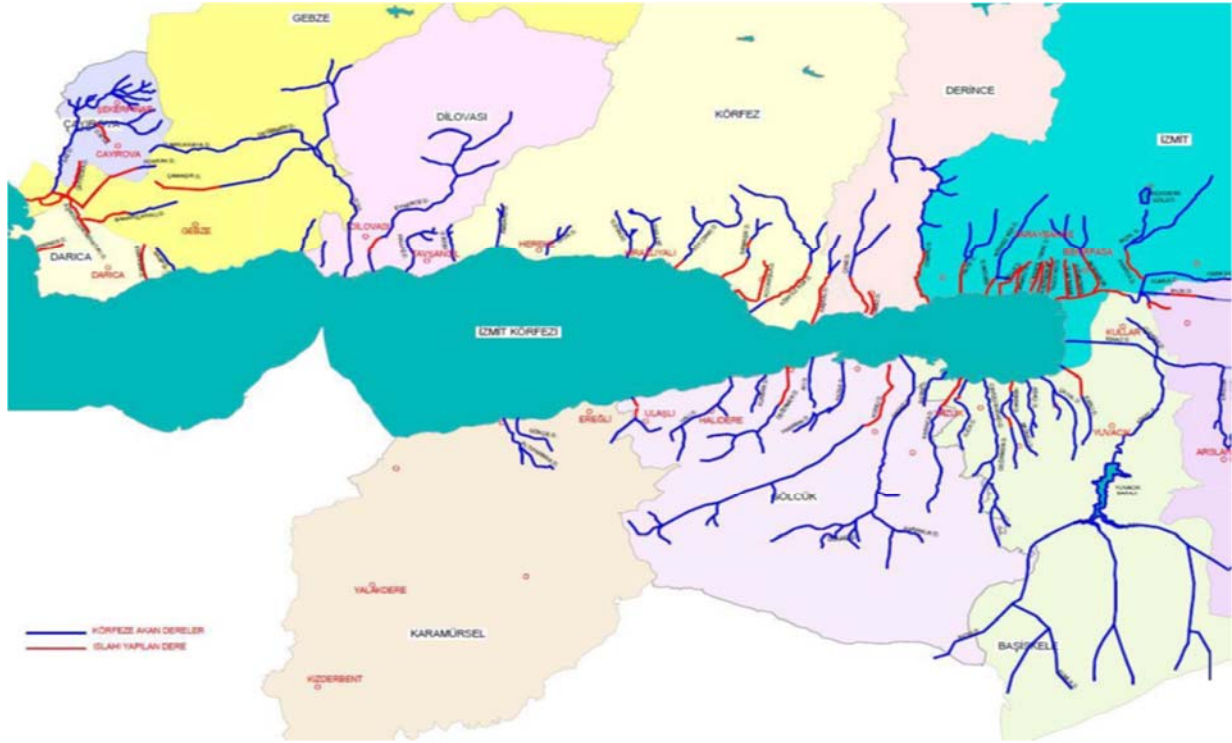


**Şekil 9.** İzmit körfezi metal kirliliği durum değerlendirmesi.  
**Figure 9.** Metal pollution state assessment in İzmit Bay.



**Şekil 10.** İzmit körfezi organik kirleticiler durum değerlendirmesi.  
**Figure 10.** Organic pollutants state assessment in İzmit Bay.





**Şekil 11.** İzmit Körfezi'nde mansaplanan derelerin genel durumu (Önem, 20159).

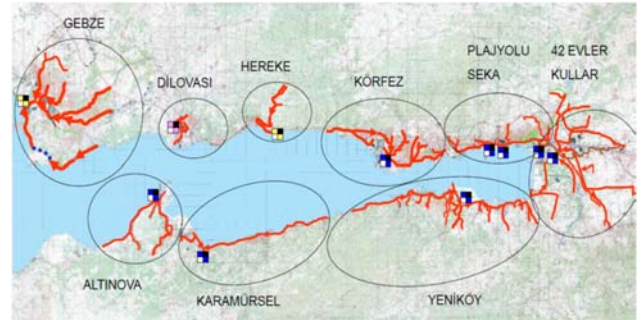
**Figure 11.** The general state of rivers flowing in the Sea in Izmit Bay (Önem, 2015).

Diğer taraftan tarım sektöründe toprağın verimini arttırmak amacıyla uygulanan doğal ve sentetik gübrelerin yüzey sularında ötrofikasyona sebep olduğu da bilinmektedir.

Evsel ve endüstriyel atıksular için temel sorun, çevre mevzuatı kapsamındaki düzenlemelerin gerek yönetmelik hükümleri ve deşarj limitleri bakımından gerekse de uygulamadaki proses seçimi aşamasında, alıcı ortam özelliklerinin, Körfezin özgün oşinografik yapısı bağlamında, göz önüne alınmaması olarak karşımıza çıkmaktadır. İzmit Körfezi'ne son 30 yılda karasal girdilerin deşarj edilmesi, hem suyun kalitesini hem de ortamda yaşayan canlı yaşamı olumsuz yönde etkilemiştir. Çevrenin atıksu deşarjlarından kaynaklanan olumsuz etkilerinden korunmasını sağlamak için arıtma tesislerinin, atıksuların ve alıcı ortamın düzenli olarak izlenmesi gerekmektedir. Benzer nitelikte atıksu üreten endüstriler ve yerleşimlerin birbirine olan uzaklığı, coğrafik ve topografik özellikleri ile büyüklükleri de dikkate alınarak ekonomik ve teknik açıdan fizibil olanlar için ortak atıksu arıtma tesisinin kurulması esastır (Avaz vd., 2011).

Tarımsal mücadelede kullanılan ilaçlarının başında yer alan insektisit ve pestisitler ise toprak tipi ve iklim faktörlerine bağlı olarak yüzey ve yer altı sularına karışmaktadır. Özellikle ötrofikasyon problemi gözlenen yerler başta olmak üzere, bu problemi önlemek amacıyla akarsulardaki besin madde konsantrasyonunun azaltılması gerekmektedir. Ayrıca diğer önemli bir husus, Şekil 12' de verildiği üzere Körfez'de atıksu arıtma tesislerinde azot

fosfor giderici ileri arıtma teknolojilerinin sürekliliğinin sağlanması yönünde gerekli denetimlerin yapılması ve takibinin sağlanarak gerekli olduğu durumlarda 2872 sayılı Çevre Kanunu kapsamında idari yaptırımların uygulanması önem arz etmektedir.



**Şekil 12.** İzmit Körfezi'nin etrafında bulunan Atıksu arıtma tesisleri ve Kollektör hatları (Önem, 2015).

**Figure 12.** The Location of Wastewater treatment plants and Collector lines around Izmit Bay (Önem, 2015).

Körfez' in kirlilikten korunması amacıyla bölgesel düzeyde etkinlikler gerçekleştirilerek bu konuda kamuoyunun dikkatini çekerek çevre bilinci oluşturulması önem arz etmektedir. Özellikle farkındalık oluşturulması kapsamında, Kamu kurumlarının Sivil toplum kuruluşları ile işbirliği içerisinde olması desteklenmelidir. Sonuç olarak, Yıllara sari olarak gerçekleştirilen Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme Programı kapsamında İzmit İç Körfez mevcut durumunu korumuş olup biyolojik kalite elemanları değerlendirmesi ve körfezdeki baskı unsurları

da dikkate alındığında Zayıf Su kalitesi ve Kötü su kalitesi olarak değişim göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı ve TÜBİTAK /MAM tarafından desteklenen “Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme Projesi” ve diğer bilimsel çalışmalar kapsamında derlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Avaz, G., Başar, H.M. & Canlı, O. (2014).** Ülkemiz Kıyı ve Geçiş Sularında Tehlikeli Maddelerin Tespiti ve Ekolojik Kıyı Dinamiği Projesi (2012-2014). Tarım ve Orman Bakanlığı ve TÜBİTAK MAM, ÇTÜE 512870, Rapor No. ÇTÜE.14.178. TÜBİTAK MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, Ankara-2014.
- Avaz, G., Tuğrul, S. & Küçüksezgin, F. (2011).** Türkiye Kıyılarında Kentsel Atıksu Yönetimi: Sıcak Nokta ve Hassas Alanların Yeniden Tanımlanması: Atık Özümsene Kapasitelerinin İzleme Modelleme Yöntemleriyle Belirlenmesi ve Sürdürülebilir Kentsel Atıksu Yatırım Planlarının Geliştirilmesi Projesi, Proje Ortakları: TÜBİTAK MAM, ODTÜ DBE, DEÜ DBTE, 106G124 Nolu TÜBİTAK KAMAG 1007 Projesi, Müşteri: T.C. Mülga Çevre ve Orman Bakanlığı, Gebze, Kocaeli.
- Ayaz, S. (2019).** Havza Koruma Eylem Planlarının Hazırlanması Projesi, Marmara Havzası Nihai Raporu, Rapor No. 5098115(ÇE.10.49), TÜBİTAK MAM Matbaası, Aralık 2019, Gebze, Kocaeli.
- Balkış, N. (2003).** Seasonal variations in the phytoplankton and nutrient dynamics in the neritic water of Buyukcekmece Bay, Sea of Marmara", *Journal of Plankton Research*, 25,703-717, 2003.
- Beken, Ç., Atabay, H. & Tolun, L. (2018).** Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme İşİ, 2018. Marmara Denizi Final Raporu, TÜBİTAK MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, Ankara.
- Beken, Ç., Aydoğan, C., Ediger, D., Hüsrevoğlu, S., Mantıkçı, M., Aydoğan, C., Olgun, A., Sözer, B., Tan, İ., Karakoç, F., Tolun, L., Tutak, B., Tüfekçi, H & Tüfekçi, V. (2013).** Deniz ve Kıyı Suları Kalite Durumlarının Belirlenmesi ve Sınıflandırılması (DEKOS) projesi final raporu, Rapor No. ÇTÜE.13.155, Şubat 2014, TÜBİTAK MAM, Gebze, Kocaeli.
- Beken, Ç., Atabay, H., Tan, İ. Tolun, L. & Aydoğan, C. (2014).** Marmara Denizi Bütünleşik Kirlilik İzleme Sonuç Raporu, Rapor No. 5148704, TÜBİTAK MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, Ankara.
- Beken, Ç., Atabay, H., Tüfekçi, H., Tan, İ., Mantıkçı, M., Tolun, L & Aydoğan, C. (2016).** Marmara Denizi Bütünleşik Kirlilik İzleme Final Raporu, Rapor No. 5148704 (ÇTÜE.16.330), TÜBİTAK MAM Matbaası Gebze, Kocaeli, Ankara.
- Beken, Ç., Atabay, H., Tolun, L., Tan, İ., Partal, F., Aslan, E., Mutlu, S & Aydoğan, C. (2017).** Denizlerde Bütünleşik Kirlilik İzleme Sonuç Raporu, Rapor No. 5178702(ÇTÜE.17.2116) TÜBİTAK MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, Ankara.
- Beken, Ç., Atabay, H., Tolun, L., Tan, İ., Partal, F., Aslan, E., Mutlu, S., Aydoğan, C & Kaman, G. (2018).** Marmara Denizi Bütünleşik Kirlilik İzleme Final Raporu, Rapor No.5178702 (ÇTÜE.2018/72), TÜBİTAK MAM Matbaası, Gebze, Kocaeli, Ankara
- Bostan, Ü. (2017).** İzmit Körfezi Kirlilik Önleme ve Atıksu Arıtma Çalışmaları,III: Marmara Denizi Sempozyumu Sonuç Raporu, Marmara Belediyeler Birliği.
- Ediger, D., Beken, Ç., Tolun, L. & Tüfekçi, V. (2013).** İzmit Körfezi Su Kalitesinin ve Karasal Girdilerin İzlenmesi ve Kirliliğin Önlenmesine Yönelik Önerilerin Geliştirilmesi Projesi Sonuç Raporu, 104 sayfa, Kodu: 5118701 ÇE 12.78, TÜBİTAK MAM Çevre Enstitüsü, Gebze, Kocaeli.
- Kahraman, N., Önem, M. & Deniz, M. (2013).** Marmara Denizi'nin Mevcut Durumu: "İzmit Körfezi Örneği". *Su ve Teknolojileri Dergisi*, 57. 56, Haziran 2013.
- Kahraman, N., Önem, M. & Deniz, M. (2016).** Water Quality Monitoring Policies; Model Of Izmit Bay". I. Ulusal Denizlerde İzleme ve Değerlendirme Sempozyumu, 21-23 Aralık 2016, İstanbul.
- Morkoç, E., Tüfekçi, V., Okay, O.S., Egesel, L., Tüfekçi, H. & Orhon, S. (1995).** İzmit Körfezi Su Kalitesinin Özellikleri Teknik Raporu, TÜBİTAK-MAM, Gebze, Kocaeli, 56s.
- Müftüoğlu, A.E., Aksu, A., Demirel, N. & Erşan, M.S. (2010).** Marmara Denizi Kirlilik İzleme Çalışması. Çevre ve Orman Bakanlığı, 2010, Ankara.
- Oguz, T. & Sur, H.I. (1986).** A Numerical Modelling Study of Circulation in the Izmit Bay. TUBİTAK. Final Rep., Gebze, Turkey.
- Okay, O.S., Tolun, L. Telli-Karakoç, F., Tüfekçi, V., Tüfekçi, H. & Morkoç, E. (2001).** İzmit Bay ecosystem after Marmara earthquake and



subsequent fire: The long term data. *Marine Pollution Bulletin*, 42(5), 361-369.

- Okuş, E. & Taş, S. (2001).** İzmit Körfezi'nde Fitoplankton Dağılımı, IV. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Bodrum, 38-39.
- Orhon, D., Gönenç, E., Tünay, O. & Akkaya, M. (1984).** The prevention and removal of water pollution in the Izmit Bay: Determination of the technological aspects. Technical Report, ITU- Civil Eng. Pub., 373p.
- Önem, M. (2015).** Marmara Denizi Kıyı Koruma Uygulamaları: İzmit Körfezi Örneği, 2. Marmara Denizi Sempozyumu, 22-23 Aralık 2015, İstanbul, 121-125.
- Sur H.İ., Güven, K.C., Okuş, E., Algan, O., Gaziođlu, C., Yüksek, A., Altıok, H., Balkis, N., Taş, S., Aslan-Yılmaz, A., Yılmaz, N., Müftüoğlu, E., Karhan, Ü., Aksu, A., Demirel, N., Cumali, S., Özcan, F., Özsoylu, B. & Kirci Elmas, E. (2006).** Sampling programme at the Sea of Marmara of behalf of MEMPIS Project. Sur, H.İ. (ed.), Yılmaz, N, (assist. ed.) Final Raporu, İstanbul, 50-71.
- Sur, H.İ., Güven, K.C.E., Okuş, O., Algan, C., Gaziođlu, A., Yüksek, H., Altıok, N., Balkıs, S., Taş, A., Aslan-Yılmaz, N., Yılmaz, A.E., Müftüoğlu, Ü., Karhan, A., Aksu, N., Demirel, S. Timur, A., Dumlu, G., Timur, H., Çiler, M. & İlhan, R. Balkaş, T. (1982).** The prevention and removal of the water pollution in Izmit Bay: Determination of technological aspects, TUBITAK- MRI, Chem. Dept. Publ. No. 106, 383s.
- Sur, H.İ., Apak, R., Yüksek, A., Altıok, H., Taş, S., Balkıs, N., Ünlü, S., Erçağ, E. & Yılmaz, N., (2010).** Marmara Denizi Kirlilik İzleme Projesi Final Raporu, Çevre ve Orman Bakanlığı, 2010, İstanbul, 60-63.
- Şahin, O.A. (2015).** *İzmit Körfezi Deniz Trafiğinin Iwrap Model Kullanılarak İncelenmesi.* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2015, İstanbul. 5-56.
- Yerli, B., Cebeci, M., Göksungur, E.E. & Erdem, Ü., (2006).** İzmit Körfezi'nde Besin Elementlerine Bağlı Fitoplankton Dağılımı. *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 7(1), 229-237.



## Medaka (*Oryzias latipes*) Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (*g6pd*) Geninin Genomik Organizasyonu

Mehtap BAYIR\*

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, ERZURUM

Geliş/Received: 04.12.2019

Kabul/Accepted: 04.02.2020

Atıf yapmak için: Bayır, M. (2020). Medaka (*Oryzias latipes*) Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (*g6pd*) Geninin Genomik Organizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hayv. Dergisi*, 5(1), 38-44.

How to cite: Bayır, M. (2020). Genomic Organisation of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (*g6pd*) Gene of Medaka (*Oryzias latipes*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 38-44.

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7794-1058>

\*Sorumlu yazarın:

Mehtap BAYIR

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE

✉: [mehtap.bayir@atauni.edu.tr](mailto:mehtap.bayir@atauni.edu.tr)

Cep telephone : +90 (544) 676 91 87

**Öz:** Ekzotermik canlılar, serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunabilmek için güçlü enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemine gereksinim duyarlar. Çalışmada Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (*g6pd*) enzim geninin tercih edilme nedeni, antioksidan savunma sistemin temel enzimlerinden birisi olmasıdır. Araştırmada medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* geninin yapısı (ekson ve intron dizilimleri, TATA kutusu, CAAT kutusu, Poli A kuyruğu) belirlenmiş, bu genin transkribe ettiği amino asitler tespit edilmiş ve diğer omurgalılarda aynı gen tarafından üretilen protein dizilimleri NCBI veri tabanı ve ENSEMBL veri tabanlarından elde edilerek Bioedit programında dizileme işlemi yapılmış, benzerlik-özdeşlik oranları % olarak hesaplanmış ve tablo olarak verilmiştir. Ayrıca yine elde edilen protein dizilimleri esas alınarak, BioEdit yazılımı ve MEGA6 programı kullanılarak, medaka (*O. latipes*) ve diğer bazı omurgalılar arasındaki filogenetik ilişki belirlenmiştir. Medaka *g6pd* geninde bulunan, plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigroviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd/G6PD* genlerinin kromozomlar üzerinde buldukları bölgeler belirlenerek manuel olarak korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir. Teleost balıkların stres oluşturan etmenlere karşı vermiş oldukları tepkiler, moleküler çalışmalarla ölçülmesi mümkün olan tepkilerdir ve dolayısıyla çalışılan türün genetik özelliklerinin belirlenmesi biyoteknolojik çalışmalar bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle biyoformatik veri tabanları ve programlar kullanılarak medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin karakterizasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. Böylece balıkların moleküler stres cevabı çalışmalarında kullanılabilen öncü veriler, bu araştırma ile bilim dünyasına sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Medaka, biyoformatik, model organizma.

## Genomic Organisation of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (*g6pd*) Gene of Medaka (*Oryzias latipes*)

**Abstract:** Exothermic organisms need a strong enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system in order to be protected from the harmful effects of free radicals. The reason of Glucose 6 phosphate dehydrogenase (*g6pd*) enzyme gene is preferred in the study that this enzyme is one of the essential enzymes of the antioxidant defense system. In the study, the structure of the medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* gene (exon and intron sequences, TATA box, CAAT box, Poly A tail) was determined, amino acids transcribed by this gene were detected and protein sequences produced by the same gene in other vertebrates were recorded using data obtained from NCBI and ENSEMBL database, and the sequence of similarity-identity (%) was calculated and given as a table. Furthermore, based on the obtained protein sequences, the phylogenetic relationship between the medaka (*O. latipes*) and some other vertebrates was determined using BioEdit software and MEGA6 program. Conserved gene synthesis was designed by manually identifying the regions on the chromosomes of zebrafish, fugu, stickleback, platyfish and human *g6pd* genes of the conserved genes identified in the medaka. The responses of teleost fish to stress factors are possible to be measured by molecular studies and therefore it is very important for biotechnological studies to determine the genetic characteristics of the species studied. For this reason, characterization and identification of *g6pd* gene was performed by using bioinformatics databases and programs. thus, the pioneering data that can be used in molecular stress response studies of fishes have been presented to the scientific world with this research.

\*Corresponding author's:

Mehtap BAYIR

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE

✉: [mehtap.bayir@atauni.edu.tr](mailto:mehtap.bayir@atauni.edu.tr)

Cep telephone : +90 (544) 676 91 87

**Keywords:** Medaka, bioinformatics, model organism.

## GİRİŞ

Medaka (*Oryzias latipes*), Doğu Asya'da yaşayan ve genellikle su, gölet ve çeltik tarlaları gibi tatlı sularında bulunan küçük bir balıktır (Hori, 2011). Medaka (*Oryzias latipes*)'nin fizyolojisi, embriyolojisi ve genetiği son 100 yıldır yoğun bir şekilde çalışılmakla beraber, son yıllarda bu organizmada yapılan çalışmalar, erken gelişim, pigmentasyon, cinsiyet belirleme ve insan hastalıkları için genetik model sistemler olarak kullanılması ve bu balığın biyolojik geçmişi üzerine odaklanmıştır (Naruse et al., 2011). Yamamoto (1951), ilk olarak, medaka için cinsiyet bağlantı haritasını oluşturmuş ve cinsiyetler arasındaki rekombinasyon sıklığındaki farklılıkları tanımlamıştır. Ayrıca ilk defa, balıklarda i ve ci losi arasında otozomal bağlantı olduğunu bildirmiştir. PCR teknolojisinin gelişmesinin ardından, medaka, zebra balığı, kirpi balığı ve diğer balık türlerinde genetik bir bağlantı haritası oluşturmak için birkaç girişimde bulunmuş ve bu deneylerin ilk aşamalarında, önceden herhangi bir genom bilgisi gerektirmediğinden parmak izi (finger-print) tipi işaretleyiciler kullanılmıştır. Daha sonraki aşamalarda, genomun spesifik bölgelerini, sekans bilgisi varlığında çoğaltan tek lokuslu markörler kullanılmış ve etkinleştirilmiş tek lokuslu markörler kullanılarak oluşturulan harita ortolog genler arasındaki bağlantı ilişkilerini karşılaştırmak için kullanılmıştır. Ardından teleostlara spesifik tüm genom çoğaltması uygulanmıştır (üçüncü WGD). Son olarak, tetraodon genom projesine ilaveten medaka genom sekanslama projesi hem medaka hem de tetraodon için yüksek kalitede bir taslak genom sekansı sağlamıştır. Tüm bu veriler, proto-kromozomların duplikasyonundan önce yeniden yapılanması ve mevcut medaka, tetraodon ve zebra balığı genomlarının oluşumuna yol açtığı potansiyel bir senaryoyu ortaya koyan üçüncü WGD'yi doğrulamıştır. Bu analiz ayrıca, teleost (kemikli) balıklarda mevcut ortolog genlerin korunmuş gen sentezini de tanımlamıştır. Son 100 yılda medakada yapılan araştırmalar, çok sayıda önemli biyolojik kaynak sağlamıştır. İlk kaynak, kaynaklardan ilki turuncu-kırmızı ve beyaz medaka gibi gövde rengi mutasyonlarını içermiştir.

Stres cevabının ölçülmesinin önemli bir kolu nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi hücrel oksidasyon radikallerinin meydana getirdiği zararlıdır. Oksijen biyolojik sistemlerde, organizmalar için elzem bir bileşik (Buechter, 1988) olmakla beraber canlı hücrelerinin tamamı, serbest radikaller adı verilen oldukça reaktif olan oksijen türevlerini de (ROS) oluşturabilmektedirler. (Halliwell, 1991; Bartosz, 2003). Canlı sistemlerde oluşturulan bu ROS'ler biyolojik olarak yararlı molekülleri okside ederek normal hücre ve doku fonksiyonlarında değişikliklere yol açabilirler. Bu oksidasyon oldukça kompleks bir sistem olan antioksidan savunma sistemi

(ASS) tarafından minimize edilir. Bu sebeple, aerobik hücrelerde ve dokularda ROS üretimi, molekül oksidasyonu ve antioksidan tüketiminin kararlı bir durumu sürekli olarak devam eder (Filho et al., 2000). Normalde oksidasyon seviyesi, normal hücrel homeostatik mekanizmaları üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle hücre içinde sıkı bir şekilde kontrol edilir. Oksidatif dengeyle alakalı metabolik yollardaki hemostatik dengelere bağlı olan gen ekspresyonundaki düzensizlik kanser, yaşlanma, ailevi ve yaşa bağlı hastalıklarının pek çoğu ile bağlantılı olup, bu bakımdan omurgalı türlerin büyük çoğunluğunda stres tepkilerinin düzenlenmesinde bu genler oldukça büyük öneme sahiptirler (Lushchak, 2011). Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin düzenlenmesinde pek çok önemli gen yollarının rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar arasında antioksidan enzimler predominant olanlardır. Bu genler süperoksit üretiminin bir sonucu olarak metabolik yolda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilmesine neden olurlar (Trachootham et al., 2008). Hücreler, bir takım koruyucu mekanizmalara sahiptir ve bu mekanizmalar özellikle hücreleri serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden korur. Antioksidan sistemler hücreyi oksidatif strese karşı korumakla yükümlü olup, serbest radikaller kadar çeşitlidirler. Antioksidan enzimlerden biri olan G6PD, temel görevi NADPH üretmek olan PPP'nin ilk basamağını katalizleyen anahtar enzimdir (Pilz et al., 1984; Keha & Küfrevioğlu, 1997; Lehninger, 2000, Aytekin & Kargın, 2019). DNA'nın, steroidlerin, yağ asitlerinin, bazı aminoasitlerin ve indirgenmiş glutatyonun sentezinde kullanılan NADPH'lar (Bonsignore et al., 1966; Bonsignore & Flora, 1972) aynı zamanda hücrede hidrojen ve elektron kaynağı olarak görev yapmakta ve hem büyüme hem de üreme proseslerinde esansiyel bir bileşik olarak görev yapmaktadır (Kan et al., 1988). Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz, nükleotid öncülleri ve NADPH de dahil olmak üzere çeşitli temel moleküllerin üretilmesinden sorumlu korunmuş bir yol olan pentoz fosfat yolunun ilk enzimidir (Miclet et al., 2001). NADPH, birçok oksidatif stresin düzenlenmesinde rol oynayan enzimler tarafından, birçok hücrel reaksiyonda kullanılan önemli bir elektron kaynağıdır. Buna göre, bu yardımcı faktör, en az üç antioksidan yolağında, glutation, tioredoksin ve glutaredoxin döngülerinde rol oynar. Glutatyon döngüsünde, NADPH, glutatyon disülfid (GSSG)'e oksidasyonundan sonra serbest radikal temizleyici molekül glutatyonunu (GSH) yeniler. NADPH'den gelen elektronlar, iki GSH molekülü serbest bırakmak üzere GSSG'nin ayrıldığı glutatyon redüktaz tarafından katalize edilen reaksiyon sırasında serbest bırakılırlar. NADPH, diğer antioksidan yollarında da benzer bir rol oynamaktadır (Becker et al., 2003). G6PD enzim aktivitesi balıklarda özellikle beslenme ve çevresel şartlarla

değişiklik göstermektedir ve bu enzimin aktivitesinde olabilecek olağan dışı değişiklikler balık metabolizmasında önemli marazlara yol açabilmektedir (Bayır, 2002).

Çalışmada plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigroviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd/G6PD* genlerinin kromozomlar üzerinde buldukları bölgeler belirlenerek manuel olarak korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir. Teleost (kemikli) balıkların stres oluşturan etmenlere karşı vermiş oldukları tepkiler, moleküler çalışmalar ile ölçülmesi mümkün olan tepkilerdir. Dolayısıyla çalışılan türün, genetik özelliklerinin belirlenmesi bakımından biyoteknolojik çalışmalar oldukça önemlidir. Bu nedenle biyoformatik veri tabanları ve programları kullanılarak medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin karakterizasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. Yapılan bu araştırma ile balıkların moleküler stres cevabı çalışmalarında kullanılabilir, öncü verilerin bilim dünyasına sunulması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Biyofomatik Analizler:** Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (*g6pd*) geninin fonksiyonel bir gen olup olmadığını belirlemek için NCBI veri tabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'nda, gene ait cDNA dizilimi kullanılarak blastma (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) işlemi yapılmıştır. Bu genin fonksiyonel bir gen olduğu doğrulandıktan sonra, geninin tanımlanması ve karakterizasyonu için, ENSEMBL, NCBI, EXPASY gibi veri bankaları kullanılmıştır. Çalışmada *g6pd* genin bir tane izoformu olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada, medaka (*O. latipes*) *g6pd* genine ait korunmuş gen sentezi oluşturmak amacıyla öncelikle bu genin kromozom bölgesi tespit edilmiştir. Daha sonra bu kromozom bölgesinde bulunan diğer genlerin, zebra balığı (*Danio rerio*) ve insan (*Homo sapiens*)'da mevcut gen bölgeleri tespit edilmiş ve korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir (Şekil 1).

CLUSTALW (Thompson et al., 1994) BioEdit programı (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) kullanılarak, medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin diğer bazı omurgalılarla filogenetik yakınlığı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Filogenetik ağaç dizaynında zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), kirpi balığı (*Tetraodon nigroviridis*), makobe ada çiklidi (*Pundamilia nyererei*), insan (*Homo sapiens*), adi sazan (*Cyprinus carpio*), dikenli balık (*Gasterosteus aculeatus*), fare (*Mus musculus*), tavuk (*Gallus gallus*), elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*) *g6pd* protein sekansları

kullanılmıştır. Adı geçen canlılara ait protein dizilimleri Bioedit programında hizalanmış ve daha sonra MEGA6 (Tamura et al., 2013) programı kullanılarak, dış grup olarak zebra balığı (*Danio rerio*) Cu/Zn superoksit dismutaz geni (*Sod1*)'in kullanıldığı filogenetik ağaç, maksimum olasılık metoduna göre dizayn edilmiştir (Kell et al., 2018).

Medaka (*O. latipes*) *g6pd* gen diziliminin tespiti için, ensembl veri bankası kullanılmıştır. Bu veri tabanındaki tek cDNA transkripti olan ENSORLT00000015543.2 kullanılmıştır. Medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin ekson ve intronları, eksonların üretmiş oldukları aminoasitler, *g6pd* geninin 5' ve 3' uçları ve bu bölgede bulunan, transkripsiyon olayında önemli rolü olan yapılardan TATA kutusu ve poli A kuyruğu ile transkripsiyonun başlangıç noktası (+1), dizayn etmiş olduğumuz gen yapısı üzerinde gösterilmiştir (Tablo 1).

## BULGULAR

**Biyofomatik Analizler:** Omurgalıların stres tepkileri, gerek akut gerekse kronik durumlarda karakterize edilebilen fizyolojik yollar arasındaki farklı etkileşimleri de kapsar. Balıkların akut stres yanıtı çevredeki değişikliklerle (örneğin zararlı bir kimyasalla temas, aniden artan sıcaklık veya tuzluluk vs.) beraber değişir (Iwama et al., 1999). Balıkların yaşam ortamları olan suda zaman zaman meydana gelen olumsuzluklardan olan pH ve sıcaklık değişimleri ve oksijen yetersizliği gibi stres etmenleri proteinlerin fonksiyonel yapılarının değişimine neden olmakta ve protein katlanmalarında açılmalar meydana gelebilmektedir. Bunun sonucunda ise bu proteinler hücredeki farklı proteinlerle kümeler meydana getirebilir. Sonuçta uyum bozukluğu dolayısıyla proteinlerde fonksiyon kaybı gerçekleşir (Basu et al., 2000). Dolayısıyla balıkların maruz kalma olasılığı yüksek olan bu tip stres faktörlerinin antioksidan enzim genlerinin ekspresyonlarında meydana getireceği değişiklik oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitli genlerin ve proteinlerin çevresel stres faktörlerine karşı cevaplarının belirlenmesi ve farklı seviyelerde nasıl tanımlandıklarını anlamak için deneysel kanıtlardan önce biyoformatik çalışmaların tamamlanmış olmasına ihtiyaç duyulur. Medaka (*O. latipes*) model organizma olarak büyük önem taşıyan bir organizma olduğu için, *g6pd* antioksidan enzim geninin ayrıntılı biyoformatik çalışmasının yapılması büyük önem taşımaktadır. Yapılan bu araştırmada, medaka balığının *g6pd* genine ait ayrıntılı biyoformatik çalışmalar tamamlanarak hem balık fizyolojisi çalışmalarına hem de model organizma olması açısından diğer pek çok akvakültür çalışmasına sunulacak temel biyoformatik veriler paylaşılmıştır.

Biyoenformatik çalışmalar kapsamında, öncelikle *g6pd* geninin genomik verilerine ulaşmak için ENSEMBL, UNIPROT ve NCBI veritabanları kullanılmış ve istatistiksel değerlendirmeler için BioEdit yazılımı, BLOSUM62 matris programı ve MEGA6 programı bilgisayarlı algoritmalar dan yararlanılmıştır. Ensembl veri tabanından medaka balığının *g6pd* genine ait cDNA sekansı elde edildikten sonra yine aynı veri tabanı kullanılarak bu genin ekson (13 tane) ve intronlarına (12

tane) ulaşılmıştır. Genin 514 amino asit ürettiği tespit edilmiş olup, bu amino asitler ve hangi eksonlar tarafından üretildiği Tablo 1’ de gösterilmiştir. İtronlarının hepsinin gt-ag kuralını takip ettiği görülmüştür. Belirlemiş olduğumuz gen yapısında intronlar, 5’ ve 3’ uçları küçük harflerle, eksonlar ise büyük harflerle gösterilmiştir. Protein üretimin metiyonin ile başladığı ve stop kodununun ise TAA olduğu tespit edilmiştir.

**Table 1.** Medaka (*Oryzias latipes*) glukoz 6 fosfat dehidrojenaz gen yapısı.

**Table 1.** Gene structure of Medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* gene.

<pre> ccccagatcttttcaaaagcgaacaaagatttttttaaatgttctatttatttgcagaat ctgcagagaagagctaaacacacgcccgccttattactgttagaacaacgaatgtgtac cagcagccacccatgtggacaatcacacaaggttgggagcggagtcattagtcacaagccc tgcccacttgaatttacaatgacgtaagcggcttcgactgtgatggatctcgaagcag cactggtgagtttctcccaaaccaaaTAAATctctcaattctgcttctgatttcaaacg +1 TATA Kutusu GGAAAGTAGACAGCACAAAATCTGAACAAACGCCCGTTCCTGCTGTCAGTTCAGTCTGC ACACACAGGCTGTGTTCTGCTCGCAGTCAGTCTTCTCAGCGCTTAAACCGCGGTTTG TCTCTTTGGCTgtgagN1768tttagAGAAATGAATCGCCTTCCCGCTTCTCGCTCTG -M-N-R-R-L-P-L-S-R-S- AAGTGTITGGAGAAGTGGGAAGGAGCTTACGATGATGAGGAGTCCACCAATCAGATG E-V-F-G-E-L-R-R-K-E-L-Y-D-D-E-E-F-H-Q-S-D- TGCATATCTTCAATCAATGGGAGCATCGtaagN3327ttagGGGATCTGGCCAGA V-H-I-F-I-I-M-G-A-S- AAAAGATCTACCCAACCTTTGgtgagN68ttagcagGTGGTTGTCAGAGACGGACTCTC K-K-I-Y-P-T-L-W CCGAATCGACCTTTTTTGTCCGCTTGTCCCGCTGACTTGACCGTCGACGCCATACGA -P-E-S-T-F-E-V-G-F-A-R-S-D-L-T-V-D-A-I-R- ACCGGGTGCATGCCATACGAAGtaaaN90cacagGTGGCGGACCGGAAGCAGACCG -T-G-C-M-P-Y-M-K- CTTGTGAGTCTTCTTACGAGCACTCGTACATCAGTGGGAAATATGACAGATGAGAGCTC -L-S-V-F-F-S-R-N-S-G-R-K-Y-A-D-E-S-S- CTTCTCAAAGCTTAACTCGCACATCTGTCTCTCCCTGGAGAAACAGGCAACCCGCT --F-S-K-L-N-S-H-I-L-S-L-P-G-G-N-E-A-N-R-L- CCTTACCTGGCCCTGCCCGCAGCTTACCACGAGCTGACCAAAAACCTCAAATGCA --F-Y-L-A-L-P-P-T-V-Y-H-D-V-T-K-N-L-K-L-Q ATGCATGAGCACCAAGtgcggN268tttagGGGCTGGAACAGGGTCACTGTAGAAAACCG --C-M-S-T-T-K TTTGACATG ATCTTCAGAGCTCAGAGGAGCTCTCTCCCATCTGTCTTCTTTTTGC -F-G-H-D-L-Q-S-S-E-E-E-L-S-S-H-L-S-S-L-F-A- CGAGGACAGATTTACCGCATCGATCATTATCTGGGCAAAAGAAATGGTGCAGAATCTCAT -E-D-Q-I-Y-R-I-D-H-Y-L-G-K-E-M-V-Q-N-L-M- GGTGTCTAGgtgagN346tacagGTTTGGGAACCGAATCTTTGGACCAATCTGGAAACAGA -V-L-R- GACAGTGTGGCATGCGTGTGTTACTTCAAGAACCCTTTGGCACTCAGGGGCGAGGAG D-S-V-A-C-V-V-L-T-F-K-E-P-F-G-T-Q-G-R-G- GCTACTTTGATGATTTTGGTATCATTCGtaagN328atcagAGATGTCATGCAAGCA G-Y-F-D-D-F-G-I-I-R- </pre>	<pre> CTTGTCTCCAGATGCTCTGCCTGGTTGCCATGGAGAAACAGCCTCCACAAGCTCAGATGA --L-L-Q-M-L-C-L-V-A-M-E-K-P-A-S-T-S-S-D-D- TGTGAGAGATGAAAAGgtacaN83catagTAAAGGTTGTAAGTGCATTGCTCCAGTGA --V-R-D-E-K- CCATGTCTGATGTGGTGTGGTCAATATATGGGGAATCCAGACGGTGAAGGAGAAGCCA T-M-S-D-V-V-L-G-Q-Y-M-G-N-P-D-G-E-G-E-A- AATGGGTTATCTCGATGACCCACAGTACCTAAAGGATCCACTCAGGCTACGTTTGCCA K-L-G-Y-L-D-D-P-T-V-P-K-G-S-T-Q-A-T-F-A- CTGCTGTGCTTATGTGCACAACGACGCTGGGATgtaaaN65cttagGTGTTCCGTTTC T-A-V-L-Y-V-H-N-E-R-W-D- ATCCTTCGCTGTGGAAAAGCCCTGAATGAGAGAAAGCCGAGGTGCGGCTGCAGTTCAGC -I-L-R-C-G-K-A-L-N-E-R-K-A-E-V-R-L-Q-F-T- GATGTCCAGGAGACATTTTTGGAAACAGTGTGAGAGGAAATGAGCTTGTGCTGAGTGTG -D-V-P-L-D-H-I-F-G-N-Q-C-Q-P-K-P-I-L-V-Y-K-Y-G- CAGCCAAATGAGGCACTACGCCAAAATGATGAGCAAGAAACCTGGCGTTACTTCAGC -Q-P-N-E-A-I-Y-A-K-M-M-S-K-R-V-P-G-F-V-Y-F-E- CCGGAAGACGGAGCTGGACCTCACATACAGAGCAGATACAAAgtaaN103caagG -P-E-E-T-E-L-D-L-T-Y-K-S-R-Y-K- ATGTGAAGCTTCCAGACGCTACGACCGCTCATCCTGGATGTCTTGTGGGAGTCAGA -D-V-K-L-P-D-A-Y-E-R-L-I-L-D-V-F-C-G-S-Q- TGCATTTCTGCGCAGgtcagN112ttagcagTGAATGAGAGGAAAGCAGTGGCGGATAT M-H-F-V-R-S CACTCTCTCTTCAATAAGACAAAAGAAAGCAAAACCAATCTTCAAAATATGG --T-P-L-L-D-H-Q-I-D-K-E-K-P-K-P-I-L-V-Y-K-Y-G- AAGCCAGGCGCCGAGAGCAGATGAGCTTGTACAGAGTGGATTTGCTATGAAAG -S-R-G-P-A-E-A-D-E-L-V-Q-R-K-V-P-G-F-V-Y-F-E- CACTTATAAGTGGGCTCAACCTCACAACTTTAAgttataagattagaaagtggagg --T-Y-K-W-V-N-P-H-K-L- ggggggggggggtagtcagtagcataaagtgagctagcatgttgcacaaatctgggctctt tgagatggaaactgtttccactgtgtgagccatcaagcagcaaaaaagatgacttaaac aaactctcagaaactcagctcagctgagctcagctcagctcagctcagctcagctcagctc ggcatttgacatgaaaaatgacgtttttcatccattcctggaacttttaagggaaatgtt gtggatgtatccaaaaaaacccaggaatattattttgtgaaatataaatgggtg gaattctattttccagggattaaaggtgttaggatgaggaagtaggtgacaaaaacagcc ttgtcatgattaggaaggaacaaacaaagaatgaaagagtaggaactgggatgtaccaa gtacacttagaacctgagtagaacagaagagctcctcagctcagctcagctcagctcagctc tgcaatgtctttttctttccattcctagagccgagaactgttagtttgcgaaagttaaca tgacttatttttaaaatataatccgaaatagctcctaactgttctctgggaatattac gattgtataaacctttctttgagcattatttttagttagactttctttccaaatgat ataaagatgactttctattttTAAATAGCA </pre>
--	--

\*Medaka balığı (*Oryzias latipes*) glukoz 6 dehidrojenaz (*g6pd*) geni. Ekzonları büyük harflerle, transkripsiyonun başlama noktası +1 ile, intronları ile 5’ utr ve 3’utr bölgeleri küçük harflerle gösterilmiştir. TATA kutusu (TAAAT) ve poli adenilasyon sinyali (AATAAA) büyük harflerle ve san boyanmış olarak gösterilmiştir. Stop kodunu (TAA) asterisk ile gösterilmiştir.

Medaka (*O. latipes*) *g6pd* protein sekansı ile, plati balığı (*Xiphophorus maculatus*), zebra balığı (*Danio rerio*), balon balığı (*Fugu rupripes*), şişen balık (*Tetraodon nigoviridis*) ve insan (*Homo sapiens*) *g6pd* protein sekansları kullanılarak BLOSUM62 matris algoritmasında adı geçen organizmaların % benzerlik-özdeşlik oranları hesaplanmıştır (Gromiha, 2010).

Medaka *g6pd* geni ile plati balığı, zebra balığı, balon balığı, şişen balık ve insan *G6PD* gen ortolojisini görmek için, protein sekansları Bioedit programı kullanılarak dizilenmiş ve benzerlik-özdeşlik oranları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Sonuçta medakanın, plati

balığı ile %91-96, zebra balığı ile %91-95, fugu ile %89-95, tetraodon ile %84-90 ve insan ile %77-88 benzerlik-özdeşlik oranı gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 2). Ensemble genom veri tabanı kullanılarak, Medaka (*O. latipes*) *g6pd* geninin 7. kromozom üzerinde, 5’ bandının 19,213,373-19,223,770 bölgesinde bulunduğu tespit edilmiş ve 7. kromozom üzerindeki diğer genler ve buldukları konum belirlenmiştir. Daha sonra bu genlerin medaka ile zebra balığı ve insanda da bulunduğu bölgeler tespit edilerek, bu bölgelere göre korunmuş gen sentezi dizayn edilmiştir (Şekil 1).



**Tablo 2.** Medaka (Me) ile Plati balığı (Pb), Zebra balığı (Zb), Balon balığı (Fu), Tetraodon (Te) ve insan (In) *G6PD* genleri arasındaki benzerlik-özdeşlik oranları.

**Table 2.** Identity and similarity rate between Medaka (Me) and Platyfish (Pb), Zebrafish (Zb), Fugu (Fu), Tetraodon (Te) and Human (In) *g6pd/G6PD* gene.

Me G6pd 1	--MNRPLRSRSEVFGELR-----KELYDDEEFHQSDVHIFIMGASGDLAK	Me G6pd 285	DEKVKVLKCIAPVTMSDVLGQYMGNDGEGEAKLGYLDDPTVPKGSTQATFATAVLVYH
Pb G6pd 1	--T-----Q-----K-----	Pb G6pd 284	.....T.S.....V.E..D.....
Zb G6pd 1	--S-----Q-----H.TA-----	Zb G6pd 284	.....E..L.....V.D.....K.....K
Fu G6pd 1	--ANI-----HE.K.....V-----	Fu G6pd 285	.....V.AS.....V.D.E..D.Q.....V.....
Te G6pd 1	LCVIMII.VFCAP.R.NGQHLVSLGGVWGAA...RE.K...H...V.....	Te G6pd 301	.....T.AS.....V.D.E.....V.....
In G6PD 1	-MAEQVA...TQ.C.I.....E.FQGD...T-----	In G6PD 286	.....SE.QANN.....V.....TK.....R...T...AV...E
Me G6pd 45	KKIYPTLWLFRRDGLLESTFFVGFARSDLTVDAIRTCGMPYMKVADTEADRLSVFFSRN	Me G6pd 345	NERWDGVVFFILRCGKALNERKAEVRLQFTDVPDIFGNQCQRNELVVRVQPNEAIYAKMM
Pb G6pd 44	.....E.Y.....A.F...TEM.E..A.A..	Pb G6pd 344	.....D.K.....
Zb G6pd 44	.....Q.Y.....IA...V.N.E..AA...	Zb G6pd 344	.....SS.R.....
Fu G6pd 45	.....Q.Y.....A...S...L...TE.S...A..	Fu G6pd 345	.....R...Y.....
Te G6pd 61	.....Q.Y.....A...AS...L...TES.S...A..G..	Te G6pd 361	.....N.....
In G6PD 46	.....I.....N.I...Y...R...AD...KQSE.FF.ATPE.KLK.ED..A..	In G6PD 346	.....H.A...HQ..K...I...V.T...
Me G6pd 105	SYISGYADESSFSKLNHLSLPGNEANRLFYALPPTVYHDVTKNLKQCMSTKGNW	Me G6pd 405	SKKPGVYFSPEETELDLTYKSRKDVKLDPAYERLILDVFCGSMHFVR-SDELREAWRI
Pb G6pd 104	.....EDA...A.M.A...P.....I.QH.....	Pb G6pd 404	.....Y.ANV.YQFVC.....
Zb G6pd 104	.....VE...D.T.L...A.....S.....I.H.....	Zb G6pd 404	.....H...R.....
Fu G6pd 105	.....N.TAGG...E.A.M...ASD...I.S.E.I.HF...A..	Fu G6pd 405	.....T.....
Te G6pd 121	.....N.SA.A.E.A...ASG.....I.S.I.HC...A...T	Te G6pd 421	.....T.....
In G6PD 106	...VA.Q.D.AA.YQR...MNA.HL.SQ.....EA...THES...QI...	In G6PD 406	T...MF.N...S...GN...N.....
Me G6pd 165	RVIVKPPGHDLSSEELSHLSSLFADQIYRIDHYLGKEMVQNLMLRPGNRFPGPIW	Me G6pd 464	FTPLLHQIDKEKPKPIPYKYGSRGFAEDELVQVGVFRYEGTYKWNPHKL
Pb G6pd 164	.....T.....S.....	Pb G6pd 464	.....I.....S..D.K.....
Zb G6pd 164	.....R.....T.E.....	Zb G6pd 463	.....ES..TP..K.....K.....
Fu G6pd 165	.....T.....T.....	Fu G6pd 464	.....E.....K.....R.....
Te G6pd 181	.....T.....T.....	Te G6pd 480	.....R.E.....S.....T.....K.....R.....
In G6PD 166	.....I.....R...DR.N.I...R.....A.....	In G6PD 465	.....EL.....I...T...MK...Q.....
Me G6pd 225	NRDSVACVLTTFKEPFGTQGRGGYFDDFGIIRDVMQNHLLQMLCLVAMEKPASTSSDDVR		
Pb G6pd 224	.....		
Zb G6pd 224	.....S.....		
Fu G6pd 225	.....N.....M.....N.....		
Te G6pd 241	.....N.....M.....N.....		
In G6PD 226	.....NI...I.....E.....E.....N.....		

Özdeşlik Benzerlik

(%) (%)

Me G6pd 464 100 100

Pb G6pd 464 91 96

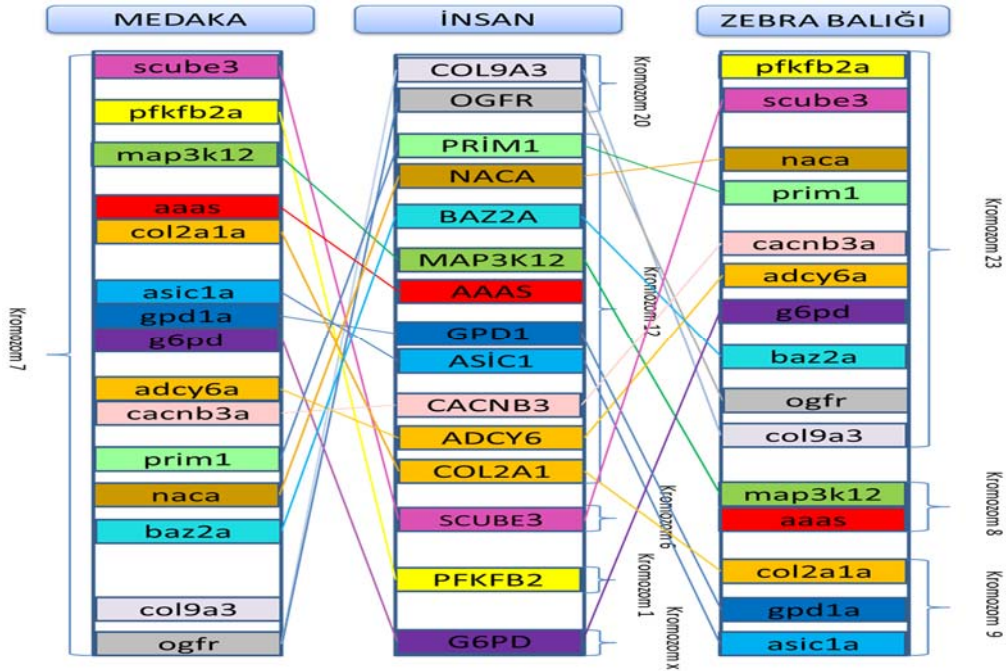
Zb G6pd 463 91 95

Fu G6pd 464 89 95

Te G6pd 480 84 90

In G6PD 465 77 88

\*Şekildeki noktalar benzerliği, kısa çizgiler ise belirlenemeyen aminoasitleri ifade etmektedir.



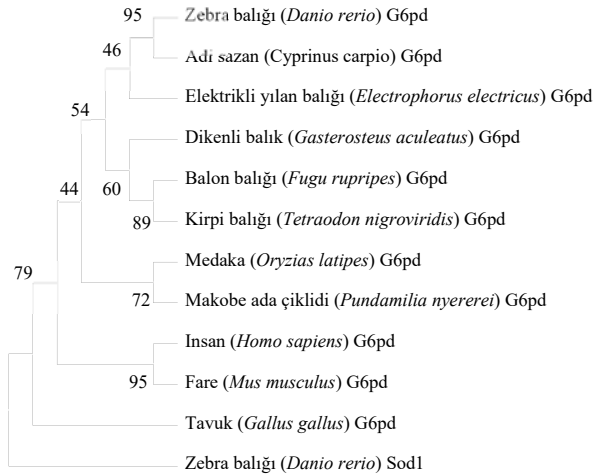
**Şekil 1.** Medaka *g6pd* geni korunmuş gen senzezi.  
**Figure 1.** Conserved gene synteny of Medaka *g6pd* gene.

Oluşturulan korunmuş gen senzezi incelendiğinde, medaka *g6pd* geninin teleost tüm genom duplikasyonu sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Medaka *g6pd* geni ile diğer teleost balıkların ve insanın *g6pd/G6PD* genleri arasındaki korunmuş genlerin medakada 7. kromozomda bulunan *ogfr*, *col9a3*, *ncoa3*,

*prkcbp11*, *prim1*, *baz2a*, *cacnb3a*, *adcya6a*, *gpd1a*, *asic1a*, *scube3*, *col2a1a*, *naca*, *prkfb2a* ve *map3k12* olduğu tespit edilirken; tüm bu genlerin korunmuş olarak insanda (1, 6, 12 ve 12. kromozomlar üzerinde) ve zebra balığında (8, 9 ve 23. kromozomlarda) da bulunduğu görülmüştür. Dolayısıyla medaka *g6pd* geninin korunmuşluk oranın



oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 1). Kemikli balıklarda gerçekleşen tüm genom duplikasyonu sonucunda gen kopyalarının oluştuğu bilinmekle beraber, *g6pd* geninin tek kopya olduğu, bu durumun ise teleost balık genlerinde görülen bir olay olan duplikasyon sonrası gen kopyalarından birinin kaybolduğu düşünülmekte ve korunmuş gen sentezide bu tezimizi desteklemektedir. Medaka (*Oryzias latipes*) *g6pd* geni (ENSORLT00000015543.2) ile omurgalı canlılar olan, zebra balığı (*Danio rerio*), (XP\_021329263.1), balon balığı (*Fugu rupripes*) (XP\_003963491.2), kirpi balığı (*Tetraodon nigroviridis*) (ENSTNIT00000015770.1), makobe ada çiklidi (*Pundamilia nyererei*) (XP\_005732684.1), insan (*Homo sapiens*) (NP\_001035810.1), adi sazan (*Cyprinus carpio*) (XP\_018961996.1), dikenli balık (*Gasterosteus aculeatus*) (ENSGACT00000004022.1), fare (*Mus musculus*) (NP\_032088.1), tavuk (*Gallus gallus*) (XP\_024999465.1), elektrikli yılan balığı (*Electrophorus electricus*) (XP\_026875034.1) *g6pd* genleri arasındaki filogenetik ilişki Mega programı ve maksimum olasılık metodu (Felsenstein, 1989) ile belirlenmiştir. Zebra balığı (*Danio rerio*) *sod1* geni: NP\_571369.1 dış grup olarak kullanılmıştır. Medakanın diğer teleost balıklar ile birlikte kümelenme gösterdiği, insan, tavuk, fare gibi medakanın ortoloğu olan canlıların ise farklı bir bölgede kümelenmediği görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Medaka *g6pd* geni ile diğer teleost balıklar ve medakanın ortologları arasındaki filogenetik ilişki (maksimum olasılık metodu).

Figure 2. Phylogenetic relationship between Medaka and its orthologs *g6pd* gene (Maximum likelihood method)

## SONUÇ

Balıklardaki stres cevapları, farklı gen gruplarının üretmiş olduğu protein veya enzim gibi gen ifade ürünlerinin etkilerini içeren çok yönlü seviyeleri ortaya çıkarabilir. Dolayısıyla strese tepki gösteren bir model

organizma ile ilgili genetik karakteristiklerin anlaşılması moleküler çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Balıkların stres toleransları birbirinden farklı olabildiği için, stres genlerinin ifadesi balıklar arasında farklılık göstermekte ve dolayısıyla bu genlerin karakterizasyonu ve tanımlanması, akvakültür seçim programlarında, stres toleransının geliştirilmesine yardımcı olmak için kullanılabilir önemli veriler olarak kullanılmaktadır. Ayrıca insan başta olmak üzere pek çok omurgalı için bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanılan medaka'da antioksidan enzim genlerinden biri olan *g6pd*'nin (Iwama et al., 1999) biyoenformatik çalışmalarının tamamlanması önemli genetik belirteçler sağlayacaktır. Bu nedenle, çalışmada biyoenformatik veri tabanları ve programlar kullanarak medaka (*O. latipes*)'da antioksidan enzim genlerinden olan *g6pd*'nin karakterizasyonu ve tanımlanması yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aytekin, T. & Kargin, F. (2019). Effect of Copper on G6PD Activity in the Liver, Gill, Kidney and Muscle Tissues of *Oreochromis niloticus*. *Anatolian Environment and Animal Sciences*, 4(2), 60-63.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. & Srivastava, P.K. (2000). Necrotic but not apoptotic heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunology*, 12, 1539-1546.
- Bayır, A. (2002). *Canlı (Gammarus pulex) ve Yaş (sığır dalağı) Yemin Gökkuşluğu Alabalığı (Oncorhynchus mykiss) Yavrularına Belirli Aralıklarla Verilmesinin Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz ve Karbonik Anhidraz Enzim Aktiviteleri ile Büyüme, Yem Değerlendirme ve Yaşama Gücü Üzerine Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum. 154s.
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., & Schirmer, R.H. (2003). Glutathione-functions and metabolism in the malarial parasite Plasmodium falciparum. *Biological Chemistry*, 384, 551-566.
- Buechter, D.D. (1988). Free radicals and oxygen toxicity. *Pharmaceutical Research*, 5(5), 253-260.
- Bonsignore, A., Fornaini, G., Leocini, G., Fontani, A. & Segni, P. (1966). Characterization of leucocyte glucose 6 phosphate dehydrogenase in Sardinian

- Mutants. *Journal of Clinical Investigation*, **45**, 12-16.
- Bonsignore, A., & De Flora, A. (1972).** Regulatory properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Current Topics in Developmental Biology*, **6**, 21-62.
- Filho, W.D., Torres, M.A., Marcon, J.L., Fraga, C.G. & Boveris, A. (2000).** Comparative antioxidant defences in vertebrates-emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, **7**, 33-45.
- Gromiha, M.M. (2010).** Protein sequence analysis. In: Protein Bioinformatics: From Sequence to Function. Elsevier Inc., New Delhi, India, 29-62p.
- Halliwell, B. (1991).** Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, **91**, 14-22.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. & Ackerman, P.A. (1999).** Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoology*, **39**, 901-909.
- Kan, B., London, I.M. & Levin, D.H. (1988).** Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 15652-15656.
- Kell, A.J.E., Yamins, D.L.K., Shook, E.N. & Norman-Haignere S.V. (2018).** A Task-Optimized Neural Network Replicates Human Auditory Behavior, Predicts Brain Responses, and Reveals a Cortical Processing Hierarchy. *Neron*, **98**(3), 630-644.
- Lehninger, A.L., Nelson D.L. & Cox, M.M. (2000).** *Principles of Biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers Inc. New York, 558-560.
- Lushchak, V.I. (2011).** Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **101**, 13-30.
- Miclet, E., Stoven, V., Michels, P.A., Opperdoe, F.R. & Lallemand J.Y. (2001).** NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 34840-34846.
- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M. & Shima, A. (2000).** A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, **154**, 1773-1784.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R.-D. & Huang, P. (2008).** Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, **10**(8), 1343-1374.
- Pilz, R.B., Willis, R.C. & Boss, G.R. (1984).** The influence of ribose-5-phosphate availability on purine synthesis of cultured human lymphoblasts and mitogen-stimulated lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 2927-2935.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. & Mills, K.A. (1995).** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, **30**, 277-290.
- Yamamoto, T. (1951).** Artificial sex-reversal in the genotypic males of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Japanese Journal of Genetics*, **26**, 245.



## Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri

Ayşe KARA<sup>1</sup> Benay TUNÇSOY<sup>2</sup> Pınar ÖZALP<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye

Geliş/Received: 21.11.2019

Kabul/Accepted: 21.02.2020

Atf yapmak için: Kara, A., Tunçsoy, B. & Özalp P. (2020). Cu, Zn ve Karışımlarının *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit Tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 45-51.

How to cite: Kara, A., Tunçsoy, B. & Özalp P. (2020). Effects of Cu, Zn and its mixtures on Hemocyte Types and Counts of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 45-51.

<https://orcid.org/0000-0002-5641-9738>  
 <https://orcid.org/0000-0003-4361-3475>  
 <https://orcid.org/0000-0002-2977-6334>

\*Sorumlu yazarın:

Pınar ÖZALP

Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Bölümü,  
Adana, Türkiye

✉: [pozalp@cu.edu.tr](mailto:pozalp@cu.edu.tr)

Cep telephone : +90 (532) 733 98 62

**Öz:** Yapılan çalışmada, Zn (30 mg/L) ve Cu (10 mg/L)' nun tek başına ve karışım halinde toksik etkilerinin *Galleria mellonella* larvalarının hemosit tipleri ile total ve diferansiyel hemosit sayıları üzerine etkileri incelenmiştir. *G.mellonella* larvalarında prohemosit, granülosit, plazmatosit, sferülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. 72 saatlik etki süresinde Zn ve Cu' in tek başına ve karışım halindeki uygulamalarında total hemosit sayısında (THS) azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarında ise azalma meydana gelmiş, plazmatosit sayılarında ise artış tespit edilmiştir. *G.mellonella* larvalarının hemosit sayılarında meydana gelen değişimler çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmede iyi bir model organizma olarak kullanılabilirliğini ve başka türler üzerinde de yapılacak immünolojik çalışmalara yol gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Bakır, Çinko, *Galleria mellonella*, hemositler.

## Effects of Cu, Zn and its mixtures on Hemocyte Types and Counts of *Galleria mellonella* L. Larvae (Lepidoptera: Pyralidae)

\*Corresponding author's:

Pınar ÖZALP

Cukurova University, Department of Biology,  
Adana, TURKEY.

✉: [pozalp@cu.edu.tr](mailto:pozalp@cu.edu.tr)

Mobile telephone : +90 (532) 733 98 62

**Abstract:** Toxic effects of Zn (30 mg / L) and Cu (10mg / L) applied singly and in mixture were investigated on the total and differential hemocyte counts of *Galleria mellonella* larvae.

Five types of hemocytes were observed in *G. mellonella* larvae; prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, spherulocytes and eunocytoids. Total hemocyte count (THC) decreased when larvae exposed to Zn and Cu concentrations singly and in mixture for 72 hours. Prohemocytes, granulocytes, spherulocytes and eunocytoid numbers were decreased whereas plasmatocyte numbers were increased. Changes in the hemocyte numbers of *G. mellonella* larvae have shown that it can be used as a good model organism in evaluating environmental pollution levels and it can also lead to immunological studies on other species.

**Keywords:** Copper, Zinc, *Galleria mellonella*, Hemocytes.

## GİRİŞ

Çevre kirliliği dünyanın bugüne kadar karşı karşıya kaldığı ciddi problemlerden biridir. Ağır metaller doğada düşük derişimlerde bulunmakla beraber, hızlı nüfus artışı ve buna bağlı olarak artan sanayileşme doğada ağır metal derişiminin artmasına neden olmakta ve çevre kirliliğinin önemli etkenlerden biri olarak kabul edilmektedir (Chouhan vd., 2017; Tunçsoy, 2019). Metal kirliliğinin başlıca kaynağı olan volkanik patlamalar, madencilik ve sanayi endüstrileri, fosil yakıtlarının yanması, hidroelektrik santralleri ve tarım sisteminin oluşturduğu toksik etkiler, organizmalarda birikerek canlılar için bir tehlike oluşturmaktadır (Pandey vd., 2016). Çevre kirleticisi olarak bilinen metal ve metal bileşikler atmosfer, hidrosfer, litosfer ve biyosfer arasında hareket eden tüm ekosistemlerin doğal bileşenleridir (Bargagli, 2000; Büsselberg & Florea, 2006).

Ağır metaller organizmaya besin, su ve hava yoluyla alınabilir, fakat aşırı miktarda alınan metaller organizmada birikerek ekosistemi bozmakta ve çoğu organizmanın yaşamı üzerinde toksik etkiler meydana getirmektedir (Gupta, 2013; Suganya vd., 2016). Ağır metal kirliliği sadece hayvanlarda büyüme, üreme, hayatta kalma ve metabolizma ile değil, aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de zararlı etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle böcekler gibi omurgasız hayvanlar, ağır metal toksisitesini incelemek ve çevre kirliliği düzeylerini değerlendirmek için iyi bir model organizma olarak kabul edilmekte (Wu & Yi, 2015), çevre kontaminasyonunda da yararlı biyoindikatörler olarak kullanılmaktadır (Borowska & Pyza, 2011).

Edinilmiş bir bağışıklık sisteminden yoksun olan böcekler, enfeksiyon ajanlara karşı hızlı ve etkili yanıtlar sağlayarak doğuştan gelen bağışıklık sistemlerine sahiptir. Bu bağışıklık sistemleri humoral ve hücrel yanıtlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Rosales, 2011). Humoral savunma yanıtı antimikrobiyal peptidler (AMPs), hemolenf melanizasyonu ve pıhtılaşması, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerin üretimini içermektedir (Nappi & Ottaviani, 2000; Cerenius & Soderhall, 2004; Kanost vd., 2004; Mastore vd., 2015; Shen vd., 2016). Hücrel savunma yanıtı çeşitli hemosit türleri ile aracılık ettiği fagositoz, nodülasyon ve enkapsülasyonla ilgilidir (Lavine & Strand, 2002; Negri vd., 2014; Wu vd., 2016). Lepidoptera takımı ile yapılan çalışmalarda hemositler prohemositler, plazmatositler, granülositler, sferülositler ve önositoidlerden oluşmaktadır (Ribeiro & Brehelin, 2006; Strand, 2008; Wu vd., 2016).

Prohemositler, hemosit tiplerinden bir veya daha fazlasına farklılaşabilen kök hücreler olarak bilinmektedir (Lavine & Strand, 2002). Plazmatositler, yabancı yüzeylere yapışabilme özelliğine sahiptir ve yara iyileşmesi, nodül oluşumu, fagositoz ve kapsülleme gibi bağışıklık yanıtlarında önemli bir rol oynarlar (Chapman, 1998, Lavine

& Strand, 2002; Levin, 2007). Granülositler, membrana bağlı granüller tarafından morfolojik olarak ayırt edilirler ve yabancı yüzeylere yapışma ve yayılma özelliği ile fagosit olarak da işlev görmektedir (Strand vd., 2006). Sferülositlerin en belirleyici özelliği sitoplazmik boşlukta membrana bağımlı sferül (küresel) şekillerinin olmasıdır (Levin, 2007). Önositoidler, fenoloksidaz (PO) enziminin ana bileşenlerini içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (Lavine & Strand, 2002; Vogelweith vd., 2016).

Çalışmada kullanılan *Galleria mellonella* L. (Büyük balmumu güvesi) Pyralidae familyası, Lepidoptera takımına ait holometabol bir böcektir. Bu tür, hava sıcaklığına uygun bölgelerde yaşayan, hızlı bir üreme döngüsüne sahip ve arıcılık sektörünü de ekonomik sıkıntılara neden olan zararlı bir tür olarak bilinmektedir.

Farklı tür organizmalarda ağır metallerin ve karışımlarının organizmaya alındığında kan hücreleri üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Sunulan çalışmada, bakır (Cu) ve çinko (Zn)' nun tek başına ve karışım halinde farklı derişimlerinin *G.mellonella* larvalarının hemosit tipleri ve sayıları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Larvaların elde edilmesi:** *G. mellonella*,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklık ve  $\%70 \pm 5$  bağıl neme sahip laboratuvar koşullarında Bronksil (1961) tarafından belirlenen yarı sentetik besin kültüründe yetiştirilen larvalardan elde edilmiştir. Stok kültürün devamlılığı besin kavanozu içerisine konulan ergin böceklerin çiftleşerek besin üzerine yumurta bırakmaları ile sağlanmıştır. Deneyleerde bu yumurtalardan çıkan larvalar kullanılmıştır.

**Ağır Metal Derişimlerinin Hazırlanması ve Larvalara Uygulanması:** Cu (10 mg/L), Zn (30 mg/L) ve Cu+Zn (10 mg/L+ 30 mg/L) karışımı ile hazırlanan metal derişimleri, deneyde kullanılan peteklere daldırma metodu ile uygulanmıştır. Hazırlanan her bir besin grubuna beşinci evredeki larvalardan 20 adet eklenmiş, kontrol ve uygulama grupları 72 saatlik deney süresi tamamlanana kadar gün aşırı kontrol edilmiştir. Cu, Zn ve Cu+Zn karışımı ile uygulanmış peteklerle beslenen beşinci evre *G. mellonella* larvaları 72 saat sonunda besin ortamından alınmıştır.

***G. mellonella* Larvalarının Hemosit Tiplerinin Belirlenmesi:** Hemolenf elde edebilmek için uygulamadan 72 saat sonra besin ortamından alınan larvalar  $-20^\circ\text{C}$ 'de 3 dakika bekletilerek hareketlerinin yavaşlaması sağlanmıştır. Larvalar  $\%95$ 'lik etanol ile silindikten sonra, birinci arka bacak üstünden ince uçlu diseksiyon iğnesi ile delinip mikrokapiler tüp (SIGMA) yardımıyla 5 µl hemolenf elde edilmiştir. Hemolenf melanizasyona izin vermeden hızlı bir şekilde daha önce alkolle temizlenmiş lamlar üzerine

alınarak yayılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Lamların kurumasını takiben hemositlerin fiksasyonu için lamlar 5 dakika süre ile metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi içinde bekletildi ve çözelti üzerlerinden akıtılarak kurumaya bırakıldı. Hemositlerin boyanabilmesi için taze olarak hazırlanan Giemsa boya çözeltisi kullanılmıştır. Boyama çözeltisinin hazırlanabilmesi için, 3 ml giemsa boya solüsyonu (MERCK Giemsa's Azure Eosine Methylene Blue Solution), içerisinde 57 ml PBS (pH 7.4) bulunan lam boyama kaplarına yavaşça damlatılarak karıştırılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Tespit işleminden sonra kurutulan lamlar giemsa boya çözeltisi içine alınarak 15 dakika süresince boyanmaları sağlanmıştır. Boyanma süresi sonunda lamlar saf su ile yıkandı, en son PBS (Fosfat buffer saline, Sigma) 'den geçirilmiştir. Kuruma işleminden sonra ksilolden geçirilerek tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, entellan ile kapatılarak Leica DM750 marka mikroskopta hemosit tipleri belirlenerek sayım işlemi yapılmıştır. Total hemosit sayısının belirlenmesinde ise, hemolenf örneğinden 4 µl alınarak, buz üzerinde bekletilen ve içerisinde 36 µl antikoagulant (0,098 M NaOH, 0,186 M NaCl, 0,017 M Na<sub>2</sub>EDTA ve 0,041 M Sitrik asit, pH = 4,5) bulunan ependorf tüplerine aktarılmıştır. 1:10 oranında seyreltme yapılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresine yüklenmiştir. Hemositler, Leica DM750 marka mikroskopta sayılarak, bir mililitre hemolenfteki hemosit sayısı belirlenmiştir. Sayılan hemositler, Jones (1962) methodu kullanılarak hesaplanmıştır.

**Verilerin Analizi:** Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 bilgisayar programında SNK (Student Newman Keul's) testi kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arası fark 0.05 olasılık seviyesinde F değerinden büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ).

## BULGULAR

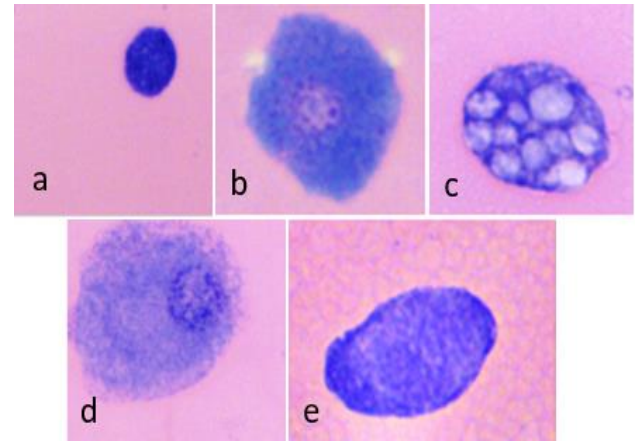
**Hemosit tiplerinin belirlenmesi:** *G. mellonella* larvalarında prohemosit, granülosit, plazmatosit, sferülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir (Şekil 1).

**Total Hemosit Sayısı:** Total hemosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu+Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir azalma göstermiş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 1).

**Diferansiyel Hemosit Sayısı:** Plazmatosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu+Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir artış meydana gelmiş ve bu artış istatistiksel açıdan önemli kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ). 72 saatlik uygulama sonrası larvaların

hemolenfide en fazla bulunan hemosit tipinin plazmatosit olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Prohemosit sayısı, Cu ve Cu+Zn karışımı besin gruplarında kontrol grubuna oranla önemli bir azalma gözlenmiştir. Zn içeren besin grubu, Cu+Zn karışımı gruba oranla önemli bir artış göstermiş fakat istatistiksel açıdan önemli kabul edilmemiştir. Granülosit sayısı, Cu ve Cu+ Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu + Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla önemli bir azalma göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ( $p<0.05$ ) (Tablo 2). Sferülosit sayısı, Cu ve Cu+ Zn karışımı uygulama grupları ile Zn ve Cu + Zn karışımı uygulama gruplarında kontrole oranla bir azalma göstermiş ve önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Tablo 2). Önositoid sayısı, Zn ve karışım uygulama grubu (Cu+Zn) ile Cu ve karışım uygulama grupları (Cu+Zn) kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Yapılan çalışmada larvaların hemolenfide en az bulunan hemosit tipinin önositoid olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 1.** *G. mellonella* larvalarındaki hemosit tipleri; a. Prohemosit, b. Granülosit, c.Sferülosit, d. Önositoid, e. Plazmatosit (Ölçü Barı: 10 µm; X100).

**Figure 1.** Hemocyte types in *G. mellonella* larvae; a. Prohemocyte, b. Granulocyte, c.Spherulocyte, d. Eucyctoid, e. Plasmacyte (Size Bar: 10 µm; X100).

**Tablo 1.** *G. mellonella* larvalarının hemolenfide Cu, Zn ve karışımlarının total hemosit sayısı üzerine etkileri (Ortalama ±Standart Hata).

**Table 1.** Effects of Cu, Zn and mixtures on total hemocyte count in hemolymph of *G. mellonella* larvae (Mean ± Standard Error).

Ağır metal (mg/L)	Total Hemosit Sayısı (Ort ± SH)*
Kontrol	176.6 ± 44.09 a
Cu(10 mg/L)	160.0 ± 57.73 b
Zn (30 mg/L)	725.0 ± 14.43 c
Cu +Zn (10:30 mg/L)	120.0 ± 28.86 d

\*SNK; Küçük harfler ağır metaller arası farkı göstermek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ( $p<0.05$ ).  
SNK; Lowercase letters are used to show the difference between heavy metals. There is a statistical difference between the data shown in different letters ( $p<0.05$ ).

**Tablo 2.** *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde Cu, Zn ve karışımlarının Plazmatosit, prohemosit, granülosit, sferülosit ve önositoid sayıları üzerine etkileri (Ortalama ±Standart Hata).

**Table 2.** Effects of Cu, Zn and its mixtures on plasmacyte, prohemocyte, granulocyte, spherulocyte and eunocytoid counts in hemolymph of *G. mellonella* larvae (Mean ± Standard Error).

Ağır metal (mg/L)	Plazmatosit Sayısı (Ort ± SH)*	Prohemosit Sayısı (Ort ± SH)*	Granülosit Sayısı (Ort ± SH)*	Sferülosit Sayısı (Ort ± SH)*	Önositoid Sayısı (Ort ± SH)*
Kontrol	565.3 ± 13.531 a	270.00 ± 3.05 a	128.0 ± 10.016 a	31.33 ± 5.206 a	19.0 ± 0.577 a
Cu (10 mg/L)	914.6 ± 4.409 b	79.00 ± 4.16 b	11.0 ± 0.577 b	11.33 ± 0.881 b	1.6 ± 0.333 b
Zn (30 mg/L)	842.3 ± 29.868 c	116.66 ± 23.49 b	37.0 ± 0.577 c	17.00 ± 0.577 b	1.3 ± 0.333 b
Cu +Zn (1:3)	895.6 ± 0.666 bc	78.33 ± 1.76 b	12.3 ± 1.333 b	10.33 ± 0.333 b	3.0 ± 0.577 b

\*SNK; Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel fark bulunmaktadır ( $P < 0.05$ ).

\*SNK; There is a statistical difference between the data shown in different letters ( $P < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Çevre kirliliğine sebep olan metal ve metalik bileşikler, genel olarak ekosistemlerin doğal bir bileşenidir. Bu metaller organizmaya su, hava ve besin yoluyla alınmaktadır. Ancak fazla miktarda alınan metal bileşikler, organizmada birikerek bir tehlike oluşturduğu için ekosistemi bozmakta ve bazı organizmaların hayatı üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır.

Böcek hemositlerinin sınıflandırılması için farklı hücre tipleri ve bunların çeşitli görevlerinin olduğu bilinmektedir. Lepidoptera'larda genelde yaygın beş tip hemosit prohemositler, granülositler, plazmatositler, sferülositler ve önositoidler tanımlanmıştır (Ling vd., 2005; Strand, 2008; Tan vd., 2013). Prohemositler diğer hemosit türlerinin öncüsüdür ve hemolenfte az miktarda bulunurlar (Lanot vd., 2001). Granülositler hemolenfte bol miktarda bulunurlar; yabancı cisimlerin yüzeyine güçlü bir şekilde yapışırlar, fagositoz ve enkapsülasyon gibi de işlev görürler. Plazmatositlerin şekli polimorfiktir; yabancı yüzeylere asimetric yayılırlar ve enkapsülasyon reaksiyonu sırasında kapsül oluşumuna katılırlar (Strand, 2008). Sferülositler yapışkan olmayan hemositlerdir ve bunların rolü hala bilinmemektedir, ancak kutiküler bileşenlerin taşınmasında yer aldıkları öne sürülmüştür. Önositoidler fenoloksidaz (PO) kademesinin ana bileşenlerini içeren yapışkan olmayan hemositlerdir (Lavine & Strand, 2002; Vogelweith vd., 2016). Böceklerde, hemositleri tanımlayabilmek ve sınıflandırabilmek için morfolojik, fonksiyonel ve histokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir (Brehelin & Zachary, 1986; Lavine & Strand, 2002). Yapılan çalışmada, *G.mellonella* beşinci evre larvaların hemolenfindeki hemositler morfolojik olarak incelenmiş ve plazmatosit, prohemosit, sferülosit granülosit ve önositoid olmak üzere beş tip hemosit gözlenmiştir. Ashhurst ve Richards, (1964) yaptıkları çalışmada *G. mellonella* (Lepidoptera) larvalarının hemolenfinde beş tip hemosit bulunduğunu ve sunulan çalışmadan farklı bir hemosit tipi olan adipohemosit olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada *Culex quinquefasciatus*

(Diptera:Culicidae) larvalarında altı tip hemosit bulunduğunu ve bu hemositlerin prohemosit, plazmatosit, sferülosit, granülosit, önositoid ve adipohemosit olduğunu bildirmişlerdir (Brayner vd., 2005).

*G. mellonella* larvalarında hemositlerin yapısal özellikleri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada plazmatosit, granüler hücreler, sferülositler ve önositoid olmak üzere dört tip kan hücresi olduğu gösterilmiştir (Wu vd., 2016). Strand ve Pech, (1995) Lepidoptera ordosuna ait bir türün hemositlerini morfolojik olarak incelediğinde prohemosit, granülosit, plazmatosit, önositoid ve sferülosit olduğunu bildirmişlerdir. Böcek türlerine bağlı olarak hemosit tiplerinin farklılık gösterdiği bilinmektedir (Gupta, 1979; Bang vd., 2014;2015).

Yapılan çalışmada, Cu ve Zn' nun tek başına ve karışımlarının total hemosit sayısında azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Çevresel koşullardaki değişikliklerden etkilenen total hemosit sayısı patojenler, parazitler ve ksenobiyotikler (insektisit, ağır metal) gibi stres faktörlerinden de etkilenerek değişiklik göstermektedirler (Bergin vd., 2003; Wu & Yi, 2015). *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) larvalarının besinine farklı derişimlerde Cd ve Cu ilave edildiğinde, düşük Cd derişiminde total hemosit sayısı azalırken, yüksek Cd ve Cu derişimlerinde artmıştır. Ortamdaki stres faktörleri altında total hemosit sayısındaki azalma nedeniyle kan hücrelerinin dolaşımdan dokulara geçmiş olabileceği düşünülmektedir (Sendi vd., 2018).

*G.mellonella* larvalarının diferansiyel hemosit sayıları incelendiğinde; plazmatosit sayısı Cu, Zn ve Cu+Zn karışım uygulaması yapılan gruplarda kontrol gruba göre bir artış göstermiştir. Bu artışın sebebi, plazmatositlerin hemosöl duvarına metalleri yapıştırma özelliği ile biriktirdiğini ve bu kan hücresinin metallerle karşı dirençli bir etki göstermesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Sendi vd., 2018). Ayrıca plazmatositlerin amitoz ve mitoz bölünme özelliğinin olması nedeni ile diğer hemositlere göre hemolenfte sayılarının çok miktarda bulunabileceği düşünülmektedir.



Metal uygulaması yapılan gruplardaki prohemosit sayısında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvalarında yapılan bir çalışmada, 12.5 mg/kg Cd ve Cu derişimlerinde prohemosit sayısının azaldığını, Cd derişimlerinin granülosit sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir (Sendi vd., 2018). Prohemositlerin metal stresine karşı bir tepki gösterdiği ve bu hücrelerin dolaşımında başka hücrelere dönüşebilmesinden dolayı bir azalma meydana gelebileceği düşünülmektedir (Levin, 2007). Granülosit sayısı, denenen tüm uygulama gruplarında önemli ölçüde azalma göstermiştir. Granülositlerin fagositozdan sorumlu olması ile içeri alınan yabancı maddeleri hidrolitik enzimler tarafından sindirebileceğinden dolayı bu kan hücresinin azaldığı düşünülmektedir. Sferülosit sayısı; Cu, Zn ve Cu+Zn karışım uygulaması yapılan gruplarda azalma olduğu gözlenmiştir. Önositoid sayısı ise, denenen tüm uygulama grupları azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Önositoidler, böceklerde fenoloksidaz (PO) ve tirozin enzimi içeren yapışkan olmayan hücrelerdir (McFarlane, 1974; Bagatto & Shorthouse 1996; Hackman, 1974; Tarek vd., 2010; Sendi vd., 2014). Cu, doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan fenoloksidaz enzimi melanizasyona neden olduğundan önositoid ve sferülosit sayılarının azalmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Wu & Yi, 2015). Borowska ve Pyza, (2011) *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvaları üzerinde yapılan çalışmada, larvalar her bir metalin düşük ve yüksek yarı- subletal dozlarına (Cu 5 ve 1000 mg/kg, Zn 100 ve 2000 mg/kg, Cd 3 ve 50 mg/kg, Pb 20 ve 10,000 mg/kg) maruz bırakılmışlardır. Kök hücre olarak bilinen prohemositlerin sayısı artarken, fagositozdan sorumlu granülositlerin sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) üzerine bir insektisit türü olan Nomoltun farklı derişimlerinin (50, 100 ve 500 ppm) uygulanması sonucunda hemolenfteki prohemosit, önositoid, plazmatosit ve granülosit sayılarında bir artış olduğunu fakat sferülosit sayısında azalma meydana geldiğini tespit edilmiştir. Sferülositler nomolt için en duyarlı hücreler iken, önositoidler en az etkilenen hücre olduklarını göstermiştir ve sonuç olarak total hemosit sayısının azaldığını bildirmiştir (Teleb, 2011). Wu ve Yi, (2015) *G. mellonella* larvalarına düşük dozlardaki Cr ve Pb ağır metallerinin uygulanması sonucunda, total hemosit sayısı, fagositik aktivite ve enkapsülasyonunun arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada, metal uygulanan *G. mellonella* larvalarının hemolenfinde bulunan prohemosit sayısının azalmasının immün savunma sistemine bir tepki gösterdiğini ve prohemositlerin diğer hemosit tiplerine farklılaşabilen bir kök hücre olması nedeniyle granülosit, sferülosit ve önositoid sayılarının azalmasıyla ilişkili

olabileceği düşünülmektedir. Metallerin tek başına ve karışım olarak uygulanması sonucunda, *G. mellonella*'nın bağışıklık savunma sistemi üzerine etkilerinin belirlenmesinde elde edilen bulgular sunulan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (Borowska & Pyza, 2011; Teleb, 2011; Sendi vd., 2018). Ağır metaller, doğada tek başlarına bulunmayıp diğer metallerle birlikte bulunduğu ve metallerin organizmalarda birikim düzeyleri ile toksik etkilerinin ortamdaki diğer metallere bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu nedenle, yapılan çalışmada Cu ve Zn metallerinin tek başına ve karışım halinde uygulanmasının model organizma *G. mellonella* larvalarının bağışıklık sistemi üzerine etkilerinin belirlenmesi diğer türler ile yapılacak immünolojik çalışmalara ışık tutacaktır.

## TEŞEKKÜR

Yapılan çalışma, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı yüksek lisans tezidir ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FYL-2018-10328).

## KAYNAKLAR

- Ashhurst, D.E. & Richards, G. (1964).** Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *Journal of Morphology*, **114**, 247-254.
- Bagatto, G. & Shorthouse, J.D. (1996).** Accumulation of Cu and Ni in successivestages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae: Lepidoptera) near ore smelters at Sudbury, Ontario, Canada. *Environmental Pollution*, **92**(1), 7-12.
- Bang, K., Kwon, H. & Cho, S. (2014).** Characterization of the Hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis* seulensis: Involvement of Granulocyte-Mediated Phagocytosis. *PLoS ONE* **9**, e103620.
- Bang, K., Hwang, S., Lee, J. & Cho, S. (2015).** Circulating Hemocytes from Larvae of the Japanese Rhinoceros Beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the Cellular Immune Response to Microorganisms. *PLoS ONE* **10**(6), e0128519.
- Bargagli, R. (2000).** Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **166**, 129-173.
- Bergin, D., Brennan, M. & Kavanagh, K. (2003).** Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal

- pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*, **5**, 1389-1395.
- Borowska, J. & Pyza, E. (2011).** Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 760-770.
- Brehelin, M. & Zachary, D. (1986).** *Insect haemocytes: a new classification to rule out controversy*. In: Immunity in Invertebrates, ed. Brehelin, M. Springer Verlag, Berlin, pp. 36-48.
- Brayner, F.A., Araujo, H.R.C., Cavalcanti, M.G.S., Alves, L.C. & Peixoto, C.A. (2005).** Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron*, **36**, 359-367.
- Bronksil, J.F. (1961).** A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pyralidae). *Journal of Lepidopteran Society*, **15**, 102-104.
- Büsselberg, D., & Florea, A.M. (2006).** Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals*, **19**, 419-427.
- Cerenius, L. & Soderhall, K. (2004).** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 116-126.
- Chapman, R.F. (1998).** *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Chouhan, S., Verma, S.C. & Thakur, M. (2017).** Effect of Cadmium on Biology of Tobacco Caterpillar *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Nature Environment and Pollution Technology*, **16**(3), 883-888.
- Gupta, V. (2013).** Mammalian Feces as Bio-Indicator of Heavy Metal Contamination in Bikaner Zoological Garden, Rajasthan, India. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences*, **1**(5), 10-15.
- Hackman, R. (1974).** *Chemistry of the insect cuticle*. p. 215-270. In: "The Physiology of Insecta". 2nd ed. (M. Rockstein, ed.). Academic Press, Inc., London, UK, 535 pp.
- Jones, J.C. (1962).** Current Concepts Concerning Insect Hemocytes. *American Zoologist*, **2**, 209-246.
- Kanost, M.R., Jiang, H. & Yu, X.Q. (2004).** Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, **198**, 97-105.
- Kara, A. (2019).** *Cu, Zn ve karışımlarının Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvalarının Hemosit tipleri ve Sayıları Üzerine Etkileri*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, Türkiye, 53s.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. & Meister, M. (2001).** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, **230**, 243-257.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002).** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 1295-1309.
- Levin, D.M. (2007).** *An Integrin Required for the Encapsulation Immune Response in the tobacco hornworm Manduca sexta L. (Lepidoptera: Sphingidae)*. Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R. & Kiguchi, K. (2005).** Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell and Tissue Research*, **320**, 535-543.
- Mastore, M., Binda, R.S., Giovannardi, S., Scari, G. & Brivio, M.F. (2015).** Inducible factors with antimicrobial activity after immune challenge in the haemolymph of Red Palm Weevil (Insecta). *Innate Immunity*, **21**, 392-405.
- McFarlane, J. (1974).** The functions of copper in the house cricket and the relation of copper to vitamin E. *Canadian Entomology*, **106**(4), 441-446.
- Nappi, A.J. & Ottaviani, E. (2000).** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, **22**, 469-480.
- Negri, P., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L. & Eguaras, M. (2014).** *Apis mellifera* haemocytes in-vitro: what type of cells are they? Functional analysis before and after pupal metamorphosis. *Journal of Apicultural Research*, **53**, 576-589.
- Pandey, R., Dwivedi, M.K., Singh, P.K., Patel, B., Pandey, S., Patel, B., Patel, A. & Singh, B. (2016).** Effluences of heavy metals, way of exposure and bio-toxic impacts: an update. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, **6**(5), 458-475.
- Ribeiro, C. & Brehelin, M. (2006).** Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, **52**, 417-429.
- Rosales, C. (2011).** Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *International studies Journal*, **8**, 109-131.
- Sendi, J.J., Baghban, A., Zibae, A. & Khosravi, R. (2014).** Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Of Plant Protection Research*, **54**(4), 367-373.

- Sendi, J.J., Baghban, A. & Zibae, A. (2018).** Effect of essential and non-essential elements on cellular immune system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *International studies Journal*, **15**, 158-168.
- Shen, D., Li, M., Chu, Y., Lang, M., & An, C. (2016).** Cellular immune response of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae), to infection by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Eurasian Journal of Entomology*, **113**, 415-422.
- Strand, M. R., Beck, M. H. & Lavine, M.D. (2006).** Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **61**, 134-145.
- Strand, M.R., 2008.** The insect cellular immune response. *Insect Science*, **15**, 1-14.
- Strand, M.R. & Pech, L.L., (1995).** Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, **40**, 31-56.
- Suganya , M., Karthi, S., & Shivakumar, M.S. (2016).** Effect of Cd and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura*. *Free Radicals and Antioxidants*, **6**, 90-100.
- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S.Y., Li, T., Xiang, Z.H. & Cui, H.J. (2013).** Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, **59**, 595-603.
- Tarek, M.Y.E., Fouda, M.A., Hassan, M.I., Abd-Elghaphar, A.A. & Hasaballah, A.I. (2010).** Toxicological effects of some heavy metal ions on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Egypt Acad. Journal of Biological Science, F. Toxicology & Pest Control*, **2**(1), 63-76.
- Teleb, S.S. (2011).** Effect of nomolt on differential and total haemocytes in the Desert Locust *Schistocerca gregaria* Forskal (Orthoptera: Acrididae), *Journal of American Science*, **7**(11), 479-484.
- Tunçsoy, M. (2019).** Bakır oksit nanopartiküllerinin *Clarias gariepinus*'da bazı serum parametreleri üzerine etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, **4**(3), 387-392.
- Vogelweith, F., Moret, Y., Monceau , K., Thiéry, D. & Moreau, J. (2016).** The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. *Journal of Insect Physiology*. **88**, 33-39.
- Wu, G. & Yi, Y. (2015).** Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*. **167**, 131- 139.
- Wu, G., Liu Y., Ding Y. & Yi Y. (2016).** Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue and Cell*, **48**, 297-304.



## Büyük Ruminantia'da Fibula'nın Morfolojisi [<sup>1</sup>]

Murat KABAK Sedef SELVİLER SİZER\* Süleyman YÜKSEL Burcu ONUK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 55139 Samsun, Türkiye

Geliş/Received: 09.01.2020

Kabul/Accepted: 12.02.2020

Atıf yapmak için: Kabak, M., Selviler Sizer, S., Yüksel, S. & Onuk B. (2020). Büyük ruminantia'da fibula'nın morfolojisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 52-55.

How to cite: Kabak, M., Selviler Sizer, S., Yüksel, S. & Onuk B. (2020). Morphology of fibula in large ruminantia. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 52-55.

ID: <https://orcid.org/0000-0003-4255-1372>

\*ID: <https://orcid.org/0000-0002-1990-4507>

ID: <https://orcid.org/0000-0001-9692-0546>

ID: <https://orcid.org/0000-0001-8617-3188>

\*Sorumlu yazarın:

Sedef SELVİLER SİZER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı 55139 Samsun, Türkiye

✉: [sedef.selviler@omu.edu.tr](mailto:sedef.selviler@omu.edu.tr)

Cep telephone : +90 (505) 624 93 23

Telefon : +90 (362) 312 19 19/3957

Faks : +90 (362) 457 69 22

**Öz:** Bu çalışma büyük ruminantia'da fibula'nın morfolojik yapısının detaylı olarak incelenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada toplamda 24 adet ossa cruris kullanıldı. Kemiklerin morfometrik ölçümlerini elde etmek için Mitutoyo Dijital Kumpas'tan yararlanıldı. Elde edilen bulgular sonucunda büyük ruminantia da fibula'nın uzunluk değerleri incelenen materyaller arasında değişkenlik göstermekteydi. Bu nedenle ossa cruris travmalarında fibula'nın farklı uzunluklarda olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiğini ve elde edilen verilerin anatomi literatürüne katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Anatomi, fibula, ruminantia.

## Morphology of Fibula in Large Ruminantia

\*Corresponding author's:

Sedef SELVİLER SİZER

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary  
Medicine, Department of Anatomy, 55139  
Samsun, TURKEY

✉: [sedef.selviler@omu.edu.tr](mailto:sedef.selviler@omu.edu.tr)

Cep telephone : +90 (505) 624 93 23

Telephone : +90 (362) 312 19 19/3957

Fax : +90 (362) 457 69 22

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the morphological structure of fibula in large ruminantia. A total of 24 cruris bones were used in this study. Mitutoyo Digital Caliper was used to obtain morphometric measurements of the bones. As a result of the findings, the length values of the large ruminant varied among the materials examined. As a result of the findings, the length values of the fibula in the large ruminant varied between the materials examined. For this reason we thought that the length of the fibula should be considered in ossa cruris traumas and the obtained data will be contribute to anatomy literature.

**Keywords:** Anatomy, fibula, ruminant.

[<sup>1</sup>] "International Congress On Engineering and Life Science, Kastamonu, Türkiye" isimli kongrede sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

"International Congress On Engineering and Life Science, Kastamonu, Turkey" is presented as oral presentations at the congress.

## GİRİŞ

Ossa membri pelvini'de yer alan ossa cruris, medial'de bulunan tibia ile lateral'de bulunan fibula tarafından oluşur (Getty, 1975; Nickel vd., 1981; Dursun, 2008; Dyce vd., 2010; König & Liebich, 2014). Tibia'nın proximal'indeki condylus lateralis'e yerleşen fibula caput fibulae, collum fibulae, corpus fibulae ve distal kısımda yer alan malleolus lateralis'ten oluşmaktadır (König & Liebich, 2014). Fibula'nın redüksiyon derecesi türler arasında hatta bireyler arasında da önemli ölçüde değişiklik

gösterir (Getty, 1975; Nickel vd., 1981; Boos & Bartels 2002; Boos vd., 2005). Fibula büyük ruminantia'da tibia'nın proximal kısmının lateral'inde rudimenter halde bulunurken, equidae'de tibia'nın ortalarına kadar uzanmakta (Dursun, 2008; Crişan vd., 2009; Dyce vd., 2010), carnivor ve sus'ta ise tibia ile aynı hizada sonlanmaktadır (Getty, 1975; Nickel vd., 1981; Dursun, 2008). Fibula ruminantia'da fetal dönemde tam olarak cartilaginous (kıkırdaksal) şekillenmekte, ilerleyen

zamanda tibia'nın proximal'indeki kısa uzantı (caput fibulae) ile distal kısımda var olan os malleolare ile birleşen ligamentum fibulare olarak adlandırılan fibröz kordona dönüşmektedir. Bazı durumlarda lig. fibulare'nin proximal kısmı parsiyel kemikleşme göstermektedir (Getty, 1975).

Tibia'nın distal bölümünde ruminantia'da fibula'dan bağımsız bir kemik olan os malleolare şekillenirken (Nickel vd., 1981; Crişan vd., 2009), equidae, carnivor ve sus'ta tibia'nın distal ucunda malleolus lateralis denilen bir çıkıntı şekillenir. Bu çıkıntı equidae'de tibia'ya ait iken, carnivor ve sus'ta fibula tarafından oluşturulmaktadır (Getty, 1975; Dursun, 2008; Karan, 2012; König & Liebich, 2014; Bahadır & Yıldız, 2015). Tibia ve fibula arasında proximal'de yer alan yarı oynar (amphiarthrosis) bir eklem olan, articulatio tibiofibularis proximalis carnivor, sus ve equidae'da bulunur. Büyük ruminantia'da ise tibia ve fibula arasında tam bir kemikleşme mevcuttur. Tibia ile fibula'nın distal'inde yer alan yarı oynar eklem articulatio tibiofibularis distalis car ve sus'ta mevcuttur. Bu eklem ruminantia'da tibia ile os malleolare arasında şekillenmiştir (Nickel vd., 1981).

Türler hatta bireyler arasında birçok kemik yapısında farklılıklar görülebilmektedir. Koyun (Boos vd., 2005) ve keçide (Boos & Bartels, 2002) fibula'da, domuzda ossa membri pelvini'de (Karan, 2012), atta cervical vertebrae'de (Onuk vd., 2010), bazı koyun (Yalçın & Lök, 2009) ve köpek (İlgün & Özkan, 2015) ırkları ile karaca (Onuk vd., 2013) cranium'unda, ayrıca bazı koyun ırkları (Taşbaş, 1983; Taşbaş, 1984) ile tavşan extremité kemiklerinde (Pazvant & Kahvecioğlu, 2009), sığırlarda ön ve arka parmak kemiklerinde (Gündemir vd., 2020) ve tek tırnaklıların (Gültekin, 1956) iskelet kemiklerinde anatomik farklılıklar çalışılmıştır. Anatomi dersinde kullanılmak üzere mezbahane ve kasaplardan temin edilen büyük ruminantia'ya ait ossa cruris kemiklerinin birkaçında fibula'da farklılık göze çarpmıştır. Yapılan literatür taramalarında büyük ruminantia fibula'sına ait detaylı morfometrik verilere rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışma ile büyük ruminantia fibula'sına ait morfometrik verilerin ortaya konması amaçlanmıştır.

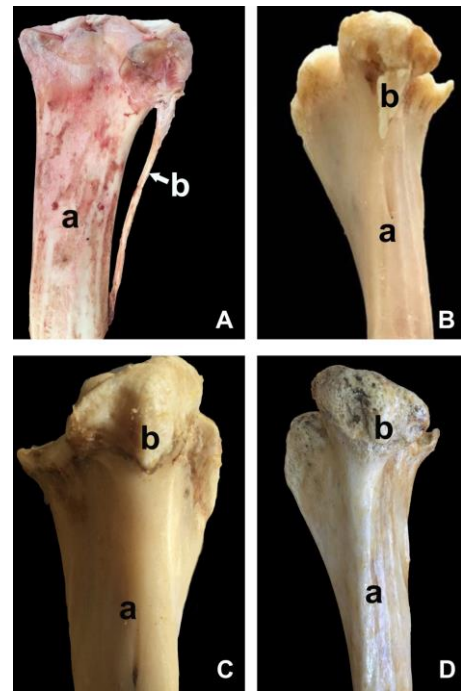
## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın materyalini mezbahane ve kasaplardan temin edilen büyük ruminantia ait ossa cruris ile laboratuvarımızda var olan ve ders materyali olarak kullanılan toplam 24 adet kemik oluşturdu. Kemiklerin makroanatomik fotoğrafları için Olympos C-5060 marka dijital fotoğraf makinesi kullanıldı. Kemiklerin morfometrik ölçümleri Mitutoyo Dijital Kumpas (Mitutoyo, Japan) ile yapıldı. İsimlendirmede Nomina

Anatomica Veterinaria (2017)'dan yararlanıldı. Histolojik incelemeler için sodyum sitrat ve formik asitle hazırlanan dekalsifikasyon solüsyonu (Luna, 1968) uygulanan materyaller rutin histolojik doku takibi prosedürlerinden geçirilerek parafine bloklandı. Parafin bloklardan 5 µ'luk kesitler alındı ve Hematoksilen-Eozin ve Crossman trichrome ile boyanarak histolojik inceleme sağlandı. Histolojik fotoğraflar Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu altında Nikon DS Camera Head DS-5M görüntüleme sistemi ile çekildi.

## BULGULAR

Çalışmada kullanılan 24 adet ossa cruris'te fibula'nın tibia'nın proksimal'inde lateral kısımda yer aldığı ve uzunluğunun değişkenlik gösterdiği belirlendi (Şekil 1) Yapılan ölçümler sonucunda tibia'nın uzunluğu ortalama  $35,68 \pm 2,89$  cm, eni  $4,82 \pm 0,60$  cm olarak ölçüldü. Çalışmada kullanılan materyallerin 4 tanesinde fibula'nın boyu tibia'nın ortalarına kadar uzanmaktaydı ve ortalama uzunluğu  $9,77 \pm 4,94$  cm idi. Bu materyallerde fibula'nın distal kesimi tibia'nın lateral'inde serbest bulunmaktaydı (Şekil 1A). Beş materyalde ise fibula tibia'nın proximal'inde kemiksel bir çıkıntı halinde gözlemlendi ve ortalama uzunluğu  $3,48 \pm 0,59$  cm olarak belirlendi (Şekil 1B). On materyalde, fibula'nın sadece caput kısmının oluştuğu görüldü ve ortalama  $1,22 \pm 0,53$  cm olarak ölçüldü (Şekil 1C). Kalan beş materyalde ise fibula, göz ardı edilebilecek kadar küçüktü ve tibia ile kaynaşmış olarak şekillenmişti (Şekil 1D).



**Şekil 1.** Farklı uzunluklardaki (A,B,C,D) fibula'nın görünümü. a: tibia, b: fibula .  
**Figure 1.** View of fibula of different lengths (A,B,C,D). a: tibia, b: fibula.



Tibia'nın distal'inde fibula'dan bağımsız olan os malleolare adı verilen kemik mevcuttu. Bu kemiğin eni  $2,39 \pm 0,37$  cm, uzunluğu  $2,15 \pm 0,35$  cm olarak ölçüldü (Şekil 2). Histolojik boyama sonucunda tibia'nın condylus lateralis'i ile fibula arasında eklem şekillenmediği ve iki kemik arasında syndesmosis tarzında birleşme olduğu belirlendi (Şekil 3). Fibula kemik yapıdan oluşmaktaydı (Şekil 4).

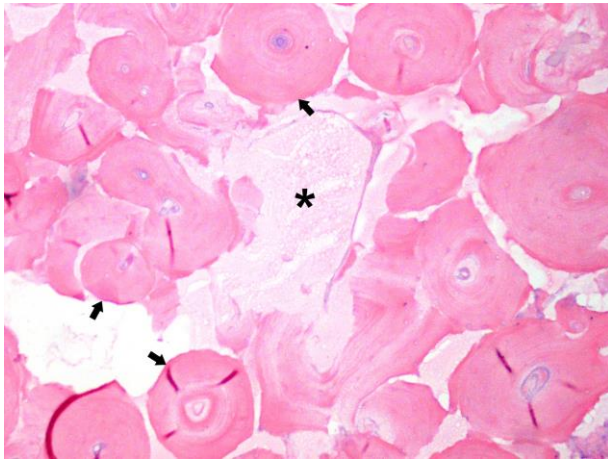


Şekil 2. Tibia ve fibula'nın görünümü.

a: tibia, b: fibula, c: os malleolare

Figure 2. The view of the tibia and fibula.

a: tibia, b: fibula, c: os malleolare.

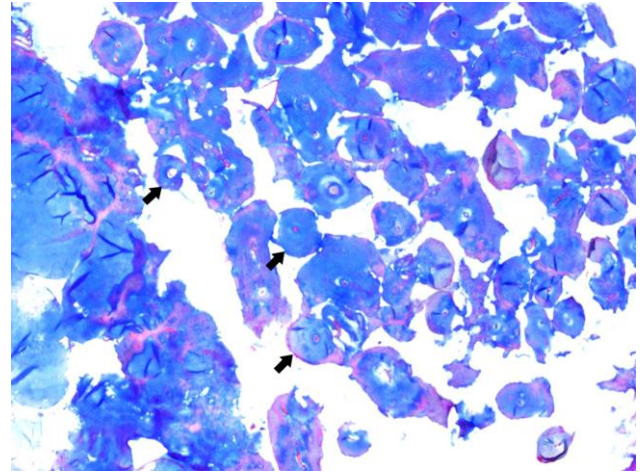


Şekil 3. Tibia ile fibula arasındaki syndesmosis birleşiminin görünümü.

Ok: kemik doku, \*: bağ doku, X10 (H&E).

Figure 3. The view of syndesmosis junction between the tibia and fibula.

Arrow: bone tissue, \*: connective tissue, X10 (H&E).



Şekil 4. Fibula'nın kemik yapısının görünümü.

Ok: kemik doku X4 (Crossman Trichrome).

Figure 4. The view of the bone structure of the fibula.

Arrow: bone tissue, X4 (Crossman Trichrome).

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Ossa membri pelvini'yi oluşturan kemiklerden biri olan ossa cruris, medial'de bulunan tibia ile lateral'de bulunan fibula'dan oluşmaktadır (Getty, 1975; Nickel vd., 1981; Dursun, 2008; Dyce vd., 2010; König & Liebich, 2014). Fibula'nın tibia'nın proximal'inde condylus lateralis'e yerleştiği bildirilmektedir (Getty, 1975; Nickel vd., 1981; Dursun, 2008). Çalışmamızı oluşturan fibula'nın lokalizasyonu bildirilenle uyumludur.

Fibula'nın corpus'unun gelişim sürecinde türlere göre değişen oranda reduksiyona uğradığı bildirilmiştir. Equide'de corpus fibula'nın tibia'nın 1/3'üne kadar uzandığı, distal kısmının ise redukte olduğu, car ve sus'ta distal'e kadar uzandığı ve distal'de malleus lateralis'i oluşturduğu, ruminantia'da ise fibula'nın corpus'unun tamamen reduksiyona uğradığından bahsedilmektedir (Nickel vd., 1981; Karan, 2012; König & Liebich, 2014). Keçide fibula'nın tibia'nın ortalarına kadar uzandığı (Boos & Bartels, 2002), koyunda ise fibula'nın proximal ve distal tip olmak üzere iki çeşitten oluştuğu bildirilmektedir (Boos vd., 2005). Koyunda bahsedilen proximal tipteki fibula'nın, keçi ve equidae'ye benzer olarak tibia'nın ortalarına kadar uzandığı, distal tipteki fibula'nın ise tibia'nın distal'inden başlayarak aynı kemiğin orta 1/3'lük kısmına kadar ulaştığı bildirilmiştir (Boos vd., 2005). Getty, (1975) ise fibula'nın ruminantia'da erken dönemde ligament şeklinde erişkin hayvanlarda ise kemikleşerek reduksiyona uğradığını ifade etmiştir. Yapılan çalışmamızda Getty, (1975)'e benzer şekilde reduksiyona uğrayan fibula'nın uzunluklarında farklılıklar gözlenmiştir. Dört materyalde fibula'nın tibia'nın ortalarına kadar uzanması equidae, koyun ve keçide bahsedilenler ile benzerlik göstermektedir. Fibula ve tibia arasındaki proksimal bağlantı carnivor, sus ve equidae'de

eklemel, koyun ve keçide ise synostosis şeklinde bildirilmiştir. Yapılan çalışmada ise iki kemik arasındaki bağlantının syndesmosis tarzda olduğu saptandı. Ayrıca ruminantia'da (Nickel vd., 1981; Bahadır & Yıldız, 2015) ossa cruris'in distal kesiminde fibula'dan bağımsız olarak bulunan os malleolare'den bahsedilmiştir. Bu durum çalışmamızla uyumludur.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada ruminantia'da fibula'nın farklı uzunluklarda olabileceği ortaya konmuştur. Bu farklılıklar özellikle ossa cruris travmalarında ve bu kemiklerin radyografik görüntülemelerinde dikkate alınmalıdır. Elde edilen verilerin anatomi literatürüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın bir kısmı 26-29 Nisan 2018 tarihleri arasında gerçekleştirilmiş olan "International Congress On Engineering and Life Science, Kastamonu, Türkiye" isimli kongrede sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Bahadır, A. & Yıldız, H. (2015).** *Veteriner anatomi. 5. Baskı*, Ezgi Kitabevi, Bursa, TR, 85p.
- Boos, A. & Bartels, T. (2002).** Ontogeny and occurrence of the corpus fibulae in the domesticated goat (*Capra aegagrus f. hircus*). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, **184**(3), 289-293.
- Boos, A., Hässig, M., & Bartels, T. (2005).** The corpus fibulae in sheep (*Ovis ammon f. aries*)—ontogeny, persistence, size and shape from the fetal period to adulthood. *Annals of Anatomy Anatomischer Anzeiger*, **187**(3), 297-303.
- Crişan, M., Damian, A., Dezdrobitu, C. & Mateaş, C. (2009).** Comparative studies of pelvic limb skeleton in camel, cow and mare. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, **66**(1), 34-41.
- Dursun, N. (2008).** *Veteriner anatomi I, 4. Baskı*, Medisan Yayınevi, Ankara, TR, 59-65p.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.K. (2010).** *Textbook of veterinary anatomy, 4th ed.*, Elsevier Inc, CHN, 89-90p.
- Getty, R. (1975).** *Sisson and Grossman's the anatomy of the domestic animals, 5th ed.*, W.B. Saunders Company, London, UK, 759-761p.
- Gültekin, M. (1956).** Yerli at ve eşek iskeletlerindeki sabit anatomik ayrımlar üzerinde incelemeler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **1**(2), 67-72.
- Gündemir, O., Özkan, E. & Mutuş, R. (2020).** Morphometric study on the digital bones in the domestic cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **26**(1),75-82.
- Hidaka, S., Matsumoto, M., Hiji, H., Ohsako, S. & Nishinakagawa, H. (1998).** Morphology and morphometry of skulls of raccoon dogs, nyctereutes procyonoides and badgers, meles meles. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**(2), 161-167.
- İlgün, R. & Özkan, Z.E. (2015).** Aksaray Malaklı köpeği ile Kangal köpeği neurocranium ve splanchnocranium kemiklerinin bazı osteometrik ölçümlerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **29**(3), 157-161.
- Karan, M. (2012).** Yaban domuzlarında (*Sus scrofa*) arka bacak kemiklerinin makro-anatomik olarak incelenmesi. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **26**, 31-34.
- König, H.E. & Liebich, H.G. (2014).** *Veterinary anatomy of domestic mammals. 6th ed.* Schattauer, DEU, 238-239p.
- Luna, L.G. (1968).** *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* McGraw-Hill Book Company, New York, USA, 7-10p.
- Nickel, R.A., Schummer, A. & Seiferle, E. (1981).** *The anatomy of the domestic animals. 6th. ed.* Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg.
- Nomina Anatomica Veterinaria (2017).** International committee on veterinary gross anatomical nomenclature (ICVGAN), Published by the Editorial Committee, Hannover.
- Onuk, B., Kabak, M. & Atalar, K. (2013).** Anatomic and craniometric factors in differentiating roe deer (*Capreolus capreolus*) from sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*) skulls. *Archives of Biological Sciences*, **65**, 133-141.
- Onuk, B., Kabak, M., Yılmaz, B. & Orhan, İ.Ö. (2010).** Bir İngiliz Atında Cervical Vertebrae'daki Anomali Olgusu. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **3**(2), 43-46.
- Pazvant, G. & Kahvecioğlu, K. (2009).** Tavşanlarda ön ve arka bacak uzun kemiklerinin homotipik varyasyonları üzerinde araştırmalar. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **35**(2), 23-39.
- Taşbaş, M. (1983).** Yaban koyunu (*Muflon Ovis orientalis anatolica*) ile yerli karaman koyununun iskelet kemikleri üzerinde karşılaştırmalı makroanatomik araştırmalar. Bölüm: I Ossa trunci. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **30**(3), 368-388.
- Taşbaş, M. (1984).** Yaban koyunu (*Muflon Ovis orientalis anatolica*) ile yerli karaman koyununun iskelet kemikleri üzerinde karşılaştırmalı makro-anatomik araştırmalar. Bölüm: II Ossa membri thoracici et pelvini. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **31**(2); 240-259.
- Yalçın, H. & Lök, S. (2009).** Anadolu yaban koyunu (*Ovis gmelini anatolica*) ve Akkaraman koyununun (*Ovis aries*) kafa kemikleri üzerinde karşılaştırmalı makro-anatomik araştırma. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **4**(3), 147-162.



## Atık Su Örneklerinde Bazı Ağır Metallerin İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile Belirlenmesi

Zekeriyya BAHADIR

Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 28100, Giresun, Türkiye

Geliş/Received: 30.12.2019

Kabul/Accepted: 25.02.2020

Atf yapmak için: Bahadır, Z. (2020). Atık su örneklerinde bazı ağır metallerin indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 56-60.

How to cite: Bahadır, Z. (2020). Determination of some heavy metals in waste water samples with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 56-60.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0002-7035-1258>

\*Sorumlu yazarın:

Zekeriyya BAHADIR

Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Bölümü, 28100, Giresun, Türkiye

✉: [zekeriyya.bahadir@giresun.edu.tr](mailto:zekeriyya.bahadir@giresun.edu.tr)

Cep telefonu : +90 (553) 447 93 58

**Öz:** Bu çalışmada Giresun ilinde farklı oto yıkama merkezlerinin atık su içeriğindeki Cd, As, Pb, Ni ve Cr metalleri indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile tayin edilmiştir. Bu amaçla, belirlenen istasyonlardan toplanan su numuneleri, 0,45 µm membran filtreden süzülüş ve tayin öncesinde asitlendirilerek metal içerikleri analiz edilmiştir. Analiz edilen atık su numuneleri için en yüksek metal konsantrasyonları; As ( $15,2 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Pb ( $26,9 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Ni ( $31,5 \pm 1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ve Cr ( $9,8 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) olarak tespit edilmiştir. Ölçümlerin doğruluğu, numune matrisine ekleme/geri kazanım yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen geri kazanım değerleri %88-108 arasında bulunmuştur. İstasyonlar arası metal konsantrasyonları farklılığı istatistiksel olarak incelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ağır metal, atık su, ICP-MS.

## Determination of Some Heavy metals in Waste Water Samples with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

\*Corresponding author's:

Zekeriyya BAHADIR

Giresun University, Department of  
Chemistry, Faculty of Arts and Sciences,  
28100, Giresun, Turkey

✉: [zekeriyya.bahadir@giresun.edu.tr](mailto:zekeriyya.bahadir@giresun.edu.tr)

Mobile telephone : +90 (553) 447 93 58

**Abstract:** In this study, Cd, As, Pb, Ni and Cr metals in waste water content of different car wash centers in Giresun province were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) technique. For this purpose, the water samples collected from the stations were filtered through a 0.45 µm membrane filter and acidified before the determination of the metal contents. The highest metal concentrations were determined for As ( $15.2 \pm 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Pb ( $26.9 \pm 0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), Ni ( $31.5 \pm 1.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and Cr ( $9.8 \pm 0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The accuracy of the measurements was checked using the addition/recovery method. The recovery values obtained between 88-108%. The difference of metal concentrations between stations was statistically studied.

**Keywords:** Heavy metals, ICP-MS, waste water.

## GİRİŞ

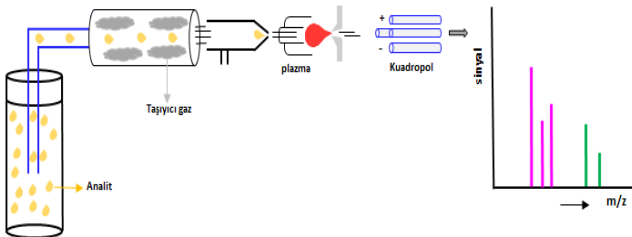
Son yıllarda teknoloji ve sanayinin hızla gelişmesine bağlı olarak artan çevre kirliliği, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen en önemli sorunlardan biri olarak güncelliğini korumaktadır. Çevre kirliliğinin ana nedenleri arasında ağır metal kirliliği gelmektedir. Ağır metal, nispeten yüksek bir yoğunluğa ( $5 \text{ g/cm}^3$ 'den büyük) sahip olan ve düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki gösterebilen metal veya metaloid grubu için kullanılan bir

terimdir (Duffus, 2002). Cıva, kadmiyum, arsenik, krom, demir, kurşun, çinko, gümüş ve bakır ağır metaller olarak gösterilebilir (Duruibe vd., 2007). Klor bazlı organik kirleticilerin aksine, ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunan elementlerdir. İnsani faaliyetler sonucu doğada biriken çoğu ağır metal miktarı, doğal kökenli kaynaklardan salınan ağır metal miktarlarına oranla çok daha fazladır. Ağır metaller farklı kimyasal ve fiziksel

özelliklerinden dolayı, endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılırlar. Metalurji, yakma prosesleri (kömür ve petrol) ve madencilik en önemli ağır metal kaynaklarıdır (Akieh vd., 2008; Jahromi vd., 2007). Ağır metaller biyobozunur özelliğe sahip olmayıp, insan vücuduna yiyecekler, içme suyu ve hava yoluyla alınırlar. Bakır ve çinko gibi bazı ağır metaller düşük konsantrasyonlarda insan metabolizması için gerekli olmalarına rağmen, yüksek miktarda alındıklarında zehirlenmelere neden olabilirler (Vinodh vd., 2011).

Yoğun trafik, endüstriyel faaliyetler ve kentleşme; göl, nehir, deniz ve içme sularının ağır metaller tarafından kirletilmesine neden olmakta ve bu durum insan sağlığı için önemli bir sorun teşkil etmektedir (Khajeh vd., 2017). Bu nedenle gerek doğal su gerekse atık su numunelerinde ağır metal konsantrasyonlarının belirlenmesi kirlilik oranını tespiti açısından büyük önem taşımaktadır.

İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS); doğal kaynak suyu, içme suyu, deniz suyu ve atık su numunelerinde çok düşük konsantrasyonlarda ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{ng L}^{-1}$ ) dahi elementlerin çoklu tayinlerine imkân veren gelişmiş bir analitik tekniktir. Bu teknikte çözelti halindeki numune, taşıyıcı gaz (argon) ile iyonlaştırma ünitesine (plazma) gönderilir ve bu bölgede yüksek sıcaklıklarda ( $\sim 10000$  Kelvin) iyonlaşan elementler, kütle/yük ( $m/z$ ) oranına göre bir kütle spektrometresi (MS) ünitesinde tayin edilirler (Montaser, 1998). Bir ICP-MS cihazının temel bileşenleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. ICP-MS çalışma prensibi akım şeması.

Figure 1. Schematic illustration of the ICP-MS working principle.

Su örneklerinde geçiş metallerinin yanı sıra lantanit ve aktinit sınıfı elementlerinin hassas şekilde tayin edilebilmesi, buna ek olarak elementlerin izotop miktarının ölçülebilmesine olanak sağlaması gibi özellikler ICP-MS tekniğinin en önemli avantajları arasında yer almaktadır (Dressler vd., 2007; Maxwell III & Jones, 2009).

Bu çalışmada, Giresun ili şehir merkezinde bulunan bazı araç yıkama merkezlerinde araçların temizlenmesiyle çevreye salınan atık su örneklerindeki Cd, As, Pb, Ni ve Cr gibi ağır metallerin miktarları ICP-MS kullanılarak tayin edilmiştir. Araç yıkama merkezlerinde kullanılan suyun potansiyel olarak atık su kabul edilebileceği ve bu sulardaki ağır metal konsantrasyonlarının kirlilik düzeyi hakkında bilgi sağlayacak olması bu çalışmanın dikkat çeken özelliğidir.

## MATERYAL VE METOT

**Kimyasallar ve kullanılan cihazlar:** Ölçüm kaplarının temizlenmesi ve metal standart çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan ultra saf su Direct-Q 8UV ( $18,2 \text{ m}\Omega$ , Milli-Q, Millipore-Merck, Darmstadt, Germany) cihazından temin edilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri için gerekli olan Cd, As ve Cr elementleri High-Purity Standards (Charleston, SC, USA  $10 \text{ mgL}^{-1}$ ); Pb ve Ni elementlerinin standart çözeltileri ise Millipore Sigma (Darmstadt, Germany,  $1000 \text{ mgL}^{-1}$ ) firmalarından temin edilmiştir. Atık su örneklerini toplamak için gerekli numune kaplarını, olası bir kirlilikten arındırmak ve su numunelerini asitlendirmek için gerekli nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ), Merck (65%, ultrapure reagent, Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir. Numunelerin süzme işlemleri için vakum süzme düzeneği (Merck, Darmstadt, Germany) kullanılmıştır. Ölçüm basamağına hazır hale getirilen atık su numunelerinin ağır metal içeriği ise Agilent 7700 model ICP-MS (Santa Clara, CA 95051 United States) cihazı ile belirlenmiştir.

### Atık su örneklerinin toplanması ve ölçüm basamağı:

Bu çalışma için gerekli atık su numuneleri, Giresun ilinde yedi farklı oto yıkama merkezinden toplanmıştır. Örnek toplama işlemi için önceden nitrik asitle temizlenmiş 500 mL hacminde polietilen numune kapları kullanılmıştır. Atık sular, oto yıkama merkezlerinin akar kısımlarından her bir istasyon için üç tekrar olacak şekilde (21 adet) toplanmıştır. Atık su örneklerinin toplandığı bölgeler P1, P2, P3, P4, P5, P6 ve P7 olarak etiketlenip Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Atık su örneklerinin toplandığı istasyonlar, Giresun, Türkiye.

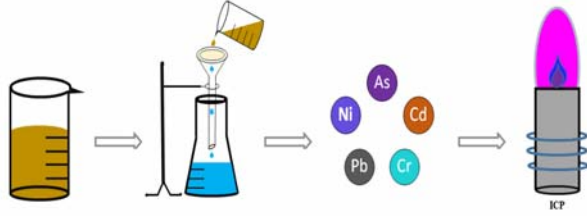
Figure 2. The stations for collected waste water samples, Giresun, Turkey.

Tüm atık su örnekleri aynı gün içinde Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilerek  $0,45 \mu\text{m}$  gözenekli selüloz membran filtreler (Agilent Technology, Germany) kullanılarak ayrı ayrı süzülmüştür. Herhangi bir metal çökmesini engellemek amacı ile süzülen örnekler, nitrik asit konsantrasyonu  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  olacak şekilde asitlendirilmiş ve ağır metal içerikleri ICP-MS cihazı ile tayin edilmiştir. Atık su numunelerinin tayin akım şeması Şekil 3'de gösterilmiştir.

ICP-MS'in ölçüm öncesi kalibrasyonu için gerekli çözünürlük, kütle kalibrasyonu ve hassasiyet verilerinin



optimizasyonu için  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  lityum (Li), kobalt (Co) itriyum (Y), seryum (Ce) ve talyum (Tl) içeren tuning çözeltisi (Agilent, katalog no:5184-3556) kullanılmıştır. Cihazda okside olmuş iyon kalibrasyonu  $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$  (%1,1-1,4) oranı kullanılarak yapılmıştır. ICP-MS cihazı için gerekli diğer çalışma parametreleri Tablo 1’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Atık su numunelerinin ICP-MS ile tayin şeması.

Figure 3. The determination scheme of waste water samples with ICP-MS.

Tablo 1. Agilent 7700 ICP-MS çalışma parametreleri

Table 1. The operating parameters of Agilent 7700 ICP-MS.

Parametre	Değeri, Birimi
RF güç	1600 Watt (W)
Çarpışma gazı	Helyum (He), 5,0 mL/min
Plazma gaz akışı	Argon (Ar), 18,0 L/min
Nebulizatör pompası	0,1 rps
Nebulizatör gaz akışı	0,98 L/min
Çözünürlük(m/z)	244 amu
Omega lens	9,4 V
Omega ön gerilim	-80 V
Enerji ayırımı	5,0 V
OctP RF	200 V

Tablo 3. ICP-MS ile atık su numunelerinde tayin edilen ağır metal konsantrasyonları ve ekleme/geri kazanım değerleri

Table 3. Heavy metal concentrations and addition/recovery values determined in waste water samples with ICP-MS.

		İstasyonlar						
Element		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Cd	Numunede tayin edilen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TSA	TSA	TSA	TSA	TSA	TSA	TSA
	Eklene ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10	10	10	10	10	10	10
	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	9,1±0,5	9,1±0,5	8,9±0,6	9,4±0,4	9,5±0,6	9,2±0,4	9,5±0,5
	% Geri kazanım	91±4	91±5	89±4	94±4	95±4	92±3	95±3
As	Numunede tayin edilen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	3,8±0,1	8,7±0,2	2,6	5,6±0,3	11,9±0,1	1,0±0,1	15,2±0,3
	Eklene ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10	10	10	10	10	10	10
	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	14±0,5	19±0,5	13±0,4	15±0,5	22±0,8	10,9±0,4	24±0,9
	% Geri kazanım	102±5	103±5	104±4	94±3	101±6	99±4	88±4
Pb	Numunede tayin edilen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	13,7±0,2	26,9±0,4	2,8±0,2	15,5±0,4	4,8±0,1	6,7±0,1	4,8±0,1
	Eklene ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10	10	10	10	10	10	10
	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	24±2	36±2	13±1	26±1	14±1	16±1	14±1
	% Geri kazanım	103±4	91±3	96±3	105±4	92±3	93±4	92±4
Ni	Numunede tayin edilen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	4,7±0,8	31,5±1,1	2,9±0,1	16,3±0,8	4,6±0,2	16,2±0,7	4,7±0,1
	Eklene ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10	10	10	10	10	10	10
	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	14±1	42±2	12±1	26±1	15±1	27±1	14±1
	% Geri kazanım	93±4	105±6	91±4	97±3	104±3	108±3	93±4
Cr	Numunede tayin edilen ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1,7±0,2	9,8±0,4	1,2±0,1	8,2±1,1	3,4±0,2	2,7±0,2	N.D
	Eklene ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10	10	10	10	10	10	10
	Bulunan ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	12±1	20±1	11±1	17±1	13±1	12±1	9±1
	% Geri kazanım	103±6	102±4	98±5	88±4	96±4	93±3	90±3

TSA: Tayin sınırının altında.

Tablo 3’de elde edilen verilerden yola çıkarak arsenik, kurşun, nikel ve krom konsantrasyonlarının, istasyonlara göre farklılık gösterip göstermediği tek yönlü anova testi (IBM SPSS statistics, 12 version, SPSS Inc., USA) ile incelenmiştir. Analizi yapılan tüm metallerin normal dağılım gösterdiği (Kolmogorov-Smirnov K-S test) ve buna bağlı olarak da arsenik ve krom konsantrasyonlarının istasyonlara göre farklılık gösterdiği ( $P < 0,05$ ) gözlemlenmiştir. Kurşun miktarının P5 ve P7

## BULGULAR

Atık su numunelerinde tayini yapılacak olan elementleri içeren kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve veriler Tablo 2’de gösterilmiştir. Numune içerisindeki her bir elementin konsantrasyonu, elde edilen kalibrasyon verilerine göre hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Atık su örneklerinde tayini yapılan elementlere ait kalibrasyon doğrusu verileri.

Table 2. The calibration curve data for the determined elements in waste water samples.

Element	Kalibrasyon aralığı ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Kalibrasyon denklemi	Regrasyon Katsayısı ( $R^2$ )
Cd	1-500	$y = 2791,1x + 8187,5$	0,9998
As	1-500	$y = 12051x + 43101$	0,9997
Pb	1-500	$y = 26693x + 127642$	0,9999
Ni	1-500	$y = 108,04x + 4858,4$	0,9947
Cr	1-500	$y = 9061,9x + 30786$	0,9998

Ölçümlerin doğruluğu (validasyon) numune matrisine ekleme/geri kazanım (tayini yapılmak istenilen analitin bilinen konsantrasyonunun, numune ortamına ilave edilerek ölçülmesi) yöntemiyle belirlenmiştir. Her bir element için elde edilen ekleme/geri kazanım değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

istasyonlarında, nikelin ise P1, P5 ve P7 istasyonlarında farklılık göstermediği gözlemlenmiştir.

## TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Endüstriyel faaliyetler sonucu doğaya salınan ağır metallerin insan ve çevre sağlığı için ciddi sorunlar oluşturduğu bilinen bir gerçektir. Özellikle endüstri bölgelerinde çevreye salınan ağır metal içerikli atık suların,



göl ve içme suyu kaynaklarını kirletmesi önemli çevre sorunlarından biridir. Bu açıdan atık sulara ağır metal konsantrasyonlarının belirlenmesi, içme, nehir ve göl sularının kirlenme derecesinin tespiti ve gerekli tedbirlerin alınması açısından büyük önem arz etmektedir. Benzer şekilde oto yıkama merkezlerinde kullanılan suların çevreye salındığı bilinmekte ve bu atık suların muhtemel olarak bazı ağır metalleri de içerebileceği ön görülmektedir. Bu amaçla, Giresun ilinde bulunan farklı oto yıkama merkezlerinden toplanan atık suların içeriğindeki bazı ağır metaller ICP-MS tekniği ile belirlenmiştir.

**Kadmiyum**, özellikle çinko-kadmiyum pillerinde kullanılan, çok düşük konsantrasyonlarda dahi insan ve hayvan dokularında birikerek toksik özellik gösteren bir ağır metaldir. Tütün ürünleri potansiyel kadmiyum kaynağı olarak bilinmektedir (Nazari, 2009). Bu çalışmada, ICP-MS ile analizi yapılan atık su numunelerinde kadmiyum tespit edilememiştir. Araç yıkama atık su örneklerinde bu metale rastlanılmaması kadmiyumun kullanım alanlarıyla açıklanabilir.

**Arsenik**, deri ve ahşap korucuyu (bakır ve krom arsenat) olarak kullanılan, Amerikan Çevre Koruma Örgütü (EPA) tarafından birinci sınıf toksik ve Uluslararası Kanserojen Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından ise kanserojen madde sınıfında yer alan ağır metaldir (Assis vd., 2019, Gedik vd., 2019). Atık su analizi yapılan her istasyonda arsenik metaline rastlanmıştır. Arsenik, tarım alanında böcek öldürücü ve herbisit olarak kullanılır. Ayrıca alaşım ve madencilik faaliyetlerinde sıklıkla kullanılması nedeniyle atık su numunelerinde bulunma olasılığı yüksek bir metaldir (Gürkan, 2015).

**Kurşun**, kemiklere nüfuz edebilen ve kolayca beyin hücrelerine taşınıp sinir sistemini tahrip etme özelliğine sahip toksik bir ağır metaldir. Araç yıkama merkezlerinin atık su içeriklerinde kurşun tespit edilmesi bu metalin araç bataryaları, petrol ürünleri ve boya sanayisinde kullanılmasıyla açıklanabilir (Mansel vd., 2019).

**Nikel**, solunum sistemi rahatsızlıklarına yol açan alerjik ve toksik bir metaldir. Analiz edilen tüm istasyonlarda nikel metaline rastlanmıştır. Nikel özellikle elektro kaplama ve akümülatörlerde kullanılan bir metaldir (Karve & Rajgor, 2009), bu açıdan oto yıkama atık sularına karışma ihtimali yüksektir.

**Krom**, deri tabaklama, metalurji ve ısıya dayanıklı malzemelerde kullanılması nedeniyle yüzey sularına karışabilen toksik metaller arasındadır. Çok düşük konsantrasyonlarda Cr (III) insan sağlığı için gerekli iken Cr (VI) toksik özellik gösterir (Almeida vd., 2019). Atık su analiz sonuçlarında P7 istasyonunda krom metaline rastlanmazken, diğer istasyonlarda düşük konsantrasyonlarda krom tespit edilmiştir. Krom metalinin

araç yıkama atık sularında gözlemlenmesi özellikle bu metalin galvanik kaplama endüstrisinde kullanılması ile açıklanabilir.

Mevcut çevre politikaları, su ekosistemlerindeki toksik madde seviyelerini azaltmayı ve uygun atık su arıtılmasından sonra suyun tekrar kullanılmasını teşvik etmeyi amaçlar. Böylece endüstriyel faaliyetler sonucu doğaya salınan metallerin konsantrasyonlarının tespiti ve su ile olan etkileşimlerinin azaltılması su kaynaklarının korunması açısından son derece önemlidir. Ağır metallerin atık sulara uzaklaştırılması için kimyasal çökeltme, iyon değişimi ve membran filtrasyonu gibi klasik yöntemler kullanılmaktadır. Bunun yanında etkinliği yüksek farklı arındırma teknikleri de kullanılabilir. Örnek olarak, atık sulara Cr, Ni, Zn, Cu ve Cd metallerinin uzaklaştırılması için zeloit (Álvarez-Ayuso vd., 2003); Cd, Co, Pb metallerinin uzaklaştırılması için aktif karbon (Mikula & Puzio, 2007) etkin şekilde kullanılmıştır. Bunlara ek olarak atık su numunelerinden Pb, Ni, Cr, V elementlerinin uzaklaştırılması için doğal kaynaklı adsorban olarak solucan gübresi (*Vermicompost*) (Urdaneta vd., 2008), çok düşük konsantrasyonlarda arsenik metalinin uzaklaştırılması için ise biyomateryal olarak su sümbülü bitkisi (*Eichhornia crassipes*) (Al Rmalli vd., 2005) kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ışığında gerek araç yıkama merkezleri gerekse diğer endüstriyel fabrika atık sularının çevreye salındığı bölgelerde yüksek adsorblama özelliğine sahip materyaller filtre olarak kullanılıp, ağır metallerin çevreye salınımları önlenabilir. Böylece metallerin geri kazanımları da sağlanarak çevre ve insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri azaltılabilir.

## SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen verilerden, atık su örneklerinde krom metali düşük konsantrasyonlarda tespit edilmişken (istasyon P7'de Cr tespit edilmemiştir) kadmiyum metaline rastlanmamıştır. Ayrıca tüm istasyon verilerinde arsenik, kurşun ve nikel metalleri farklı konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Ağır metal içeriğine sahip atık suların, içme ve kullanım sularını kirleterek insan sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği açıktır. Bu sonuçlardan da yola çıkarak analizi yapılan atık sulara toksik özelliğe sahip metallerin belirlenmesi atık su yönetiminin ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: 300318-90, Giresun, Türkiye) tarafından desteklenmiştir. ICP-MS ölçümleri sırasında gösterdikleri destek için Gümüşhane Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı yönetimi ve öğretim görevlisi kadrosuna teşekkürlerimi sunarım.

## KAYNAKLAR

- Akieh, M.N., Lahtinen, M., Väisänen, A. & Sillanpää, M. (2008).** Preparation and characterization of sodium iron titanate ion exchanger and its application in heavy metal removal from waste waters. *Journal of Hazardous Materials*, **152**, 640-647.
- Al Rmalli, S.W., Harrington, C.F., Ayub, M. & Haris, P.I. (2005).** A biomaterial based approach for arsenic removal from water. *Journal of Environmental Monitoring*, **7**, 279-282.
- Almeida, J.C., Cardoso, C.E.D., Tavares, D.S., Freitas, R., Trindade, T., Vale, C. & Pereira, E. (2019).** Chromium removal from contaminated waters using nanomaterials - A review. *Trends in Analytical Chemistry*, **118**, 277-291.
- Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A. & Querol, X. (2003).** Purification of metal electroplating waste waters using zeolites. *Water Research*, **37**, 4855-4862.
- Assis, R.C., Faria, B.A.A., Caldeira, C.L., Mageste, A.B., de Lemos, L.R. & Rodrigues, G.D. (2019).** Extraction of arsenic(III) in aqueous two-phase systems: A new methodology for determination and speciation analysis of inorganic arsenic. *Microchemical Journal*, **147**, 429-436.
- Dressler, V.L., Pozebon, D., Matusch, A. & Becker, J.S. (2007).** Micronebulization for trace analysis of lanthanides in small biological specimens by ICP-MS. *International Journal of Mass Spectrometry*, **266**, 25-33.
- Duffus, J.H. (2002).** "Heavy Metals"-A meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*, **74**, 93-807.
- Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C. & Egwurugwu, J.N. (2007).** Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, **2**, 112-118.
- Gedik, K., Kongchum, M. & Delaune R.D. (2019).** Arsenic Uptake and Depuration by Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **3**, 332-337.
- Grant, R.L. & Grant, E. (1987).** *Grant and Hackh's Chemical Dictionary*, 5th ed., McGraw-Hill, New York, 657p.
- Gürkan, R., Kır, U. & Altunay, N. (2015).** Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV-Vis spectrophotometry. *Food Chemistry*, **180**, 32-41.
- Jahromi, E.Z., Bidari, A., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M. & Jamali, M.R. (2007).** Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples. *Analytica Chimica Acta*, **585**, 305-311.
- Karve, M. & Rajgor, R.V. (2009).** Octadecyl bonded silica membrane disk modified with Cyanex302 for separation and flame atomic absorption spectrometric determination of nickel from tap water and industrial effluent. *Journal of Hazardous Materials*, **166**, 576-580.
- Khajeh, M., Sarafraz-Yazdi, A. & Moghadam, A.F. (2017).** Modeling of solid-phase tea waste extraction for the removal of manganese and cobalt from water samples by using PSO-artificial neural network and response surface methodology. *Arabian Journal of Chemistry*, **10**, 1663-1673.
- Mansel, C., Fross, S., Rose, J., Dema, E., Mann, A., Hart, H., Klawinski, P. & Vohra, B.P.S. (2019).** Lead exposure reduces survival, neuronal determination, and differentiation of P19 stem cells. *Neurotoxicology and Teratology*, **72**, 8-70.
- Maxwell III, S.L. & Jones, V.D. (2009).** Rapid determination of actinides in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry and alpha spectrometry: A hybrid approach. *Talanta*, **80**, 143-150.
- Mikula, B. & Puzio, B. (2007).** Determination of trace metals by ICP-OES in plant materials after preconcentration of 1,10-phenanthroline complexes on activated carbon. *Talanta*, **71**, 136-140.
- Montaser, A. (1998).** *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, 1rd ed., Wiley-VCH, USA, 1004p.
- Nazari, S. (2009).** Liquid phase microextraction and ultratrace determination of cadmium by modified graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, **165**, 200-205.
- Urdaneta, C., Parra, L.M.M., Matute, S., Garaboto, M.A., Barros, H. & Vázquezde, C. (2008).** Evaluation of vermicompost as bioadsorbent substrate of Pb, Ni, V and Cr for waste waters remediation using Total Reflection X-ray Fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **63**, 1455-1460.
- Vinodh, R., Padmavathi, R. & Sangeetha, D. (2011).** Separation of heavy metals from water samples using anion exchange polymers by adsorption process. *Desalination*, **267**, 267-276.



## Effects of Macerate Oil of Garlic (*Allium sativum*, Limne), Tunceli Garlic (*Allium tuncelianum*, Kollman) and Onion (*Allium cepa*, Limne) on Antioxidant Enzyme Activities of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* L.)

Başar ALTINTERİM\* Önder AKSU  
Malatya Turgut Özal University, Fisheries Faculty, Malatya, Türkiye

Geliş/Received: 03.01.2020

Kabul/Accepted: 2028.02.2020

**How to cite:** Altinterim, B. & Aksu, Ö. (2020). Effects of macerate oil of garlic (*Allium sativum*, Limne), Tunceli garlic (*Allium tuncelianum*, Kollman) and onion (*Allium cepa*, Limne) on antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 61-65.  
**Atıf yapmak için:** Altinterim, B. & Aksu, Ö. (2020). Sarımsak (*Allium sativum*, Limne), Tunceli Sarımsağı (*Allium tuncelianum*, Kollman) ve Soğan (*Allium cepa*, Limne) Masere Yağının, Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* L.)'nin Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 61-65.

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6913-6326>  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3735-6732>

\*Corresponding author's:  
Başar ALTINTERİM  
Malatya Turgut Özal University, Fisheries  
Faculty, Malatya, Türkiye.  
✉: [basaraltinterim@gmail.com](mailto:basaraltinterim@gmail.com)  
Mobile telephone : +90 (506) 511 41 47

**Abstract:** In this study, antioxidant enzyme activities effects of dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*, Limne) oil macerate, Tunceli garlic (*Allium tuncelianum*, Kollman) oil macerate and onion (*Allium cepa*, Limne) oil macerate on antioxidant activities [catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA)] in sera of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) were assessed. For this aim, rainbow trout were fed with diets containing garlic oil macerate, Tunceli garlic oil macerate, and onion oil macerate at concentration of 10g kg<sup>-1</sup> for 21 days. The highest CAT, GR and MDA activities were observed in onion oil macerate group, and the highest GPx activity was determined in garlic oil macerate group. GPx levels of three experimental groups were observed higher than control group. This study reported the effects of oil macerate on sera antioxidant capacities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). It was found that GPx activity of garlic oil macerate group and CAT, GR, and MDA activities of onion group in sera were significantly increased.

**Keywords:** Allium species, dietary supplements, enzyme activity, macerated oils, oxidative stress biomarkers, rainbow trout.

## Sarımsak (*Allium sativum*, Limne), Tunceli Sarımsağı (*Allium tuncelianum*, Kollman) ve Soğan (*Allium cepa*, Limne) Masere Yağının, Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* L.)'nin Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

\*Sorumlu yazar:  
Başar ALTINTERİM  
Malatya Turgut Özal University, Fisheries  
Faculty, Malatya, Türkiye.  
✉: [basaraltinterim@gmail.com](mailto:basaraltinterim@gmail.com)  
Mobile telephone : +90 (506) 511 41 47

**Öz:** Bu çalışmada, sarımsak (*Allium sativum*, Limne) masere yağı, Tunceli sarımsak (*Allium tuncelianum*, Kollman) masere yağı ve soğan (*Allium cepa*, Limne) masere yağının diyet takviyesinin, gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* L.)'nin serumundaki katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) gibi antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada üç masere yağın gökkuşluğu alabalığı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, gökkuşluğu alabalığı, masere sarımsak yağı, masere Tunceli sarımsak yağı ve masere soğan yağı içeren diyetlerle 21 gün 10g kg<sup>-1</sup>'de beslendi. En yüksek CAT, GR ve MDA aktiviteleri soğan yağı maserasyon grubunda gözlemlendi ve en yüksek GPx aktivitesi sarımsak yağı maserasyon grubunda saptanmıştır. Üç deney grubunun GPx düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada, masere yağların, gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin serum antioksidan kapasitelerindeki etkileri bildirilmiştir. Sarımsak yağı maserasyon grubunun GPx aktivitesinin ve serumdaki soğan grubunun CAT, GR ve MDA aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Allium türleri, diyet takviyeleri, enzim aktivitesi, gökkuşluğu alabalığı, masere yağlar, oksidatif stres biyobelirteçleri.

## INTRODUCTION

Fish antioxidant capacities provide information about their health status (Sinha et al., 2014). Free radicals are named as reactive oxygen species (ROS). ROS have a good indicator of physiological functions (Halliwell & Gutteridge, 2007). The ROS is very significant indicator that determined the changes of physiological and biochemistry metabolism in fish in oxidative stress (Dziewulska et al., 2008). Fish antioxidant systems consist of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses (Martínez-Tomé et al., 2001). Catalase (CAT), glutathione reductase (GR), selenium dependent glutathione peroxidase (GPx), and malondialdehyde (MDA) are natural enzymatic antioxidants. Plants are natural sources of bioactive substances and very useful in aquaculture, and they have antioxidant components (Lee et al., 2014; Vahedi et al., 2015).

Garlic (*Allium sativum*) belongs to Liliaceae family. Garlic contains many vitamins, allicin, ajoene, S-allyl cysteine, diallyl disulfide, S-methyl cysteine sulfoxide, and S-allyl cysteine organosulfur compounds (Draġan et al., 2008). The active component of garlic is allicin (thio-2-propene-1-sulfinic acid S-allyl ester). After the crushing of garlic. It showed up by the interaction of alliin (Rabinkov et al., 1998). Garlic has several benefits, such as antimicrobial (Kumar & Berwal, 1998) and antioxidants (Metwally, 2009). Garlic is effective in controlling pathogens, bacteria, and fungi. It also increases the health of fish (Corzo-Martínez et al., 2007). Garlic was studied in different forms, such as extracts, aqueous, ethanol, and dried powder (Shin and Kim, 2004). Antioxidant properties of allicin can be attributed to its ability to neutralize hydroxyl radicals and preventing lipid peroxidation (Prasad et al., 1995).

Onion (*Allium cepa*) belongs to the same family (Liliaceae), which contains fat, sugar, and vitamins A, C, and B complex and includes magnesium, potassium and copper, flavonoids, and sulfur compounds (Breu, 1996). Onion is used as an antibacterial and antioxidant agent (Ramos et al., 2006). Onion and garlic are rich sources of selenium (Matek et al., 2000).

In this study, it was aimed to some antioxidant enzyme activities (CAT, MDA GPx and GR) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L., 1758) by adding 1% of garlic (*Allium sativum*, Limne) oil macerate, Tunceli garlic (*Allium tuncelianum*, Kollman) oil macerate and onion (*Allium cepa*, Limne) oil macerate.

## MATERIAL AND METHOD

This study carried out in the fisheries faculty of Malatya Turgut Özal University on November 2018-March 2019. Macerated garlic, macerated Tunceli garlic and macerated onion oil products were prepared of mixtures of whole garlic cloves and onions ground into vegetable oil was

stored in sunflower oil (1/10) for 15 days to obtain oil macerate, and these oils were added to commercial trout feed at %2 ratio.

In the study, 30 rainbow trout with an average weight of  $56.21 \pm 2.15$  g was used. During the whole study, fish were fed twice a day for 21 days in the morning and the evening. Feeding was applied to an average of 2% of the live weight of fish. The feed conversion rate was determined at the end of the study.

Blood collection was performed without feeding on the fish, and the fish were anesthetized with the anesthetic agent [Benzocaine (ethyl 4-aminobenzoate 99%, Sigma Aldrich Co, USA) 30 mg/L] before blood collection. Trials were conducted in accordance with ethical rules (Inonu University, Faculty of Medicine, Ethics Committee of Experimental Animals and Protocol No: 2017/A-24). Blood samples were taken from the tail veins of the stunned fish and transferred to the tubes. The blood samples in tubes were waited one day at 4 °C and then centrifuged at 1000 g for 15 min to obtain serum.

The catalase (CAT) activity, the glutathione peroxidase (GPx) activity, the glutathione reductase (GR) activity and the malondialdehyde (MDA) activity were evaluated with CAT, GPx, GR and MDA detection kits, according to the manufacturer's instructions using CAT, GPx, GR and MDA kits (Shanghai YL Biotech Co., Ltd., China) by using DR-200Bc Microplate Reader (Shenzhen Prokan Electronics, China).

**Statistical Analysis:** Routine statistical methods and SPSS statistical program were used to evaluate the obtained data. Evaluation of the captured hematological data Kruskal Wallis and Mann Whitney U test were performed in  $P < 0.05$  confidence interval.

## RESULTS

**Determination of enzyme activities:** It was determined that parameters were statistically significant from the control group (Table 1). CAT values were statistically significant in onion group ( $P < 0.05$ ) (Figure 1), GR values were statistically significant in garlic and onion groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 2), MDA values were statistically significant in all groups ( $P < 0.05$ ) (Figure 3) and GPx parameters of all groups were not statistically significant from the control group ( $P > 0.05$ ) (Figure 4).

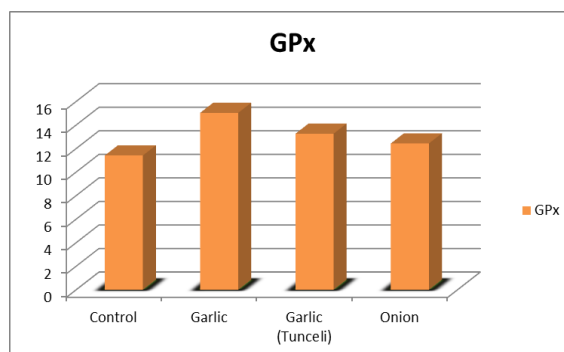
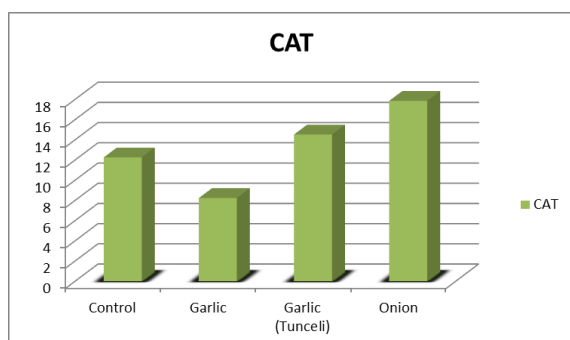
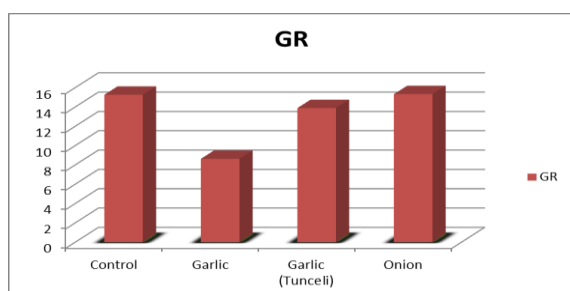
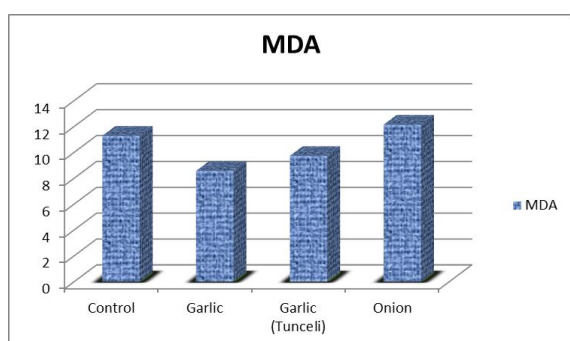
Lowercase superscripts (a, b, c, d) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among different oils within each experimental diet-fed group, whereas superscripts in uppercase show significant differences ( $P > 0.05$ ) among diet groups. Each value is the mean  $\pm$  S.E. of four individual observations. Each value is the mean  $\pm$  S.E. of ten personal views.

**Table 1.** Antioxidant parameters of all groups.

Antioxidant parameters	Control	Tunceli Garlic oil macerate	Garlic oil macerate	Onion oil macerate
CAT	12.25±0,75 <sup>ac</sup>	14.52±2,05 <sup>ab</sup>	8.23±1,08 <sup>c</sup>	17.85±4,33 <sup>b</sup>
GR	15.25±1,12 <sup>a</sup>	13.88±0,55 <sup>ad</sup>	8.62±0,14 <sup>b</sup>	15.32±1,52 <sup>cd</sup>
MDA	11.28±0,22 <sup>a</sup>	9.73±0,56 <sup>bc</sup>	8.57±0,29 <sup>bd</sup>	12.14±1,19 <sup>cd</sup>
GPx	11.41±0,45	13.26±1,14	15.03±4,61	12.43±1,03

CAT: catalase activity, GPx: glutathione peroxidase activity, GR: glutathione reductase activity, MDA: malondialdehyde.

Serum CAT, GR, and MDA activities of onion oil macerate were significantly higher in control group. The serum GPx activity of garlic oil macerate was the highest in all groups. GPx activity of all groups was higher than control group. GR and MDA activities in the serum were also significantly inhibited in both garlic oil macerate group and Tunceli garlic oil macerate group compared to the control group. While the CAT activity in the serum was also inhibited in garlic group, CAT activity in the serum was stimulated in Tunceli garlic group; still the highest level of CAT was determined in onion group.

**Figure 4.** Activities of glutathione peroxidase (GPx) in trout serum.**Figure 1.** Activities of superoxide dismutase catalase (CAT) in trout serum.**Figure 2.** Activities of glutathione reductase (GR) in trout serum.**Figure 3.** Activities of malondialdehyde (MDA) in trout serum.

## DISCUSSION

ROS neutralizing activity has been connected with the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems (Jos et al., 2005). The levels in this study showed that CAT, MDA, and GR activities in the sera increased in onion group that improves the enzymatic antioxidant capacity in fish. But the action of glutathione peroxidase (GPx) of garlic oil macerate group in contrast to other businesses that were determined the highest level.

GPx levels were high in alliin species, which are a source of selenium. The highest GPx activity was detected in garlic oil macerate and afterward Tunceli garlic oil macerate and onion oil macerate compare to fish fed control diet. Similarly, results revealed that GPx enzyme activity increased in which fed with 2% garlic supplement (Nemmiche, 2017). During the production process of macerated oil, alliin is converted to alliin. The alliin in macerated oil does not have a stable structure and is rapidly decomposed into components such as dithiins, ajoene, and sulfides (Block, 1985). In another study on chicken eggs, GPx level was determined high, but CAT level was low that fed with garlic powder (Çelebi et al., 2016). Garlic oil showed stress suppression and negative feedback effect in stress groups (Altinterim and Aksu, 2019). Garlic enhanced the non-specific defense activity of fish (*O. niloticus*) (Diab et al., 2002).

We have demonstrated that MDA increased antioxidant capacity of the sera in rainbow trout, which may especially explain the positive effects of onion oil macerate on lipid peroxidation of fish. MDA levels of garlic groups were determined lower than control group. In the same trend, MDA activity in muscle tissues of fish



groups fed with garlic was showed a significant decrease in lipid peroxidation levels (Mahmoud et al., 2019). It occurred that onion could be occurred in respiratory burst activity of beluga (Teyssier et al., 2001). Additionally, a previous study discovered that onion powder was improved lysozyme activity of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) juvenile (Cho & Lee, 2012).

In summary, this study reported the effects of oil macerate on sera antioxidant capacities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The changes in sera antioxidant indices were the immunostimulatory effects of fish. Besides it was found out from different changes of GPx activity of garlic oil macerate group in sera that correlated with selenium in garlic. Glutathione peroxidase consists of four protein subunits. Each subunit contains a selenium atom (Sen & Chakraborty, 2011).

The highest antioxidant activities (CAT, GR, and MDA) were determined onion oil macerate group. It was thought that immunostimulant effects of onion oil macerate were contained from cysteine sulfoxide (CSO) with S-propenyl-CSO as the predominant sulphur compound in onion oil. Sulphur was a component of the antioxidant enzymes (Keusgen et al., 2002; Ostrowska et al., 2004).

Although the blood values of fish fed with vegetable oil supplementation have been investigated in many studies (Altınterim et al., 2018a; 2018b; 2018c), studies on macerated oils are almost nonexistent in the literature. It is thought that these studies will be the pioneer in the studies on macerated oils.

As a result, it was found that GPx activity of garlic oil macerated group and CAT, GR, and MDA activities of onion group in sera were significantly increased. Thus, the antioxidant capacity of fish is stabilized at a high level at duration their life.

Significance Statement: There were many studies done with vegetable oils and essential oils. On the other hand, there were no studies with macerated oils. This was one of the first and pioneering works in the field of education.

## REFERENCES R

- Altınterim, B., Öztürk, E., Kutluyer, F. & Aksu, Ö. (2018a). Effects of green tea (*Camellia sinensis*) oil on feed utilization and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Atatürk University Journal of Veterinary Sciences*, **13**(2), 159-164. DOI: [10.17094/ataunivbd.296989](https://doi.org/10.17094/ataunivbd.296989).
- Altınterim, B., Danabas, D. & Aksu, O. (2018b). The effects of common yarrow (*Achillea millefolium* Linnaeus), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) and rosemary (*Rosemarinus Officinalis* Linnaeus) hydrosols on some immunological and hematological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Cellular and Molecular Biology*, **64**(14), 19-24.
- Altınterim, B., Kutluyer, F. & Aksu, O. (2018c). Effects of Different Plant Oils Having Different Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) on Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) at High Stocking Density. *Atatürk University Journal of Veterinary Sciences*, **13**(1), 63-69. DOI: [10.17094/ataunivbd.296703](https://doi.org/10.17094/ataunivbd.296703).
- Altınterim, B. & Aksu, Ö. (2019). Masere sarımsak (*Allium sativum* Linne) ve Tunceli sarımsağı (*Allium tuncelianum* Kollman) yağlarının yoğun stoklanmış gökkusacı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* W.) bazı kan parametrelerine ve NBT (Nitroblue Tetrazolium) seviyelerine etkileri. *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **21**(2), 716-723. DOI: [10.25092/baunfbd.637083](https://doi.org/10.25092/baunfbd.637083).
- Block, E. (1985). Chemistry of garlic and onions. *Scientific American*, **252**, 94-99. DOI: [10.1038/scientificamerican0385-114](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0385-114).
- Breu, W. (1996). *Allium cepa* L. (onion). Part 1: chemistry and analysis. *Phytomedicine*, **3**, 293-306.
- Cho, S.H. & Lee, S.M. (2012). Onion powder in the diet of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: effects on the growth, body composition, and lysozyme activity. *Journal of the World Aquaculture Society*, **43**: 30-38. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2011.00489.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00489.x).
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N. & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, **18**(12), 609-625. DOI: [10.1016/j.tifs.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011).
- Çelebi, Ş., Kaya, A. & Kaya, H. (2016). Yumurta tavuğu rasyonlarına sarımsak tozu ilavesinin yumurta, kan, karaciğer, but ve göğüs dokularında bazı antioksidan enzimler üzerine etkisi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı*, 32-40. DOI: [10.17100/nevbittek.210959](https://doi.org/10.17100/nevbittek.210959).
- Diab, A.S., El-Nagar, G.O. & El-Hady, Y.M. (2002). Evaluation of *Nigella sativa* (black seed, Baraka), *Allium sativum* (garlic), and biogen as feed additives on growth performance and immunostimulants of *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Suez Canal Veterinary Medicine Journal*, **1**, 745-750.
- Draǵan, S., Gergen, I. & Socaciu, C. (2008). *Funcionala ı cu componente bioactive naturale ın sindromul metabolic*, Ed. Eurostampa, Timisoara, p. 200-202, 160-161, 314.
- Dziewulska, K., Krzemieniecki, A. & Domagała, J. (2008). Basic physico-chemical parameters of milt from sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, **24**, 497-502. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2006.00775.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00775.x).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York.

- Jos, Á., Pichardo, S., Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, I. & Cameán A.M. (2005). Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, **72**, 261-71. DOI: [10.1016/j.aquatox.2005.01.003](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.003).
- Keusgen, M., Schulz, H., Glodek, J., Krest, I., Kruger, H., Herchert, N. & Keller, J. (2002). Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2884-2890. DOI: [10.1021/jf011331d](https://doi.org/10.1021/jf011331d).
- Kumar, M. & Berwal, J.S. (1998). Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Applied Microbiology*, **84**(2), 213-215. DOI: [10.1046/j.1365-2672.1998.00327.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00327.x).
- Lee, D.H., Lim, S.R., Han, J.J., Lee, S.W., Ra, C.S. & Kim, J.D. (2014). Effects of dietary garlic powder on growth, feed utilization and whole-body composition changes in fingerling sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **27**(9), 1303-1310. DOI: [10.5713/ajas.2014.14087](https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14087).
- Mahmoud, R., Aziza, A., Marghani, B. & Eltaysh, R. (2019). Influence of Ginger and Garlic Supplementation on Growth Performance, Whole Body Composition and Oxidative Stress in the Muscles of Nile Tilapia (*O. niloticus*). *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, **7**(5), 397-404. DOI: [10.17582/journal.aavs/2019/7.5.397.404](https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.5.397.404).
- Martínez-Tomé, M., García-Carmona, F., Murcia, M.A. (2001). Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 1019-26. DOI: [10.1002/jsfa.889](https://doi.org/10.1002/jsfa.889).
- Matek, M., Blanusa, M. & Grgic, J. (2000). Determination of the daily dietary selenium intake in Croatia. *European Food Research and Technology*, **210**: 155-60. DOI: [10.1007/PL00005504](https://doi.org/10.1007/PL00005504).
- Metwally, M.A.A. (2009). Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **1**, 56-64.
- Nemmiche, S. (2017). Oxidative signaling response to cadmium exposure. *Toxicol Sciences*, **156**(1), 4-10. DOI: [10.1093/toxsci/kfw222](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw222).
- Ostrowska, E., Gabler, N.K., Sterling, S.J., Tatham, B.G., Jones, R.B., Eagling, D.R., Jois, M. & Dunshea, F.R. (2004). Consumption of brown onions (*Allium cepa* var. *cavalier* and var. *destiny*) moderately modulates blood lipids, hematological and hemostatic variables in healthy pigs. *British Journal of Nutrition*, **91**, 211-218. DOI: [10.1079/BJN20031036](https://doi.org/10.1079/BJN20031036).
- Prasad, K., Laxdal, V.A., Yu, M. & Raney, B.L. (1995). Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **148**, 183-189.
- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D. & Weiner, L. (1998). The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1379**, 233-244. DOI: [10.1016/S0304-4165\(97\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00104-9).
- Ramos, F.A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T. & Takeuchi, M. (2006). Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3551-3557. DOI: [10.1021/jf060251c](https://doi.org/10.1021/jf060251c).
- Sen, S. & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, Chapter 1, 1-37. DOI: [10.1021/bk-2011-1083.ch001](https://doi.org/10.1021/bk-2011-1083.ch001).
- Shin, S. H. & M. K. Kim. (2004). Effect of dried powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on lipid metabolism and antithrombotic capacity in 16-month-old rats. *Journal of Nutrition and Health*, **37**, 515-524.
- Sinha, A.K., Abd Elgawad, H., Giblen, T., Zinta, G., De Rop, M., Asard, H., Blust, R. & De Boeck, G. (2014). Anti-oxidative defenses are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress. *PLoS ONE*, **9**(4), e95319. DOI: [10.1371/journal.pone.0095319](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095319).
- Teyssier, C., Amiotb, M.J., Mondyc, N., Augerc, J., Kahaned, R. & Siessa, M.H. (2001). Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolizing enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 981-98. DOI: [10.1016/S0278-6915\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00056-4).
- Vahedi, G., Kanno, Y., Furumoto, Y., Jiang, K., Parker, S. C., Erdos, M. R., Davis, S. R., Roychoudhuri, R., Restifo, N.P., Gadina, M. & Tang, Z. (2015). Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. *Nature*, **520**(7548), 558-562. DOI: [10.1038/nature14154](https://doi.org/10.1038/nature14154).



## Felin İdiyopatik Sistitis Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar

Zeynep Nurselin ÇOLAK<sup>1\*</sup> Didem PEKMEZCİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 55200, Kurupelit, SAMSUN

Geliş/Received: 14.01.2020

Kabul/Accepted: 27.02.2020

Atıf yapmak için: Çolak, Z.N. & Pekmezci, D. (2020). Felin idiyopatik sistitis tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 66-73.  
How to cite: Çolak, Z.N. & Pekmezci, D. (2020). New trends in the treatment of feline idiopathic cystitis. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 66-73.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0002-0631-5471>  
ID: <https://orcid.org/0000-0003-2072-8165>

**\*Sorumlu yazarın:**

Zeynep Nurselin ÇOLAK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner  
Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı,  
55200, Kurupelit, SAMSUN  
✉: [znurselin.kot@omu.edu.tr](mailto:znurselin.kot@omu.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (546) 768 2838

**Öz:** Evde yaşayan kedilere ait alt üriner sistem bulguları en az 80 yıldan beri veteriner literatüründe yer almaktadır. Felin İdiyopatik Sistitis (FİS) etiyolojisi bilinmeyen ve yaygın görülen bir hastalıktır. Birçok çalışmaya rağmen hastalığın patogenezi hakkında bilgilerimiz hala kısıtlı olmakla beraber var olan çok ilgi çekici ve ilginç teorilerin doğrulanmaya ihtiyacı vardır. FİS'in patogenezinde idrar kesesi, nöroendokrin sistem ve kedinin yaşadığı çevre arasında karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. FİS teşhisi diğer Aşağı Üriner Sistem Belirtilerinin (AÜSB) dışlanması ile konulmaktadır. Hastalığın patogenezindeki bilgilerimizin azlığı ve etkili terapötik metotlarında hala prematüredir. En üst seviyedeki ve ispatlanmış çalışmalar ise FİS'li kediler için çok amaçlı terapötik üriner mama, çevresel zenginleştirme ve yaş mama ile beslemenin hastalığın yönetimini desteklediğini ortaya koymuştur. Öte yandan kronik ve tedavi edilemeyen FİS'li kedilerin Pandora sendromu yönünden ele alınmaları gerekliliği de akıldan çıkarılmamalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Felin, güncel yaklaşımlar, idiyopatik sistit, tedavi.

## New Trends in the Treatment of Feline Idiopathic Cystitis

**Abstract:** Signs referable to the lower urinary tract of indoor-housed cats have been described in the veterinary literature for at least 80 years. Feline idiopathic cystitis (FIC) is a common disease of unknown etiology. Despite numerous studies, our understanding of this disease remains poor and although there are some interesting and attractive theories about the pathogenesis of the disease, much remains to be confirmed. Complex interactions between the bladder, neuroendocrine system, and the cat's environment seem to be involved in the pathogenesis of FIC. FIC is diagnosed by excluding other causes of lower urinary tract signs. Along with our poor understanding of the pathogenesis of disease, knowledge of effective therapeutic intervention is also premature. For cats with FIC, the highest grade of evidence supports nutritional management with a multipurpose prescription urinary diet, environmental enrichment, and feeding moist food. On the other hand, it should be kept in mind that cats with chronic and untreated FIC should be considered in terms of Pandora syndrome.

**Keywords:** Feline, idiopathic cystitis, new trends, treatment.

## GİRİŞ

İnsanlarda önceleri Ağrılı Mesane Sendromu/İntersitisyel Sistit (İS) olarak bilinen ancak, sonrasında Avrupa İntersitisyel Sistit Çalışma Grubunun Mesane Ağrı Sendromu (MAS)/İS olarak isim değiştirdiği

sendrom, primer olarak mesanede ağrı, sıkışma hissi ve sık idrara çıkma semptomlarına dayalı klinik bir tanıdır. Avrupa Üroloji Derneği ise MAS için üriner enfeksiyon veya başka patoloji yokken, gündüz ve gece artmış idrar

yapma sıklığı gibi diğer semptomların eşlik ettiği mesane dolumuyla ilişkili “suprapubik ağrı şikayeti” tanımını tercih etmektedir. Amerikan Üroloji Derneği'nin (AÜD) tanımında ise bu tür semptomların en az 6 haftalık süreklilik gerekliliği belirtilmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında Guy Hunner bir AÜD toplantısında 17 yıldan uzun süredir suprapubik ağrı, sık idrara çıkma, nokturi ve aniden sıkışma şikâyetleri devam eden 8 hastasını sunmuş ve bu hastalarda mesane duvarlarında kırmızı, kanamalı alanların olduğunu vurgulamıştır. İlerleyen süreçte bu bulgu “Hunner ülseri” olarak bilinecektir ve günümüzde halen tanıda kullanılmaktadır (Aydoğan, 2017).

Sonraları Dr. Guy Hunner'in tanımlamış olduğu bu bulgu, Dr. Walsh tarafınca 1978 basımlı “Campbell's Urology” kitabında ilk kez “glomerülasyon” olarak tanımlanmıştır (Meijlink, 2014). Sistoskopi yapılması öncelikle MAS/İS ile karışılabilir hastalıkların (mesane tümörü, mesane taşları, divertiküller ve yabancı cisim varlığı gibi) ekartasyonunda önemli bilgiler vermektedir (Aydoğan, 2017). MAS/İS'in 2 adet sistoskopi bulgusu olduğu söylenebilir; Hunner ülseri ve glomerülasyonlar.

Hunner ülserleri genel olarak bir santral skar çevresinde hiperemik mukozal alan ve bu skardan çevreye yayılan küçük vasküler yapılar şeklinde sistoskopide görülmektedir (Aydoğan, 2017). Glomerülasyonlar ise mesanede yaygın noktasal kanama odakları olarak görülür. Bu sistoskopik bulgular ile ağrı ve semptomlar arası ilişki olmadığını gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (Humphrey, 2012). Aynı zamanda bu bulguların MAS/İS için patognomonik olmadığı bilinmelidir.

Kronik ağrı sendromlarının tedavisindeki temel felsefe biyo-psikososyal modeldir. Bu modelde hastaların tedaviye aktif katılması, hastaların endişe düzeylerinin azaltılması, doğru bilgilendirilmesi, tedavi seçeneklerinin anlatılarak hastaların beklentinin de tedavilerin doğasına göre ayarlamalarının sağlanması tedavideki en önemli basamaktır.

Bunların dışında MAS/İS tedavi uygulamalarını;

- Konzervatif Tedavi,
- Farmakolojik Tedavi,
- İntravezikal Tedaviler olmak üzere oldukça geniş kapsamlı tedavi basamaklarını içermektedir (AÜD, 2011).

Veteriner Pratikte ise 1990 yılında ilk kez Clasper idiyopatik AÜSB olan bazı kedi hastaların bulgularının kadınlarda görülen İS ile benzerlik gösterdiğini ileri sürmüştür. Kediler üzerinde yapılan ilk çalışmalarda doğal yollarla oluşan bu kronik idiyopatik AÜSB'li kedilerin insanlardaki İS benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Baranowski vd., 2008; Hanno vd., 2010). 1996 yılında ise ilk defa Buffington vd., (1996) kronik idiyopatik AÜSB'li kedilerin artık “Felin İntersitisyel Sistitis” teşhisi ile tanımlanabileceklerini ortaya koymuşlardır. Buffington

vd., (1999) “Felin İntersitisyel Sistitis” ve “Felin İdiyopatik Sistitis” (FİS) tanımlamalarını çok sayıda araştırma neticesinde gerçekleştirmişlerdir. İlerleyen yıllarda ise AÜSB olan kedilerin aslında tıpkı insanlardakine benzer İS gibi üriner sistem dışında da problemlere sahip oldukları ortaya konulmuştur (Buffington, 2011).

Veteriner Hekimlikte FİS/İS'in teşhis edilebilmesi insan hekimliğindeki gibi zorlayıcı olduğundan hastalığın epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler sınırlı olmakla beraber konu ile ilgili bilimsel çalışmalarda artış görülmektedir. FİS ile ilgili ise henüz ülkemizde epidemiyolojik bir veri bulunmamaktadır. Etiyopatogenizi İS'e benzeyen FİS'te tedavi seçenekleri zorlayıcı olmakla beraber en önemli unsurları nedenlerinin ortaya konulmasını takiben;

- Analjeziklerin Kullanılması,
- Çoklu Modal Çevresel Modifikasyonların Uygulanması,
- Antidepresanların Kullanımı,
- Hasta Sahibinin Eğitilmesi yer almaktadır.

**Nozoloji ve Kedilerde Pandora Sendromu:** “Nozoloji” terimi hastalıkları isimlendirme bilimi olarak tanımlanmaktadır (Buffington, 2011). Hastalık anlamına gelen Yunanca “nosos” kelimesinden üretilmiş bir sözcük olan “Nozoloji”nin Türk Dil Kurumu'nda karşılığı bulunmamaktadır. Tıbbın bir dalı olan nozoloji hastalıkların sınıflandırılmasıyla ilgilenen bilim dalıdır. Hastalıkları, etiyoloji, patogenez veya semptoma göre sınıflandırılabilir. Aslında bir hastalık için doğru isimlendirmeyi yapabilmek oldukça zor bir durum olabilmektedir. Bunun en önemli nedenin ise hastalıkların etiyoloji ve patogenezlerinin bilimsel çalışmalar ile kesin olarak ortaya koyuluncaya kadarki süreçte daha ön planda olan klinik bulgularına göre isimlendirilmelerinden kaynaklanmasıdır. Bazen bir hastalık isimlendirilmesi yapılırken klinik bulgulara ait olan organ ilişkili isimlendirme yapılabilmektedir. Ancak bazı hastalıklarda klinik bulguların kaynağı özde sanılan hastalık olmayabilir ve birden fazla organ da aynı anda etkilenebilir. Bu sayılan faktörlerden ötürü nozoloji kedilerde idiyopatik AÜSB'lerini (Osborne vd., 1999) insanlarda görülen İS ile özleştirmiştir (Hanno, 2008). Her ne kadar “Felin Ürolojik Sendrom” (FÜS) (Osbaldiston & Taussig, 1970), “Felin Aşağı Üriner Sistem Hastalığı” (FAÜSH) (Osborne vd., 1984), ve “Felin İS” (Buffington vd., 1999), günümüzde kedilerde AÜSB'nin teşhis kriterlerini oldukça karşılıyor gibi görünseler de artık birçok kedide problemlerin sadece bu tanımlanan hastalıklar olmadığı ortaya konulmuştur (Buffington, 2011). Bu terimler kedilerde şekillenen sorunların bütünüyle ele alınması yerine AÜS'e odaklanarak

AÜSB'ne ait belirgin bulguların tespiti ile teşhise yaklaşım için kullanılmaktadır (Buffington, 2011). 1970 yılında Osbaldiston ve Taussig, (1970) kedilerde disüri, üretral obstrüksiyon, ürolithiazis ve hematüri ile karakterize hastalık semptomlarını "FÜS" olarak tanımlamışlardır. Yazarlar yaptıkları çalışmalar doğrultusunda birden fazla etkileşim sonucunda hastalığın ortaya çıktığını ve bir gruptan ziyade birkaç ürolojik problemi ihtiva etmesinden dolayı hastalık adına FÜS denildiğini aktarmışlardır (Osbaldiston & Taussig, 1970). 1984 yılında Osborne vd., (1984) ise FÜS teriminin "FAÜSH" terminolojisi ile değiştirilmesi gerekliliği konusunda öneride bulunmuşlardır. Osborne vd., (1984) bu önerileri kabul görmüş ve AÜSB'nin "heterojen nedenler"ini içeren konsepti kaybedilmiş yerine yine karmaşıklığa yol açan terminolojisi "FAÜSH" kabul görmüştür. Daha önce de belirtildiği üzere 1996 yılında ilk defa Buffington vd., (1996) kronik idiyopatik AÜSB gösteren kedilerin artık "FİS" teşhisi ile tanımlanabileceklerini ortaya koymuşlardır. 1999 yılında yine Buffington vd., çok sayıda araştırma neticesinde "Felin İdiyopatik Sistitis" tanımlamalarını gerçekleştirmişlerdir.

Kedilerde AÜSB'ne dair nozolojik tanımlamalarının en sonuncusu ise yine Buffington, (2011) tarafından ilk defa "Pandora Sendromu" terimini kullanmaya başlamasıyla ortaya çıkmıştır. Buffington (2011) biyolojik olarak en uygun nozolojik bir terim bulunana kadar kronik idiyopatik AÜSB gösteren kedilerde bu ifadeyi kullanmayı tercih etmiştir.

Zira artık Buffington vd., (2014) AÜSB olan kedilerin sonradan aslında farklı problemleri olduğunun da tespit edilmesi üzerine FÜS, FAÜSH, FİS ya da İS terminolojilerinin bu hastalık durumunu karşılamadıklarını belirtmişlerdir.

"Pandora Sendromu"nun kesin teşhis kriterlerini ise;

- I. Hastanın sadece belirli bir organa yönelik kronik idiyopatik klinik bulguların değerlendirilmeye alındığı anda eşlik eden başka organ ve sistemlere yönelik belirtilere de sahip olması gerekliliğidir. Örneğin; kedilerde kronik AÜS bulgularının yanında farklı kombinasyonlarda gastrointestinal kanal, deri, solunum, kardiyovasküler, santral sinir, endokrin ve immun sistemlerine ait farklı bulguların da eşlik etmesi sayılabilir (Buffington vd., 2006a; Buffington vd., 2006b).
- II. Büyük ölçüde Santral Stres Yanıt Sistemi'ni aktive eden olayların ön planda olduğu ve bu olayların şiddetinin artması ve azalması neticesinde AÜS'e ait klinik bulguların değişiklik göstermesi (Buffington vd., 2006a; Stella vd., 2011).

- III. Etkili bir çevre düzenlemesi ile klinik belirtilerde gerilemenin görülmesi (Buffington vd., 2006a; Stella vd., 2011).
- IV. Erken hayattaki olumsuz tecrübe edinimi (terkedilme, sahiplenilme gibi).

Buffington (2011) yukarıda belirtilen kriterlere sahip ve kronik AÜSB olan kedilere "Pandora Sendromu"u tanımını neden yaptığını ise iki önemli madde ile açıklamaktadır. Bunlardan birincisi bu sendromda herhangi bir organa yönelik spesifik bir klinik bulguyu anımsatacak bir durum olmamasıdır. İkinci önemli nedenin ise bu tanımlama ile asıl belirtilen problemin dışında kalan birçok karamsar ve tartışma yaratan problemler bütünü kapsaması olduğunu bildirilmektedir (Buffington, 2011). Günümüzde ise artık yaygın olarak kullandığımız kedilerdeki kronik idiyopatik AÜSB tanımının AÜS ve diğer sistemlere ait klinik belirtileri tam anlamıyla karşılamadığı ortaya konulmuştur (Buffington vd., 2006a; Stella vd., 2011).

Sonuç olarak, Chew ve Buffington, (2013) 20 yılı aşkın çalışmaları neticesinde FİS/İS varlığının mesane ve sinir sistemi, adrenal bezler, bakım besleme koşulları ve kedinin yaşadığı çevre ile ilişkili olduğunu ve FİS'li kedilerin ise mutlaka "Pandora Sendromu" yönünden de değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuşlardır.

**Felin İdiyopatik Sistitisin Klinik Bulguları:** Non-obstruktif FİS'li bir kedi klinik olarak sağlıklı gözükmeyle beraber aşağıdaki klinik bulgulara sahiptir (Grauer, 2013).

- Küçük ve kolaylıkla tespit edilebilen bir mesaneyeye sahiptir.
- Mesane duvarlarında kalınlaşma vardır.
- Abdominal palpasyonda mesane civarında ağrı duyumu vardır.
- Mikroskopik ya da belirgin hematüri (eğer gözlenmiyor ise anormal ürinsiyonun diğer davranışsal nedenleri ekarte edilmelidir) gözlenir.

FİS'li kedilerin klinik olarak dört farklı form gösterdiği düşünülmektedir (Tablo 1). Bunlardan birincisi; en yaygın olan ve pratisyen klinisyenlere %80 ila 95 oranında getirilen akut ve kendi kendini sınırlayan, ileride stres koşullarının ciddileşmesi halinde tekrarı görülebilecek epizottur (Lulich vd., 2010). Bu formda 5 ila 7 gün içerisinde kendiliğinden iyileşme gerçekleşir (Chew & Buffington, 2013).

İkinci formu ise FİS'in klinik bulgularının bir sonraki epizotunda tekrar görülmesidir ki %2 ila %15 oranında vakaların ikinci tekrarları görülmektedir (Chew & Buffington, 2013). Üçüncü form ise artık klinik bulguların asla hafiflediği kalıcı formudur ki bu epizotun yine görülme sıklığı FİS'li kedilerde %2 ila %15 oranındadır (Chew & Buffington, 2013).Dördüncü muhtemel formunun ise erkek kedilerin artık FİS'e bağlı



üretal obstrüksiyon ile getirildiği ve %15 ila %25 oranında karşılaşılan epizot olduğu düşünülmektedir (Chew & Buffington, 2013). Birçok bilimsel araştırmada aslında kedilerde FİS'in bu dördüncü formunun Veteriner Fakültesi Hastanelerine getirildikleri görülmektedir. Chew ve Buffington, (2013) göre ise aslında potansiyel bir beşinci formun bulunduğu, bu formda ise yeterli strese

maruz kalmaları halinde AÜSB şekillenebilen sağlıklı özellikle erkek kedilerin olabileceği belirtilmektedir (Stella vd., 2011). Klinik olarak sağlıklı gibi görünen FİS'li kedilerde aşırı perianal ve abdominal yalanma alışkanlığına bağlı olarak tüy dökülmeleri tablonun kronik olduğu yönünde önemli bir ipucu vermektedir (Karagiannis, 2015).

**Tablo 1.** FİS'li kedilere ait klinik bulgu ve görülme oranları Chew & Buffington (2013) ve Grauer (2013)'ten uyarlanmıştır.  
**Table 1.** Clinical signs and prevalence rates of cats with FIC, modified from Chew & Buffington (2013) and Grauer (2013).

FORM	KLİNİK BELİRTİLER	İYİLEŞME	GÖRÜLME SIKLIĞI	
1	Akut sistit epizotları; stres koşullarının artmasına bağlı tekrar görülme olasılığı vardır.	• Pollaküri • Disüri • Strangüri • Hematüri • Peritüri	Kendini sınırlayan 5-7 gün içerisinde tedavi ile veya tedavisiz iyileşme gösterirler.	%80 ila %90
2	Bir yıl içinde tekrarlayabilen ikinci epizot.	• Pollaküri • Disüri • Strangüri • Hematüri • Peritüri	Tedaviye rağmen stres kaynakları ortadan kaldırılamaz ise üçüncü epizota geçiş şekillenir.	%2 ila %15
3	Üçüncü epizot artık kalıcı klinik bulgular vardır. Bir den fazla tekrarlayan epizotlar görülür.	• Pollaküri • Disüri • Strangüri • Hematüri • Peritüri	Klinik bulgular kalıcıdır.	%2 ila %15
4	Dördüncü epizot, erkek kedilerde görülür.	• Üretal obstrüksiyon şekillenir.		%15 ila %25
5	Sağlıklı erkek kedileri oluşturur.	• Strese maruziyet sonrası AÜS gösterir.		Henüz net bir veri bulunmamaktadır.

### **Felin İdiyopatik Sistitiste Tedavi Seçenekleri:**

FİS tedavisi hastanın muayenesindeki ilk klinik bulgularına bağlıdır. Akut AÜSB gösteren kediler genellikle 5-7 gün arasında tedavi uygulanmış ya da uygulanmasını iyileşme göstermektedirler (Grauer, 2013). Akut belirtiler ile getirilen kedilerin tedavilerinde ise ana amaç; stres ve sempatik outputu azaltmak ve ağrıyı yönetmek olmalıdır (Grauer, 2013).

### **İlaç Tedavisi**

**Analjezik İlaç Kullanımı:** En iyi mesane ağrısı (visseral) için analjezik yaklaşım belirlenmiştir (Chew &

Buffington, 2013). Butorfanol kullanılmakla beraber etkisinin ve potentinin buprenorfinden daha az olduğu bilinmektedir (Steagall vd., 2014). Günümüzde buprenorfinin tek enjeksiyon sonrası uzun salınımlı formülasyonu sayesinde 72 saate kadar ağrıda rahatlama sağladığı bilinmektedir (Chew & Buffington, 2013). Fentanil yamaları ise mesane ağrıların çok ciddi olduğu durumlarda nadiren kullanılmaktadır (Chew & Buffington, 2013) (Tablo 2).

**Tablo 2.** FİS tedavisinde ilaç kullanımı Chew & Buffington (2013)'ten uyarlanmıştır.

**Table 1.** Medical treatment in FIC, modified from Chew & Buffington (2013).

Akut Tedavi				
Etken Madde	Sınıf	Endikasyon	Dozaj	Potansiyel Yan Etkiler
Butorfanol	Sentetik kısmi opioid agonisti	Akut epizotlarda, analjezi	0,2-0,4 mg/kg, TID, PO veya SC	Sedasyon
Buprenorfin	Sentetik kısmi opioid agonisti	Akut epizotlarda, analjezi	0,01-0,02 mg/kg BID ya da TID, PO veya SC	Sedasyon
Asepromazin	Fenotiazin derivatı	Sedasyon, anti-spazmotik	0,05 mg/kg, TID, SC	Sedasyon, hipotansiyon
Fentanil	Opioid agonist	Akut epizotlarda, analjezi	25 µg/saat	Solunum depresyonu, bradikardi
Prazosin	α-1 adreno reseptör antagonisti	Anti-spazmotik	2,5 mg/keci başına, BID, PO	Sedasyon, hipotansiyon
Fenoksibenzamin	α-1 adreno reseptör antagonisti	Anti-spazmotik	0,5 mg/keci başına, BID, PO	Sedasyon, hipotansiyon
Kronik Tedavi				
Etken Madde	Sınıf	Endikasyon	Dozaj	Potansiyel Yan Etkiler
Amitriptilin	Trisiklik anti deprezan	FİS	5-12,5 mg/ keci başına, SID, PO	Sedasyon, anti kolinerjik etkiler, kilo alma, idrar retensiyonu, ürolit oluşumu
Klomipramine	Trisiklik anti deprezan	FİS, idrar kaçırma	0,5 mg/kg, SID, PO	Sedasyon, anti kolinerjik etkiler
Buspiron	Non-nebzoiaidin anksiyolitik	FİS, idrar kaçırma	2,5-5 mg/ keci başına, BID, PO	Nadir; sedasyon, diğer nörolojik etkiler
Fluoksatine	Selektif seretonin geri alım inhibitörü	FİS, idrar kaçırma	1 mg/kg, SID, PO	Nadir; grda tüketiminde artış, kusma, letarji
Pentosan polisülfat sodyum	GAG takviyesi	FİS	50 mg/keci başına BID, PO	Nadir; kusma, letarji
Felin yüz feromonlarının F3 fraksiyonu	Sentetik feromon	Anksiyete, FİS	1 fis, etkilenen odaya, SID ya da oda difüzörü	Bildirilmemiş

**Antidepresan İlaç Kullanımı:** Trisiklik antidepresan (TSA) kullanımının bazı durumlarda etkili olabileceği bilinmektedir. Chew ve Buffington, (2013) son dönemlerde FİS tedavisinde çevresel düzenlemenin

tedavideki önemli pozitif etkinliğinin ortaya konulmasından sonra bu TSA ilaçları artık reçete etmediklerini belirtmektedir. Araştırmacılar bir TSA olan amitriptilini sadece en iyi çevresel düzenlemelerin bile

sağlanmasına rağmen yanıt alınamayan ve artık sahibi tarafından ötenazi istemi ile karşı karşıya kalınan durumlarda hasta sahibinin ötenazi isteğini değiştirmek amacı ile tekrarlanan ya da artık kalıcı AÜSB gösteren kedilerde semptomların iyileştirilmesi amacı ile kullanılması gerektiğini bildirmektedirler (Tablo 2) (Chew & Buffington, 2013).

Amitriptilin kullanımından ise FİS başlangıcı olan ya da semptomları çok nadir tekrarlanan süreçte kaçınılmalıdır. İlacın maksimum faydasının sağlanması için haftalar bazen aylar gerektirdiği unutulmamalıdır. Zira ani ilaç bırakımı sonucunda “Ani Bırakma Sendromu” şekillenebilmektedir.

**Glikozaminoglikan Kullanımı:** Çeşitli çalışmalar FİS’te tedavi amacı ile Glikozaminoglikan (GAG) kullanımını değişik uygulama yolları ile denenmiş olup bunların hiçbirinde plasebo grubuna göre üstünlük tespit edilememiştir. Bir çalışmada FİS’li 40 adet kediye plasebo grubu oluşturmak sureti ile 6 ay boyunca günlük ağız yolu ile 125 mg N-asetil glukozamin (NAG) uygulanmıştır (Gunn-Moore & Shenoy, 2004). Çalışma boyunca gruplar arasında ortalama sağlık skorları, aylık klinik skorları arasında ise bir farklılık bulunmamıştır (Gunn-Moore & Shenoy, 2004). İkinci bir çalışmada ise Wallius & Tidholm, (2009) non-obstruktif 18 adet FİS’li kedide 3 mg/kg pentosan polifosfat (PPS) subkutan enjeksiyon yolu ile 1, 2, 5 ve 10. günlerde uygulanmış ancak 5, 10, 14. gün ve 2, 6 ila 12. ay kontrollerinde plasebo grubu ile klinik bulguların değerlendirilmesinde bir farklılık bulamamıştır. Dört üniversitenin yer aldığı multisentrik bir çalışma ile 26 hafta boyunca günde iki kez ağız yolu ile plasebo grubu (0), 2, 8 ve 16 mg/kg dozda PPS verilme üzere toplam dört grup oluşturulmuştur. Sistoskopik skorlamalar dahil olmak üzere bu grupların hiçbirinin klinik skorlamalar ve genel hastalık iyileşmesi yönünde üstünlük göstermediği ortaya konulmuştur (Chew vd., 2009). Sadece sistoskopik muayeneleri esnasındaki doku yıkımının karşılaştırılmasında 16 mg/kg PPS alan grubun diğer gruplara göre daha az hasar belirtisi gösterdiği ortaya konulmuştur (Chew vd., 2009). Dördüncü bir çalışmada FİS’li kedilere 21 gün boyunca ağız yolu ile günde bir kez 250 mg NAG uygulanmış ve 21 gün sonrası plazma GAG konsantrasyonlarında artış ve subjektif olarak NAG uygulanan kedilerde plasebo grubuna göre klinik iyileşme olduğu belirtilmiştir (Panchaphanpong vd., 2011).

Sonuç olarak GAG kullanımı insanlardaki MAS/İS’te çeşitli doz ve uygulamalarla oldukça fazla denenmiş ancak hiçbirinde plasebo gruplarına göre üstünlük görülmemiştir. Benzer uygulamalar Veteriner pratikte heyecanla karşılanmış ancak aynı olumsuz sonuçlarla FİS’li kedilerin tedavi denemelerinde de karşılaşılmıştır. Bu sebepten sentetik GAG kullanımlarının FİS’li kedilerin tedavisinde başarılı olarak kullanıldığına

dair bir veri bulunmamakla beraber GAG’ların rutin tedavi protokollerde yeri hala tartışmalıdır.

**Çevresel Düzenleme:** Suyun üriner sistem taş oluşumunun önlenmesinde ne kadar önemi varsa, çevresel düzenlemenin de FİS’li kedilerde önemi oldukça büyüktür (Westropp & Buffington, 2004). Bu görüş FİS’li kedilerde görülen nöroendokrin anormalliklerle ortaya konulmuştur (Westropp vd., 2003).

Westropp ve Buffington, (2004) çevresel düzenleme ile ev içinde yaşayan kediler için birtakım koşulların gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Bu yaklaşıma “Çoklu Modal Modifikasyon” denilmektedir. Bunların başında;

- Yaşamsal koşullara ulaşım kolaylığı,
- Sahip ile etkili bir iletişim,
- Evde yaşayan diğer kediler ile tolere edilebilir çatışma halleri,
- Düzeni bozmayacak değişiklik ya da değişiklikler gelmektedir.

Westropp ve Buffington, (2004) geleneksel olarak evde yaşayan kedi sayısı için önerilen “1 + 1” kuralını daha da genişleterek özellikle kum kapları ve diğer yaşamsal gereklilikler (mama ve su kapları vs.) için evde yaşayan her kedi için önerilen sayının bir fazlasının konulması gerektiğini önermektedirler.

**Beslenme:** Davranış ve etolojik çalışmalar kedilerin bireysel olarak sessiz bir ortamda başka hayvanlar tarafından rahatsız edilmeyen, ani hareket ya da aktivitelerin örneğin ani bir hava akımı ya da bir olayın başlangıcından uzakta beslenmeyi tercih ettiklerini göstermektedir (Turner & Bateson, 2000). Her ne kadar FİS’li kediler için su içeriği ve ağızda bırakmış olduğu lezzetten dolayı yaş mama tüketimi tercih edilse de birçok kedi FİS’e rağmen kuru mamayı da tercih edebilmektedir. Bazı kedi diyetlerinin içinde yer alan ve içeriğinde fitoöstrojen kaynağı olan soyanın FİS’i kötü yönde etkilediği düşünülmektedir (Shir vd., 2002). Doğal kedi beslenme davranışında aslında kedilerin iz sürmesi ve avlarının üstlerine kapaklanmalarını gerekmektedir (Westropp & Buffington, 2004). Bu davranışlarını kedilerin ev ortamında devam ettirmelerine olanak sağlamak gerekmektedir. Özellikle “Bulmaca Beslenmesi” olarak sevdiği ya da ödül niteliğindeki gıdaları ya da kuru mamayı ayrı parçalar halinde küçük kutulara ya da kedi için ulaşılabilir özel bölmelere koymak kedileri iz sürmeleri yönünde heveslendirecektir (Westropp & Buffington, 2004). Aynı zamanda bazı kedilerin özel av tercihleri olabilmektedir. Örneğin bazıları kuşları yakalamayı tercih ederken bazıları fare ya da böcekleri avlamaktan mutluluk duyabilmektedir. Bir kedinin “Av Tercihini”ni belirleyerek onun seveceği oyuncağın bulunması için güzel bir yöntemi oluşturmaktadır. Böylelikle kuş tüyleri, küçük pelüş kemirgenler ya da

insekt oyuncaklar onları mutlu kılabilir (Westropp & Buffington, 2004).

**Suya Ulaşım:** Aslında kedilerin gıda ile beslenmelerinde olduğu gibi su içme tercihlerinin de olduğu bilinmektedir. Su ilişkili en önemli faktörler arasında suyun tazeliği, tadı, hareket hali veya su kabının şekli önem arz edebilir (örn; bazı kedilerin bıyıklarının su kabına değmeleri onları hoşnutsuz ya da kızgın yapabilmektedir (Westropp & Buffington, 2004). Tıpkı beslenmede aktarıldığı gibi kedilerin su kaplarındaki ya da su içme alışkanlıklarında da yapılması gerekli değişikliklerde tercih onlara bırakılmalıdır. Bununla birlikte su ve mama kaplarının düzenli temizlik ve hijyenleri sağlanmalıdır (Westropp & Buffington, 2004).

**Tuvaleti Düzenleme:** Kedilerin kum kapları özellikle birden fazla nüfusa sahip kedili evlerde mümkün olabilen en uzun aralıklara evin farklı ve bölgelerine yerleştirilmelidir (Horwitz, 1997). Farklı kum kapları kullanılacak ise tıpkı beslenmede olduğu gibi bunların da kediler tarafından denenmelerine müsaade etmek gerekmektedir (Westropp & Buffington, 2004). Eğer üriner sistem şikâyeti ya da geçmişi var ise kokusuz ve mutlaka topaklaşan bir kum önerilmelidir. Kum kaplarının düzenli temizliklerinin yapılması ve kumların yenilenmesi gereklidir. Zira bazı kediler temiz olmayan kum kaplarından hiç hoşlanmazlar ve bu durum da son derece önemli bir stres kaynağını oluşturabilmektedir. Bazı kediler için yine kum kabının büyüklüğü ve şekli de önem arz edebilir. Bu yüzden daima bireysel tercihlerine önem vermek gerekmektedir (Westropp & Buffington, 2004).

**Yaşam Alanı:** Kediler tıpkı diğer hayvanlar ve sahipleri gibi etraflarındaki fiziksel yapılar ile de ilişki içerisinde olmak isterler. Kedinin sahip olduğu fiziksel çevrenin mutlaka dikey ve yatay alana yayılması gerekmektedir (Horwitz, 1997). Onlar tırmalamak, tırmanmak, saklanmak ve dinlenmek için alana ihtiyaç duymaktadırlar. Kediler tıpkı büyük ataları gibi yüksek alanlardan etraflarını izlemek isterler (Westropp & Buffington, 2004). Ani seslerden ürkmemesi için kedilerin ortamlarında radyo çalınması ya da insan ses kayıtlarının düzenli dinletilerek alışkanlık kazanılması önerilmektedir. Hatta görsel uyaranlar için video uygulamaları bile önerilmektedir (Westropp & Buffington, 2004).

**Oyun:** Bazı kediler sahipleri tarafından sevilme ve taranma isterken, bazıları da sahipleri ile sadece oynamayı tercih edebilmektedir. Aslında kediler kolaylıkla belirli davranışların sergilemesi açısından eğitilebilirler (Westropp & Buffington, 2004). Bunun için sahiplerinin belirli kalıplaşan davranışın beslenmeden hemen önce mi şekillenip şekillenmediğine dikkat etmesi gerekir. Birçoğu ise oyuncaklar ile oynamaya bayılırlar. Özellikle de küçük, hareketli av karakteristiğinde olanlar onlar için çok caziptirler. Bununla beraber bazıları çok daha özel

oyuncakları sevebilir. Bundan dolayı doğru oyuncakın bulunması için zaman zaman farklı alternatiflerin sunulması gerekebilir (Westropp & Buffington, 2004).

**Çatışmanın İyileştirilmesi:** Kediler kendilerini güvende hissetmedikleri anda güvenliği kontrol altında tutmak adına tehdit unsurlarına karşı yanıt verirler. Bu yanıtlar esnasında ise saldırgan, içine kapanık ya da oldukça hasta olabilirler. Westropp ve Buffington, (2004) ise kediler arası çatışmalarının birden fazla kedinin yaşadığı ve sağlık problemlerinin yer aldığı evlerde yaşandığını ortaya koymuşlardır. Kedilerde meydana gelen çatışma büyük ölçüde ev içindeki veya dışındaki kedi varlığından kaynaklanabilmektedir. Bu durum onların evdeki hiyerarşik sıralamalarının değişmesi ile sonuçlanabilmektedir (Barry & Crowell-Davis, 1999). Aslında küçük bir pratikle bile bir kediye ait çatışma bulguları belirlenip FİS'teki potansiyel rolleri tespit edilebilir (Westropp & Buffington, 2004). Bu noktada hasta sahiplerine bu durum net ve açık olarak anlatılabilirse ev ortamında çatışma halleri kolaylıkla düzeltilebilir.

**Feromon Kullanımı:** Felin Fasiyal Feromon (FFF) idrar püskürtme ve işaretleme gibi birçok konuda kedilerin davranışsal modifikasyonlarında yardımcı olduğu düşünülen sentetik bir kedi feromonudur. Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu idrarla püskürtme ve işaretleme ile sonuçlanan uyarı sisteminin bir parçasıdır ve bu ürünlerin sempatik sinir sistemi çıktısının yoğunluğunu azalttığı düşünülmektedir (Chew & Buffington, 2013). Bir çalışmada hasta kedilerin hospitalize edilecekleri kafeslerin önceden plasebo ya da FFF ile muamele edildikleri ve kedilerin hospitalizasyon sırasında video ile kayıt altına alınarak beslenme ve davranış değişikliklerinin izlendiği bildirilmiştir (Griffith vd., 2000). Griffith vd., (2000) yapmış oldukları bu çalışmada FFF'a maruz kalan kedilerin yalandıkları, yüzlerini etrafa sürttükleri, gıda ve suya ilgilerinin olduğu ve yürümeyi tercih ettikleri ortaya konulmuştur. Bu çalışma sonucunda FFF'a maruz bırakılan kedilerin diğer gruba göre rahat ve uyumlu oldukları belirlenmiştir (Griffith vd., 2000). Chew ve Buffington, (2013) klinik tecrübelerine göre bazı kedilerin FFF'a daha fazla yanıt verirken diğerlerinden hiç yanıt almadığını belirlemektedirler. Bir randomize, çift-kör, plasebo kontrollü çalışmada 12 adet tekrarlayan FİS'li kediye günlük FFF uygulaması ile çevresel modifikasyonun denendiği çalışmada iki ay boyunca FFF uygulanan kedilerin FİS epizotlarında ve klinik bulgularında azalma tespit edilmiştir (Gunn-Moore & Shenoy, 2004). Ancak, denek sayısının az olması tedavi denemelerinin istatistiksel bir üstünlük kazandırmasında etkili olmamıştır (Gunn-Moore & Shenoy, 2004).

**Hasta Sahibini Eğitmek:** Son ama belki de en önemli olarak tıpkı insanlardaki çocuk-ebeveyn ilişkisinde olduğu gibi kedinin merkezi sinir uyarımlarının olumsuz

yönde etkileyen dışsal nedenleri hasta sahibi ile azaltma yoluna gitmek gerekmektedir (Webster-Stratton & Herbert, 1993).

Bu anlamda bazı önerilen tavsiyelere uymak faydalı olabilmektedir (Brody, 2000). Özellikle hasta sahiplerinin kedilerine olan yaklaşımlarını olumlu yönde değiştirebilmek için onların bu yöndeki farkındalığını arttırmak gereklidir. Bunun için de özellikle hasta sahiplerinin;

1. Kendilerinin Veteriner Hekimlerce yeterince dinledikleri kanaatinde olmaları gerekmektedir.
2. Kendileri için önemli olan bir problem için bir çözüm yolunun oluşturulduğu konusunda tatminkâr olmaları gerekmektedir.
3. Klinikteki Veteriner Hekim ya da Veteriner Teknisyenlerin önerileri ve endişelerinin hasta sahiplerine iyi anlatılması gerekmektedir.
4. Klinik ya da hastaneden ayrılırken kedilerinin hastalığı ile ilgili oldukça donanımlı ve konuya hâkim olduklarından emin olmalıdırlar (Chew & Buffington, 2013).

FİS'in kronik ve zorlayıcı bir hastalık olmasından dolayı hasta sahipleri ile iletişim esnasında iken bu dört maddenin uygulanması hasta, hasta sahibi ve klinisyen açısından olumlu sonuçlar doğmasına neden olacaktır. Chew ve Buffington, (2013) bu konuda bir Veteriner Teknisyen Eğitim programı hazırlayarak sadece FİS'li kedilerle ilgilenen bir ekip kurma çabası içinde bulunmuşlardır.

## SONUÇ

Nöroendokrin anormallikleri barındıran FİS'li kedilerin çevresel düzenlemelere yanıtları sağlıklı kedilerin varlığında zorlaşmaktadır. Bu sebepten bu popülasyondaki kedi ihtiyaçlarının daha fazla olduğu bilinmeli ve ihtiyaçlarının sağlıklılardan ayrı olarak değerlendirilmesi gerekliliği akıldan çıkarılmamalıdır. Bununla birlikte klinisyenlerin FİS'li kedilere uygulanması gerekli çevresel modifikasyonlarının optimizasyonun aslında sağlıklı ev ortamında hayatta kalmaya çalışan kedilerin ihtiyaçlarını belirlemekten oldukça zor olduğunu da bilmeleri gerekmektedir.

Sonuç olarak, kronik ve zorlayıcı olan FİS teşhisinde her zaman kedinin yaşadığı çevre ve buna neden olan nöroendokrin uyarımların düzenlenmesi daima akılda tutulması gerekli bir konudur. Bu anlamda çevresel modifikasyon uygulamaları tedavinin ana unsurudur. Öte yandan kronik ve tedavi edilemeyen FİS'li kedilerin Pandora sendromu yönünden ele alınmaları gerekliliği de akıldan çıkarılmamalıdır.

## KAYNAKLAR

- Aydoğan, TB. (2017).** *İnterstisyel sistit etiyojisinde mikrobiyolojik araştırmanın yeri.* Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, Türkiye, 11-40s.
- AÜD. (2011).** Diagnosis and treatment interstitial cystitis/bladder pain syndrome (2014) Erişim tarihi: 14.01.2020. [https://www.auanet.org/guidelines/interstitial-cystitis-\(ic/bps\)-guideline](https://www.auanet.org/guidelines/interstitial-cystitis-(ic/bps)-guideline).
- Baranowski, A.P., Abrams, P. & Berger, R.E. (2008).** Urogenital pain-time to accept a new approach to phenotyping and, as a consequence, management. *European Urology*, **53**, 33-36.
- Barry, K.J. & Crowell-Davis, S.L. (1999).** Gender differences in the social behavior of the neutered indoor-only domestic cat. *Applied Animal Behaviour Science*, **64**(3), 64-193.
- Brody, H. (2000).** The placebo response-recent research and implications for family medicine. *The Journal of family practice*, **49**, 649-54.
- Buffington, C.A. (2011).** Idiopathic cystitis in domestic cats-beyond the lower urinary tract. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **25**(4), 784-796.
- Buffington, C.A., Blaisdell, J.L. & Binns, S.P. (1996).** Decreased urine glycosaminoglycan excretion in cats with interstitial cystitis. *Journal of Urology*, **155**, 1801-1804.
- Buffington, C.A.T., Chew, D.J. & Woodworth, B.E. (1999).** Feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **215**, 682-687.
- Buffington, C.A.T., Westropp, J.L. & Chew, D.J. (2006a).** A case-control study of indoor-housed cats with lower urinary tract signs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**, 722-725.
- Buffington, C.A.T., Westropp, J.L. & Chew, D.J. (2006b).** Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **8**, 261-268.
- Buffington, C.A.T., Westropp, J.L. & Chew, D.J. (2014).** From FUS to Pandora syndrome: where are we, how did we get here, and where to now? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **16**, 385-394.
- Chew, D.J. & Buffington, C.A.T. (2013).** Pandora syndrome: It's more than just the bladder. *American Association of Feline Practitioners Conference*, Dallas, Texas, **September**, **26**(29), 75-83.

- Chew, D.J., Bartges, J.W., Adams, L.G., Kruger, J.M. & Buffington, C.T. (2009).** Randomized trial of pentosan polysulfate sodium for treatment of feline interstitial (Idiopathic) cystitis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **23**(3), 690.
- Clasper, M. (1990).** A case of interstitial cystitis and Runner's ulcer in a domestic shorthaired cat. *New Zealand veterinary journal*, **38**, 158-160.
- Grauer, G.F. (2013).** Current thoughts on pathophysiology & treatment of feline idiopathic cystitis. *Today's Veterinary Practice*, **3**(6), 38-41.
- Griffith, C.A., Steigerwald, E.S. & Buffington, C.A. (2000).** Effects of a synthetic facial pheromone on behavior of cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **217**, 1154-6.
- Gunn-Moore, D.A. & Shenoy, C.M. Oral. (2004).** glucosamine and the management of feline idiopathic cystitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **6**, 219-225.
- Hanno, P., Lin, A. & Nordling, J. (2010).** Bladder pain syndrome committee of the international consultation on incontinence. *Neurourology Urodynamics*, **29**, 191-198.
- Hanno, P.M. (2008).** Re-imagining interstitial cystitis. *Urologic Clinics of North America*, **35**, 91-99.
- Humphrey, L. (2012).** The bladder pain/interstitial cystitis symptom score: development, validation, and identification of a cut score. *European Urology*, **61**(2), 271-9.
- Karagiannis, C. (2015).** Stress as risk factor for disease. In: Rodan, I. & Heath, S. (Ed), *Feline behavioral health and welfare*, pp 138-147p, St Louis, Mosby Elsevier.
- Lulich, J., Osborne, C. & Kruger, J. (2010).** What constitutes a diagnosis of feline idiopathic cystitis? *American College of Veterinary Internal Medicine Forum 2010*, 9-12 June 2010, Anaheim, California, USA, 630-633.
- Meijlink, J.M. (2014).** Interstitial cystitis and the painful bladder: a brief history of nomenclature, definitions and criteria. *International Journal of Urology*, **21**, 4-12.
- Osbaldiston, G.W. & Taussig, R.A. (1970).** Clinical report on 46 cases of feline urological syndrome. *Veterinary medicine, small animal clinician*, **65**, 461-468.
- Osborne, C.A., Johnston, G.R. & Polzin, D.J. (1984).** Redefinition of the feline urologic syndrome: Feline lower urinary tract disease with heterogeneous causes. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **14**, 409-438.
- Osborne, C.A., Kruger, J.M. & Lulich, J.P. (1999).** Feline urologic syndrome, feline lower urinary tract disease, feline interstitial cystitis: What's in a name? *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **214**, 1470-1480.
- Panchaphanpong, J., Asawakarn, T. & Pusoonthornthum, R. (2011).** Effects of oral administration of N-acetyl-d-glucosamine on plasma and urine concentrations of glycosaminoglycans in cats with idiopathic cystitis. *American journal of veterinary research*, **72**, 843-50.
- Shir, Y., Campbell, J.N. & Raja, S.N. (2002).** The correlation between dietary soy phytoestrogens and neuropathic pain behavior in rats after partial denervation. *Anesthesia and Analgesia*, **94**, 421-426.
- Steagall, P.V., Monteiro-Steagall, B.P. & Taylor, P.M. (2014).** A review of the studies using buprenorphine in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, **28**, 762-770.
- Stella, J.L., Lord, L.K. & Buffington, C.A.T. (2011).** Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **238**, 67-73.
- Turner, D.C. & Bateson, P. (2000).** *The domestic cat: the biology of its behaviour*, 2nd ed., Cambridge: Cambridge University Press, UK, 244p.
- Wallius, B.M, & Tidholm, A.E. (2009).** Use of pentosan polysulphate in cats with idiopathic, non-obstructive lower urinary tract disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **11**, 409-412.
- Webster-Stratton, C. & Herbert, M. (1993).** What really happens in parent training. *Behaviour Modification*, **17**, 407-456.
- Westropp, J.L. & Buffington, C.A.T. (2004).** Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **34**, 1043-1055.





## Detection of Hg<sup>2+</sup> in Aqueous Media by A New Xanthene Based Schiff Base Sensor

Kaan KARAOĞLU

Recep Tayyip Erdogan University, Vocational School of Technical Sciences, Department of Chemistry and Chemical Process Technology, 53100 Rize, Turkey

Geliş/Received: 29.01.2020

Kabul/Accepted: 27.02.2020

How to cite: **Karaoğlu, K. (2020)**. Detection of Hg<sup>2+</sup> in aqueous media by a new xanthene based schiff base sensor . *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 74-79.

Atıf yapmak için: **Karaoğlu, K. (2020)**. Yeni Bir Ksanten Bazlı Schiff Bazı Sensörü ile Sulu Ortamda Hg<sup>2+</sup> Tespiti. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 74-79.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0003-3265-8328>

**\*Corresponding author's:**

Kaan KARAOĞLU  
Recep Tayyip Erdogan University,  
Vocational School of Technical Sciences,  
Department of Chemistry and Chemical  
Process Technology, 53100 Rize, Turkey  
✉: [kaan.karaoglu@erdogan.edu.tr](mailto:kaan.karaoglu@erdogan.edu.tr)  
Mobile telephone : +90 (553) 425 86 08  
Telephone : +90 (464) 228 00 22  
Fax : +90 (464) 228 00 25

**Abstract:** A xanthene-based colorimetric sensor, 2-((5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)amino)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isindoline-1,9'-xanthen]-3-one, was designed and its metal sensing properties was evaluated in aqueous solutions. The sensor showed colorimetric response toward Hg<sup>2+</sup> from colorless solution to pink among various metal ions such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. The addition of Hg<sup>2+</sup> exhibits an absorption enhancement of the sensor based on a spirocycle ring-opening process and a subsequent hydrolysis reaction. The detection limit of the sensor for Hg<sup>2+</sup> was found to be 7.88×10<sup>-8</sup> M.

**Keywords:** Isatin, Mercury sensor, Rhodamine B hydrazide.

## Yeni Bir Ksanten Bazlı Schiff Bazı Sensörü ile Sulu Ortamda Hg<sup>2+</sup> Tespiti

**\*Sorumlu yazar:**

Kaan KARAOĞLU  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,  
Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu,  
Kimya ve Kimyasal Proses Teknolojisi  
Bölümü, 53100 Rize, Türkiye  
✉: [kaan.karaoglu@erdogan.edu.tr](mailto:kaan.karaoglu@erdogan.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (553) 425 86 08  
Telefon : +90 (464) 228 00 22  
Faks : +90 (464) 228 00 25

**Öz:** Bir ksanten bazlı kolorimetrik sensör, 2-((5-kloro-2-oksoindolin-3-iliden)amino)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on, bileşiği tasarlanmış ve sulu ortamda metal tespit özellikleri incelenmiştir. Sensör bileşiği Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> iyonları arasında Hg<sup>2+</sup> iyonuna renksizden pembeye değişen kolorimetrik karşılık vermiştir. Hg<sup>2+</sup> iyonlarının ilavesi ile sensör bileşiği spirohalka açılması ve ardından hidroliz tepkimesi yaparak absorpsiyon artışı sergilemiştir. Sensörün Hg<sup>2+</sup> iyonu için tespit limitinin 7,88×10<sup>-8</sup> M olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Cıva sensör, izatin, rhodamine B hidrazit.

## INTRODUCTION

Ion content of water is essentially crucial for humans because deficiency or excess intake of metal ions to body causes the metabolic disorder. Bioaccumulation of mercury, one of the neurotoxic metal, causes immune

system failure (Voutsadaki et al., 2010, Verep et al., 2018). Because of its possible damage to the ecosystem, mercury should be monitored effectively in water sources. Some sophisticated systems such as inductively coupled plasma

mass/emission spectrometry (ICP-MS and ICP-AES), atomic absorption spectrometry (AAS) which require expensive instrumentation and pretreatments have been applied to detect trace amount of mercury (Cope et al., 1982; Jarzyńska & Falandysz, 2011; Yuan et al., 2014). On the other hand, optical techniques enable real-time and high precisely online analysis of metal ions (Yoon et al., 2007). Therefore, design fluorescent chemosensors for the detection of mercury ion at the nano-molar level is of great current interest (Aksuer et al., 2011; Cammann et al., 1991; Farruggia et al., 2006; Zhao et al., 2011).

Colorimetric sensors such as triazine, coumarin, quinolone, rhodamine, and chromenylum-cyanine have been designed for detection of the transition metal ions in aqueous media (Aksuer et al., 2011; Du et al., 2017; Voutsadaki et al., 2010; Wei et al., 2016). Hydroxybenzaldehyde Schiff bases derived from Rhodamine B, one of the most used probe structure, enables  $\text{Cu}^{2+}$  sensing via coordination of transition metal ion through phenolic oxygen and imine nitrogen atoms of the sensor because of its large association constant (Li et al., 2015; Tang et al., 2011; Xiang et al., 2006). Copper sensing properties of the rhodamine B hydrazide and its Schiff base derivatives have been investigated extensively, while few reports have focused on mercury sensing properties of this class of compounds (Jiao et al., 2016; Wanichacheva et al., 2012).

In this work, a new xanthene based Schiff base chemosensor was designed and characterized. Rhodamine B based probe synthesized by condensation reaction between rhodamine B hydrazide and 5-chloroisatin. The molecular structure of the sensor was characterized by IR, UV-vis., LC-MSMS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and mass analysis. Spectrophotometric  $\text{Hg}^{2+}$ -sensing properties of the sensor among various metal ions such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  have been investigated at physiological pH.

## MATERIAL AND METHOD

The aqueous solutions of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , and  $\text{Pb}^{2+}$  ions were freshly prepared from their nitrate salts except for  $\text{Mn}^{2+}$  was prepared acetate salt. Hydrazine hydrate was obtained from Merck and rhodamine B was obtained from Sigma Aldrich. All the solvents were of reagent grade and used as received.

The infrared (FT-IR) spectra of the compounds were recorded on a Perkin Elmer Spectrum 100 spectrometer equipped with an ATR apparatus. UV/vis experiments were performed on a Spectrocan DV 60 spectrophotometer. Heated-electrospray mass spectra (H-ESI) were recorded using Thermo Sci. TSQ Quantum

Access MAX Triple Stage Quadrupole mass spectrometer and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on an Agilent Technologies 400/54 spectrometer at the Central Research Laboratory of Recep Tayyip Erdogan University.

**Synthesis of sensor:** Rhodamine B hydrazide (**1**) was prepared according to the procedure described by Zhang et al. (2017). A round bottom flask was charged with an ethanolic solution of rhodamine B (2.0 g) under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at room temperature, and then hydrazine hydrate (8 mL, 85%) was added dropwise to the solution. The reaction was carefully controlled by TLC monitoring. The mixture was cooled to room temperature, and the microcrystalline product was filtrated under vacuum. Microcrystalline product was treated by 1 M hydrochloric acid then the pH of the solution was adjusted to 8 by NaOH solution. The resulting precipitate was filtered, washed three times with pure water, and then purified by column chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EtOH, 100:2.5, v/v). 5-Chloroisatin (0.182 g, 1.0 mmol) was added to an ethanolic solution of **1** (0.503 g, 1.1 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was heated under reflux for 4 hours and then the solvent removed by rotary under reduced pressure. The obtained solid product was purified by column chromatography,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /EtOH (100:2.5, v/v) (Figure 1).

Yield: 42%. Color: Pale yellow.  $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{ClN}_5\text{O}_3$  (M= 620.13), ESI-MS, m/z (%): 619.67 (91%)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 641.78 (44%)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1748  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1704  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1613  $\nu(\text{C}=\text{N}-)$ , 1544–1449  $\nu(\text{Ar-H})$ , 1214  $\nu(\text{C}-\text{O})$ .

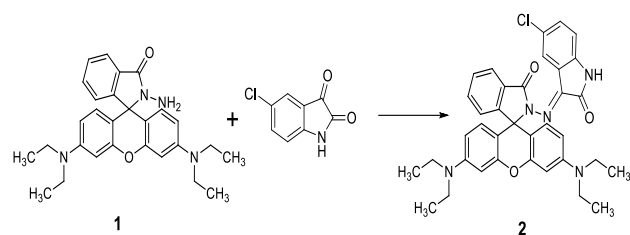
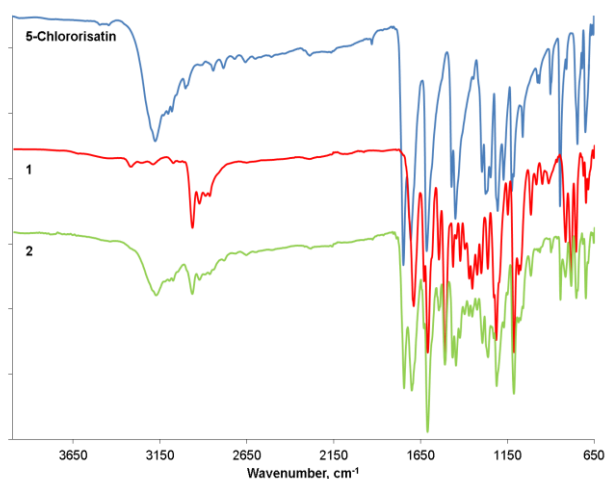


Figure 1. Synthesis reaction of the sensor.

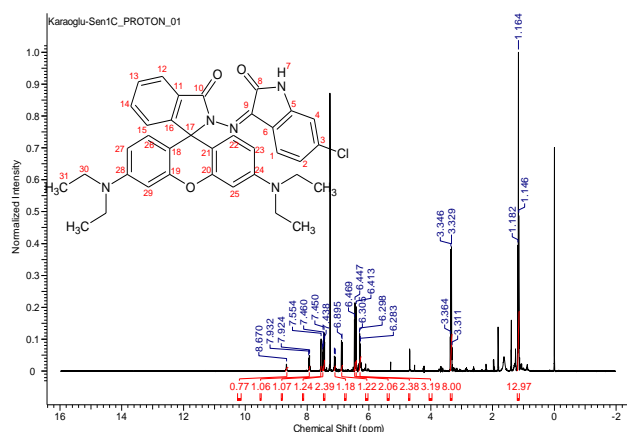
## RESULTS AND DISCUSSION

**Structural Characterization:** The compounds were characterized by spectroscopic techniques such as IR, UV-Vis,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, mass and elemental analysis. Characteristic FT-IR peaks corresponding to C=O and NH groups for 5-chloroisatin were observed at 1747 and 3179  $\text{cm}^{-1}$ , respectively (blue line in Figure 2). FT-IR spectra of **1** give a characteristic peak at 3326, 3198, and 1657  $\text{cm}^{-1}$ , which are assignable to a N-H stretching band and a C=O stretching bands. The disappearance of amine peaks at 3326 and 3198  $\text{cm}^{-1}$  (red line in Figure 2) and appearance of a new peak at 1704  $\text{cm}^{-1}$  supports the condensation of 5-

chloroisatin with **1**. IR spectrum of the sensor shows two absorption band at 2970 and 2929  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to CH stretching.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the compounds have been recorded in  $d_6$ -dimethylsulfoxide, and spectra are in accordance with suggested structures (Figure 3 and Figure 4) (Aires-de-Souza et al., 2002; Banfi&Patiny, 2008; Binev & Aires-de-Souza, 2004; Binev et al., 2004; Castillo et al., 2011). The characteristic proton signals corresponding to NH,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}_2$  signals were observed at 8.670 (a broad singlet), 3.328 (a quartet) and 1.164 ppm (a triplet), respectively. The characteristic  $^{13}\text{C}$  NMR signals of  $\text{C}_{10}$  and  $\text{C}_{17}$  corresponding spirocycle closed-form were observed at 166.175 and 65.957 ppm, respectively (see **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.** for detailed information). The mass spectrum of compound **2** showed a high intensity protonated molecular ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  peak at  $m/z$  619.67 (91%) and  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak at  $m/z$  641.78 (44%) (Figure 5)



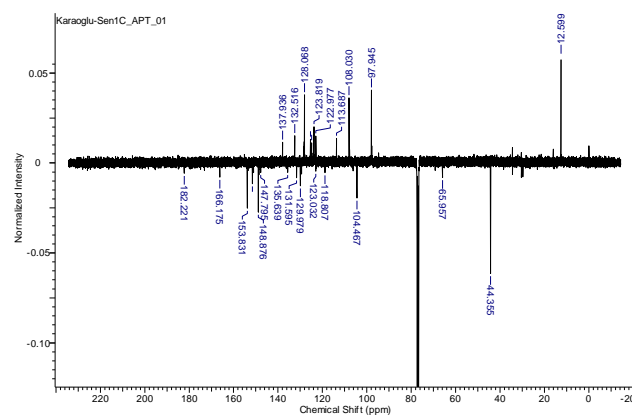
**Figure 2.** FTIR spectra of Rhodamine B hydrazide (**1**) and sensor (**2**).



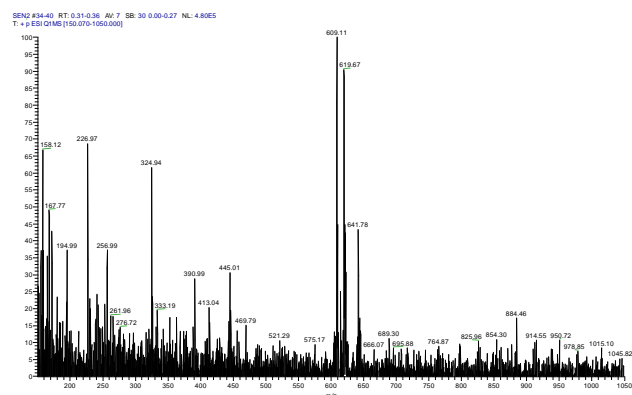
**Figure 3.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **2**.

**Selectivity of Sensor:** The selectivity experiments were carried out by using a  $1 \times 10^{-5}$  M sensor and a series of

mono-, di- and trivalent metal ions solutions in EtOH/water mixture (1:1) at pH 7.02. Optical responses of the sensor toward  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  ions were examined at visible region, Figure 6A. An absorption enhancement was observed at 557 nm after the  $\text{Hg}^{2+}$  addition. Other metal ions did not cause any significant changes, except for  $\text{Cu}^{2+}$  showed a considerably low optical response to sensor solution. The present chemosensor based on 5-chloroisatin Schiff base showed selectivity toward  $\text{Hg}^{2+}$ , while isatin based analog generates optical response  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  (Xu et al., 2012).



**Figure 4.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **2**.

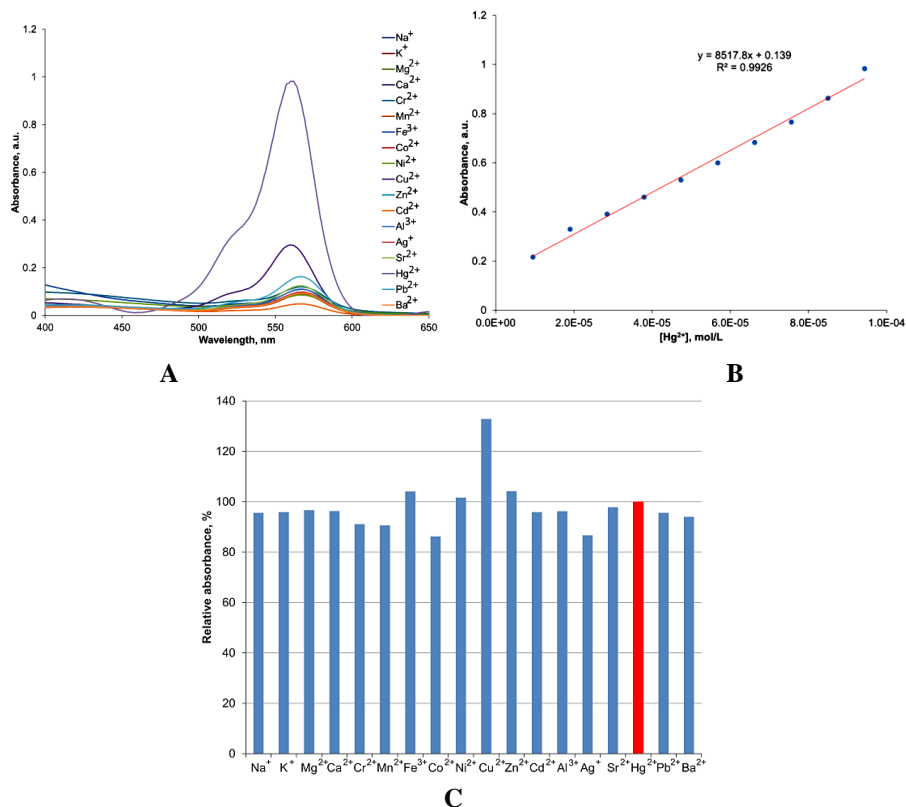


**Figure 5.** H-ESI mass spectra of the sensor.

The limit of detection (LOD) by the method adopted by UIPAC was determined from the following equation (Currie, 1995):

$$\text{Limit of detection} = 3 \times \frac{S_d}{S}$$

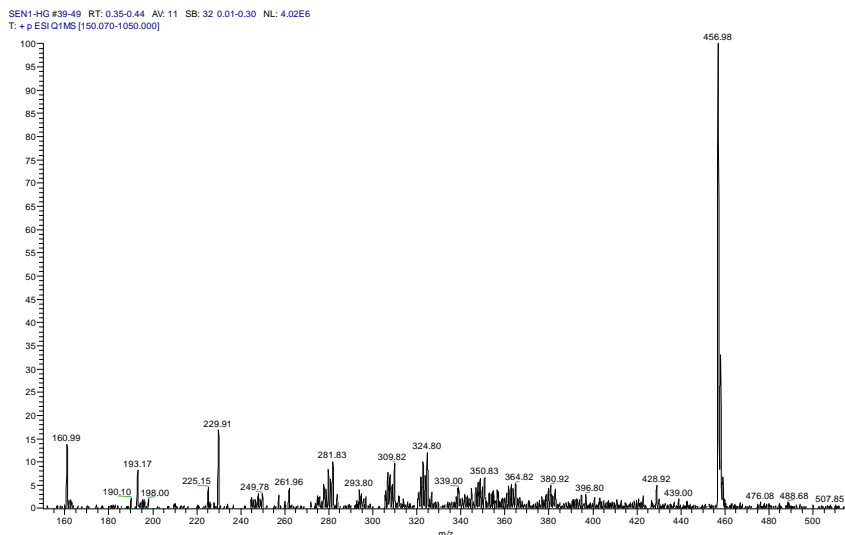
where  $S_d$  is the standard deviation of the blank measurements ( $n=10$ ), and  $S$  is the slope of the calibration curve (Figure 6B). LOD value for **2** toward  $\text{Hg}^{2+}$  ion by colorimetry was calculated as  $7.88 \times 10^{-8}$  M. Colorimetric experiments showed that the analytical performance of the sensor is sufficient for the detection of  $\text{Hg}^{2+}$  ion in water samples.



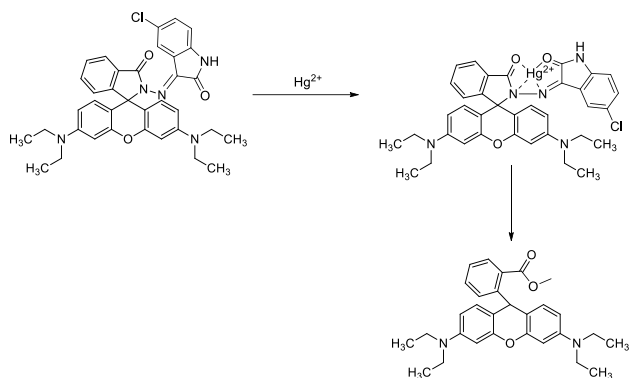
**Figure 6.** UV/vis. experiments of **2** ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) in MeCN/H<sub>2</sub>O (4:1); **A**) absorption spectra of sensor with  $5 \times 10^{-5}$  M metal ions **B**) titration with  $\text{Hg}^{2+}$  **C**) titration curve derived from titration with  $\text{Hg}^{2+}$  at 561 nm **D**) Relative absorbance of **2** ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) with  $\text{Hg}^{2+}$ , followed by 5 equivalent of other metal ions.

The competition experiments in the presence of 5 equivalent of mono-, di-, trivalent metal ions were also conducted and the results are shown in Figure 6C. The competition experiments showed that while  $\text{Cu}^{2+}$  ions cause interference, the detection of mercury ions is not interfered by  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  ions. It is expected that the binding of the  $\text{Hg}^{2+}$  ion could take place through electrostatic interactions between the carbonyl oxygen of isatin and spirocycle, nitrogen atom of

the Schiff base and  $\text{Hg}^{2+}$  ions (Wanichacheva et al., 2012). Sensing features of the sensor toward  $\text{Hg}^{2+}$  were also investigated by ESI mass analysis in methanol. A mass peak corresponding rhodamine B methyl ester was observed at 456.98 m/z (Figure 7). The mass study showed that the sensor/mercury(II) complex is not stable at sensing media, and spirocycle undergoes  $\text{Hg}^{2+}$  mediated hydrolysis that resulted in the formation of rhodamine B methyl ester, as seen in Figure 8.



**Figure 7.** Mass spectra of rhodamine B methyl ester by  $\text{Hg}^{2+}$  mediated hydrolysis of the sensor.



**Figure 8.** The proposed hydrolysis reaction of the sensor.

## CONCLUSIONS

In summary, synthesis, characterization, and metal sensing properties of a new rhodamine B-based sensor have been reported. The metal ion detection ability of the sensor was investigated by colorimetric assays. The spectrophotometric experiments showed that the sensor enables selective and sensitive recognition of Hg<sup>2+</sup> ion over competitive metal ions, such as Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. The sensor showed linear optical response to Hg<sup>2+</sup> ion between 1×10<sup>-5</sup> to 1×10<sup>-4</sup> M. LOD value for the sensor toward Hg<sup>2+</sup> were calculated as and 7.88×10<sup>-8</sup> M. According to mass data, optical signals could be produced by two step mechanism. First, Hg<sup>2+</sup> ion coordinates to sensor through two carbonyl oxygen and nitrogen atom of imine bond and then complex structure undergoes Hg<sup>2+</sup> ion mediated hydrolysis reaction.

## REFERENCES R

- Aires-de-Sousa, J., Hemmer, M.C. & Gasteiger, J. (2002).** Prediction of 1 H NMR chemical shifts using neural networks. *Analytical Chemistry*, **74**(1), 80-90. DOI: [10.1021/ac010737m](https://doi.org/10.1021/ac010737m).
- Aksuner, N., Basaran, B., Henden, E., Yilmaz, I. & Cukurovali, A. (2011).** A sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of mercury(II) based on a novel triazine-thione derivative. *Dyes and Pigments*, **88**(2), 143-148. DOI: [10.1016/j.dyepig.2010.05.014](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.05.014).
- Banfi, D. & Patiny, L. (2008).** www.nmrdb.org: Resurrecting and Processing NMR Spectra Online. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, **62**(4), 280-281. DOI: [10.2533/chimia.2008.280](https://doi.org/10.2533/chimia.2008.280).
- Binev, Y. & Aires-de-Sousa, J. (2004).** Structure-Based predictions of 1 H NMR chemical shifts using

feed-forward neural networks. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**(3), 940–945. DOI: [10.1021/ci034228s](https://doi.org/10.1021/ci034228s).

- Binev, Y., Corvo, M. & Aires-de-Sousa, J. (2004).** The impact of available experimental data on the prediction of 1 H NMR chemical shifts by neural networks. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**(3), 946-949. DOI: [10.1021/ci034229k](https://doi.org/10.1021/ci034229k).
- Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H. & Winter, B. (1991).** Chemical sensors and biosensors-principles and applications. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **30**(5), 516-539. DOI: [10.1002/anie.199105161](https://doi.org/10.1002/anie.199105161).
- Castillo, A.M., Patiny, L. & Wist, J. (2011).** Fast and accurate algorithm for the simulation of NMR spectra of large spin systems. *Journal of Magnetic Resonance*, **209**(2), 123-130. DOI: [10.1016/j.jmr.2010.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jmr.2010.12.008).
- Cope, M.J., Kirkbright, G.F. & Burr, P.M. (1982).** Use of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) for the analysis of doped cadmium mercury telluride employing a graphite rod electrothermal vaporisation device for sample introduction. *The Analyst*, **107**(1275), 611-616. DOI: [10.1039/AN9820700611](https://doi.org/10.1039/AN9820700611).
- Currie, L. A. (1995).** Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detect ion and quantification capabilities (IUPAC Recommendations). *Pure & Applied Chemistry*, **67**(10), 1699-1723. DOI: [10.1016/S0003-2670\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00104-X).
- Du, W., Cheng, Y., Shu, W. & Qi, Z. (2017).** A novel rhodamine-based fluorescence chemosensor containing polyether for mercury (II) ions in aqueous solution. *Química Nova*, **40**(7), 733-738. DOI: [10.21577/0100-4042.20170060](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170060).
- Farruggia, G., Iotti, S., Prodi, L., Montalti, M., Zaccheroni, N., Savage, P. B. & Wolf, F. I. (2006).** 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Fluorescent Sensors for Magnesium in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, **128**(1), 344–350. DOI: [10.1021/ja056523u](https://doi.org/10.1021/ja056523u)
- Jarzyńska, G. & Falandysz, J. (2011).** The determination of mercury in mushrooms by CV-AAS and ICP-AES techniques. *Journal of Environmental Science and Health*, **46**(6), 569–573. DOI: [10.1080/10934529.2011.562816](https://doi.org/10.1080/10934529.2011.562816).
- Jiao, Y., Zhang, L & Zhou, P. (2016).** A rhodamine B-based fluorescent sensor toward highly selective



- mercury (II) ions detection. *Talanta*, **150**, 14-19. DOI: [10.1016/j.talanta.2015.11.065](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.065).
- Li, N., Yu, C., Ji, Y. & Zhang J. (2015)**. Characterization of a Cu<sup>2+</sup>-selective fluorescent probe derived from rhodamine B with 1,2,4-triazole as subunit and its application in cell imaging. *Turkish Journal of Chemistry*, **39**, 660-666. DOI: [10.3906/kim-1410-58](https://doi.org/10.3906/kim-1410-58).
- Prodi, L., Bargossi, C., Montalti, M., Zaccheroni, N., Su, N., Bradshaw, J.S. & Savage, P.B. (2000)**. An effective fluorescent chemosensor for mercury ions. *Journal of the American Chemical Society*, **122**(28), 6769-6770. DOI: [10.1021/ja0006292](https://doi.org/10.1021/ja0006292).
- Tang, R., Lei, K., Chen, K., & Zhao, H. (2011)**. A Rhodamine-Based Off-On fluorescent chemosensor for selectively sensing Cu(II) in aqueous solution. *Journal of Fluorescence*, **21**, 141-148. DOI: [10.1007/s10895-010-0698-x](https://doi.org/10.1007/s10895-010-0698-x).
- Voutsadaki, S., Tsikalas, G.K., Klontzas, E., Froudakis, G.E. & Katerinopoulos, H.E. (2010)**. A “turn-on” coumarin-based fluorescent sensor with high selectivity for mercury ions in aqueous media. *Chemical Communications*, **46**(19), 3292. DOI: [10.1039/b926384e](https://doi.org/10.1039/b926384e).
- Wanichacheva, N., Setthakarn, K., Prapawattanpol, N., Hanmenga, O., Sanghiran, V., Lee, S. & Grudpan, K. (2012)**. Rhodamine B-based “turn-on” fluorescent and colorimetric chemosensors for highly sensitive and selective detection of mercury (II) ions. *Journal of Luminescence*, **132**(1), 35-40. DOI: [10.1016/j.jlumin.2011.07.015](https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.07.015).
- Wei, Y., Cheng, D., Ren, T., Li, Y., Zeng, Z. & Yuan, L. (2016)**. Design of NIR chromenylium-cyanine fluorophore library for “Switch-ON” and ratiometric detection of bio-active species in vivo. *Analytical Chemistry*, **88**(3), 1842-1849. DOI: [10.1021/acs.analchem.5b04169](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04169).
- Xu, L., Xu, Y., Zhu, W., Sun, X., Xu, Z. & Qian, X. (2012)**. Modulating the selectivity by switching sensing media: a bifunctional chemosensor selectivity for Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> in different aqueous solutions. *RSC Advances*, **2**(15), 6323. DOI: [10.1039/c2ra20840g](https://doi.org/10.1039/c2ra20840g).
- Verep, B., Mutlu, T., Yüksek, T. & Gürdal A.A. (2018)**. Sert ve Yumuşak Su Koşullarında Karadeniz Alabalığı (*Salmo coruhensis*) Dokularında Ağır Metal (Civa: Hg) Birikiminin Belirlenmesi. *Journal of Anatolian Environmental&Animal Sciences*, **3**(1), 19-26. DOI: [10.35229/jaes.387681](https://doi.org/10.35229/jaes.387681).
- Yoon, S., Miller, E.W., He, Q., Do, P.H. & Chang, C.J. (2007)**. A bright and specific fluorescent sensor for mercury in water, cells, and tissue. *Angewandte Chemie International Edition*, **46**(35), 6658-6661. DOI: [10.1002/anie.200701785](https://doi.org/10.1002/anie.200701785).
- Yuan, C., Liu, B., Liu, F., Han, M.-Y. & Zhang, Z. (2014)**. Fluorescence “Turn On” detection of mercuric ion based on bis (dithiocarbamate) copper(II) complex functionalized carbon nanodots. *Analytical Chemistry*, **86**(2), 1123-1130. DOI: [10.1021/ac402894z](https://doi.org/10.1021/ac402894z).
- Zhang, Y.-S., Balamurugan, R., Lin, J.-C., Fitriyani, S., Liu, J.-H. & Emelyanenko, A. (2017)**. Pd<sup>2+</sup> fluorescent sensors based on amino and imino derivatives of rhodamine and improvement of water solubility by the formation of inclusion complexes with β-cyclodextrin. *The Analyst*, **142**(9), 1536-1544. DOI: [10.1039/C6AN02594C](https://doi.org/10.1039/C6AN02594C).
- Zhao, Y., Zheng, B., Du, J., Xiao, D. & Yang, L. (2011)**. A fluorescent “turn-on” probe for the dual-channel detection of Hg(II) and Mg(II) and its application of imaging in living cells. *Talanta*, **85**(4), 2194-2201. DOI: [10.1016/j.talanta.2011.07.070](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.070).



## Length-Weight Relationships and Condition Factor of Four Different Sea Cucumber Species in the Aegean Sea

Mehmet AYDIN\*

Fatsa Faculty of Marine Science, Ordu University, Turkey

Geliş/Received: 21.01.2020

Kabul/Accepted: 09.03.2020

How to cite: Aydın, M. (2020). Length-weight relationships and condition factor of four different sea cucumber species in the Aegean Sea. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 80-85.

Atıf yapmak için: Aydın, M. (2020). Ege Denizi'ndeki 4 farklı deniz hıyarı türünün boy-ağırlık ilişkisi ve kondisyon faktörü. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 80-85.

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1163-6461>

**Abstract:** In this study, the gutted length-weight relationships and condition factor of the 4 *Holothuria* species (*Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* and *Holothuria sanctori*) living in the Aegean Sea were determined.

The sea cucumber samples were obtained between November 2014 and December 2018 by SCUBA and Hookah diving systems in the Aegean Sea. Identification of the species were based on morphometric characteristics only. Total gutted length (GL) and weight (GW) of each individual were recorded with an accuracy 0.1 cm and 0.01 g, respectively.

During the sampling period, a total number of 18248 sea cucumber individuals belonging to four species were collected and measured. Mean gutted length and weight were found to be  $13.20 \pm 3.44$  cm and  $66.34 \pm 30.93$  g for *H. tubulosa*,  $10.45 \pm 2.06$  cm and  $49.33 \pm 19.68$  g for *H. polii*,  $13.07 \pm 3.86$  cm and  $68.08 \pm 36.73$  g for *H. mammata*,  $18.62 \pm 3.02$  cm and  $102.34 \pm 21.76$  g for *H. sanctori*, respectively. Negative allometric growth was estimated for all the four species with the "b" values ranging from 1.104 to 1.804.

\*Corresponding author's:

Mehmet AYDIN

Fatsa Faculty of Marine Science, Ordu University, 52400 Turkey

✉: [maydin69@hotmail.com](mailto:maydin69@hotmail.com)

Mobile telephone : +90 (542) 435 62 80

Fax : +90 (452) 423 50 53

**Keywords:** *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata*, *Holothuria sanctori*, length-weight relationship.

## Ege Denizi'ndeki 4 Farklı Deniz Hıyarı Türünün Boy-Ağırlık İlişkisi ve Kondisyon Faktörü

**Öz:** Bu çalışmada Ege Denizi'ndeki 4 farklı *Holothuria* türünün (*Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* ve *Holothuria sanctori*) karkas boy ağırlık ilişkileri ve kondisyon faktörleri tespit edilmiştir. Örneklem Ege Denizi'nde Kasım 2014-Aralık 2018 tarihleri arasında SCUBA veya nargile dalış sistemi ile yapılmıştır. Tür tanımlamaları morfometrik özelliklerine göre yapılmıştır. Total karkas boyu (GL) 0.1 cm ve total ağırlığı (GW) 0.01 g hassasiyetle ölçülmüştür. Dört türe ait toplam 18248 adet birey örneklenmiş ve ölçülmüştür. *H. tubulosa* için ortalama karkas boyu  $13.20 \pm 3.44$  cm ve ortalama karkas ağırlığı  $66.34 \pm 30.93$  g olarak, *H. polii* için  $10.45 \pm 2.06$  cm ve  $49.33 \pm 19.68$  g olarak, *H. mammata* için  $13.07 \pm 3.86$  cm ve  $68.08 \pm 36.73$  g olarak, *H. sanctori* için  $18.62 \pm 3.02$  cm ve  $102.34 \pm 21.76$  g olarak hesaplanmıştır. Büyüme her dört türde de negatif allometrik, b değerleri de 1.104 to 1.804 arasında olduğu tespit edilmiştir.

\*Sorumlu yazar:

Mehmet AYDIN

Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Ordu Üniversitesi, Ordu/Fatsa 52400, Turkey

✉: [maydin69@hotmail.com](mailto:maydin69@hotmail.com)

Cep telefonu : +90 (542) 435 62 80

Faks : +90 (452) 423 50 53

**Anahtar kelimeler:** Boy-ağırlık ilişkisi, *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata*, *Holothuria sanctori*.

## INTRODUCTION

Sea cucumbers are very important component of the marine ecosystems, because they play a crucial role in the

detritus food chain and are implied in the recycling of organic matter by ingestion of sediment (Massin, 1982; Zupo

& Fresi, 1984; Francour, 1990; Belbachir et al., 2019). Approximately 1200 known sea cucumber species exist in the world oceans (Conand, 1990), while 66 of them are commercially exploited (Purcell, 2010). Sea cucumbers are harvested and traded in more than 70 countries worldwide (Purcell et al., 2012). Sea cucumber species (*Holothuria tubulosa* Gmelin 1790, *Holothuria polii* Delle Chiaje 1823, *Holothuria mammata* Grube 1840, *Stichopus regalis* Cuvier, 1817) from Mediterranean Sea are commercial target species of fisheries since 1990s (Aydın, 2008). Recently, Turkey acquired a leading position among Mediterranean countries in the exports of sea cucumbers, the latter being widely distributed across its Aegean coasts. A considerable increase in the Sea cucumber fishery of Turkey has been observed since 1996. The average of past seven years was 419 ton, 2017 production was approximately 855 ton (Aydın, 2017; TURKSTAT, 2018).

Length-weight relationships are used in fisheries management. The main objective of this study was to determine of gutted length-weight relationship and condition factor of four sea cucumbers species: *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata* and *H. sanctori* Delle Chiaje, 1823 in the coastal waters of the Aegean Sea.

## MATERIAL AND METHOD

The Aegean Sea is the only area where the sea cucumber stocks are abundant in Turkey's territorial waters and the only field where harvesting is legal. The region is divided into two sub-regions, harvesting is permitted 4 years in the northern part, 4 years in the southern part (Aydın, 2019a). This study was conducted in this commercially exploited area (Figure 1).

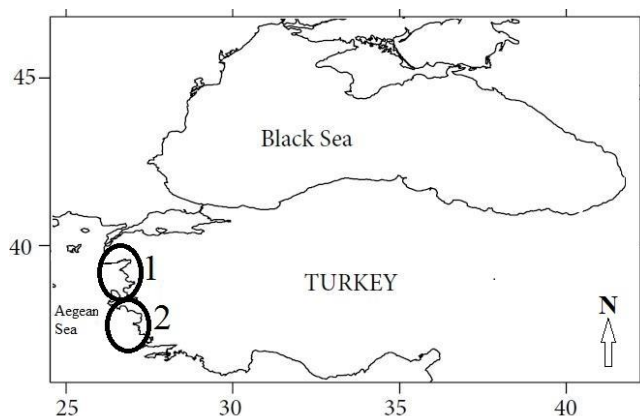


Figure 1. Sampling area.

Individuals of sea cucumber species were sampled between November 2014 and December 2018 by SCUBA and Hookah diving systems in the Aegean Sea (Fig. 1) which is actually a large data set obtained by the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry for the purpose of stock management.

Individuals of sea cucumber species were sampled between November 2014 and December 2018 by SCUBA and Hookah diving systems in the Aegean Sea (Fig. 1) which is actually a large data set obtained by the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry for the purpose of stock management.

Identification of the species was based only on morphometric characteristics (Aydın & Erkan, 2015). Due to its abilities to take water and release it, expel internal organs, extraction or relaxation, the size and weight of the sea cucumber can vary during morphometric measurements (Aydın et al., 2011; Gonzalez-Wangüemert et al., 2014; Aydın, 2019a; Aydın, 2019b). In addition, being alive or dead also causes changes in length. Therefore, the sea cucumber must be kept alive in the seawater until the internal organs are removed. During measurements a small longitudinal incision (3 cm) was done on the abdominal area, the internal organs were removed, and weight (GW) was measured. After the internal organs are emptied, the individual is suspended in seawater for 30-60 seconds and the length becomes more stable. Because of this characteristic, GW and length (GL) measurements were carried out within one minute after the internal organs were removed. Total gutted (removal of alimentary canal, gonads, and respiratory trees) GL and GW of each individual were recorded with an accuracy of 0.01 cm and 0.01 g, respectively. The GL-GW relationships were determined for all collected individuals by  $GW = aGL^b$  equation, where GW is weight (g), GL is length (cm) and "a" and "b" are the Coefficients of the function obtained from regression between GW and GL (Ricker, 1975). The "b" value was tested by t-test to check whether it was significantly different from 3. When  $b = 3$ , it reflects an isometric growth, when it is  $b \neq 3$  it reflects an allometric growth (positive  $b > 3$  or negative  $b < 3$ ) (Froese, 2006).

Fulton's coefficient of condition factor (K) was calculated by  $K = 100 * GW / GL^3$  equation, where GL is length (cm) and GW is weight (g) (Le Cren, 1951; Bagenal, 1978; Sparre & Venema, 1992; Froese, 2006).

The relationships among the variables were identified using the regression analysis. The best appropriate model was selected based on  $R^2$  value. The observed differences were evaluated statistically using SPSS 22.0 and Student's t-test (Sokal & Rohlf, 1969; Düzgüneş et al., 1983).

## RESULTS

During the sampling period, a total of 18248 individuals of sea cucumber belonging to four species were collected and measured. While number of individuals was maximum in *H. polii* (9086), minimum number of individuals (747) was obtained in *H. sanctori*. *H. sanctori* is

also found to be the species showing the highest gutted length and weight. Morphometric description of the data-set used in the length-weight relationship is summarized in Table 1.

**Table 1.** Summary of the gutted length (GL)–gutted weight (GW) data from each species.

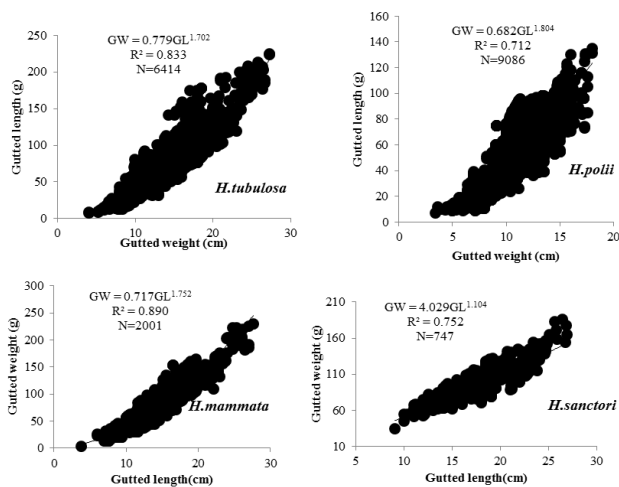
Species	N	GL (cm)		GW (g)	
		Mean±SE	Min-Max	Mean±SE	Min-Max
<i>H. tubulosa</i>	6414	13.20±3.44	4-27.3	66.34±30.93	7.4-225.0
<i>H. polii</i>	9086	10.45±2.06	3.4-18.0	49.33±19.68	6.9-135.0
<i>H. mammata</i>	2001	13.07±3.86	3.8-27.6	68.08±36.73	3.5-230.0
<i>H. sanctori</i>	747	18.62±3.02	9.0-26.9	102.34±21.76	33-185.9
<b>Total</b>	<b>18248</b>				

R-squared coefficients of power regression, which is used for modeling in this study, were found ranged between 0.752 and 0.890 for the length-weight relationships. These models were estimated as  $GW = 0.779 GL^{1.702}$  ( $R^2 = 0.833$ ) for *H. tubulosa*,  $GW = 0.682GL^{1.804}$  ( $R^2 = 0.712$ ) for *H. polii*,  $GW = 0.717 GL^{1.752}$  ( $R^2 = 0.890$ ) for *H. mammata* and  $GW = 4.029 GL^{1.104}$  ( $R^2 = 0.752$ ) for *H. sanctori*. Negative allometric growth was observed for all the four species (Table 2). The weight-length relationship graphics of *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata* and *H. sanctori* are given in Figure 2.

**Table 2.** Regression parameters of the GL-GW relationship ( $GW=aGL^b$ ) of the 4 sea cucumbers.

Species	N	$GW=aGL^b$				$R^2$	Significant Level Pauly's t-test
		a	b	SE(b)	CI(b)		
<i>H. tubulosa</i>	6414	0.779	1.702	0.009	1.68-1.72	0.833	t = 136.3 (P<0.05)
<i>H. polii</i>	9086	0.682	1.804	0.012	1.78-1.82	0.712	t = 100.2 (P<0.05)
<i>H. mammata</i>	2001	0.717	1.752	0.012	1.74-1.78	0.890	t = 90.8 (P<0.05)
<i>H. sanctori</i>	747	4.029	1.104	0.023	1.05-1.15	0.752	t = 81.5 (P<0.05)

N: number, a and b: intercept and slope of the regression line SE: standard error, R<sup>2</sup>: coefficient of determination, CI: 95% confidence interval.



**Figure 2.** GL–GW relationship for *H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata* and *H. sanctori*.

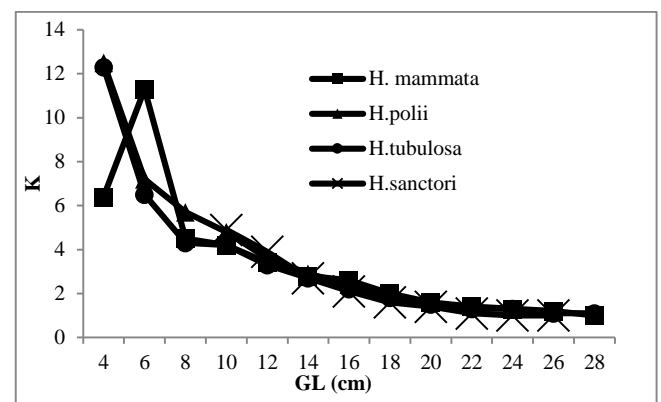
In the study, the K values of the species were also investigated, and the highest K value was observed for *H.*

*polii* (4.45), and the lowest for *H. sanctori* (1.73). The average, minimum, and maximum K values for each of the four species are given in Table 3.

**Table 3.** Fulton’s coefficient of condition factor (K) for the four sea cucumber species in the Aegean Sea.

Species	N	$K=100GW/GL^3$		
		Mean (K)	± SE	Minimum Maximum
<i>H. tubulosa</i>	6414	3.07	1.18	1.0 13.0
<i>H. polii</i>	9086	4.45	1.53	1.4 17.6
<i>H. mammata</i>	2001	3.25	1.09	0.9 12.0
<i>H. sanctori</i>	747	1.73	0.71	0.8 5.5

When the K values were evaluated in relation to GL, there were abnormal fluctuations in the graph because the number of individuals in the 4-8 cm length group was low. It is possible to say that K values of all four species individuals larger than 8 cm are similar (Figure 3).



**Figure 3.** Relationships between condition factor (K) and GL (cm) for four species.

## DISCUSSION

The weight–length relationships and Fulton’s condition factor are two main parameters used in fisheries management (Froese, 2006). The studies in the Aegean Sea related to the weight-length relationships are summarized in Table 4. The "b" values of the previous studies reported negative allometric growth (except for González-Wangüemert et al., 2016) for the species. Similarly, Veronika et al., (2018) stated that negative allometric growth for 4 different species in the coasts of Sri Lanka. Negative allometry was also reported from a study by Venkataraman (2007) from India. It is known that, when "b" value is smaller than 3 it means that the species show negative allometry and it’s a lean, long and flat bodied (Pauly, 1983). When morphometric structure of the species is considered, it is normal to estimate the "b" value less than 3. Though there were many different methodologies used to measure L and W in Table 4, the average weight of *H. tubulosa* from this study was 66.51 g, Dereli et al., (2016) reported as 49.9 g, González-Wangüemert et al., (2014) reported as 88.7 g, González-Wangüemert et al., (2016) reported as 83.8 g, Kazanidis et al., (2010) reported as 108.4 g, Vafeiadou et al.,

(2010) reported as 61.8 g, Aydın & Erkan (2015) reported as 83.7 g, and Aydın & Emre (2009) reported as 78.62 g.

The average weight of *H. polii* was higher in every previous study (except Aydın & Emre, 2009). The study conducted by Aydın & Emre (2009) did not calculate average GW, but wet weight. The average GW of *H. mammata* was 68.08 g in the study. In other studies, it was reported as 88.5 g (González-Wangüemert et al., 2016), 109.0 g (González-Wangüemert et al., 2014), 23.0 g (Navarro et al., 2013), 109.8 g (Aydın & Erkan, 2015), 105.9 g (Aydın & Emre, 2009). It can be said that the differences are the result of regional differences or using different measurements.

The average weight of *H. sanctori* in this study was higher than previously reported weights (Table 4). It was observed that *H. sanctori* was the heaviest among the four commercial sea cucumbers. Even though the meat ratio of this species is higher more compared to other species, it is not commercially used in Turkey. The reason for this is that the species have cuvier organs, that, when threatened releases a web of tubulars with very adhesive secretion to the environment. This defensive mechanism of web of secretion

is powerful enough to neutralize a fish or a crab, therefore, the area becomes very sticky and makes it impossible for harvest or storage (Aydın, 2013).

K is used to compare the wellbeing of an organism and the health of the environment (Pauly, 1983). The average K values of four species (*H. tubulosa*, *H. polii*, *H. mammata* and *H. sanctori*) were estimated between 1.73 – 4.45. The study on four different species (*H. spinifera*, *B. marmorata*, *S. naso* and *H. atra*) by Veronika et al., (2018) reported similar values, between 2.688- 4.125. These values indicate that the species are in good physical condition.

Turkey is the most commercial sea cucumber producing country in the Mediterranean Basin (Aydın 2019a). Average sea cucumber production for the last seven years was 419-ton/yr and the total production of 2017 was approximately 855 tons (Aydın, 2017; TURKSTAT, 2018). Sea cucumber harvest has an increasing trend in the world, and due to high fishing pressure, natural stocks are faced with the threat of rapid collapse. It is reported that there is no decline in the commercial sea cucumber stocks in Turkish waters (Aydın, 2019a). The length and weight values obtained in this study supports this concept.

**Table 4.** Comparison of WLRs parameters, minimum and maximum length weight from different geographical areas.

Species	N	Mean GL (cm) Min-Max	Mean GW (g) Min-Max	a	b	R <sup>2</sup>	Locations	References
<i>H. tubulosa</i> (GL-GW)	6414	13.26(4-27.3)	66.51(7.4-225)	0.779	1.702	0.833	Aegean Sea	<b>This Study</b>
<i>H. polii</i> (GL-GW)	9086	10.45(3.4-18.0)	49.33(6.9-135.0)	0.682	1.804	0.712	Aegean Sea	<b>This Study</b>
<i>H. mammata</i> (GL-GW)	2001	13.07(3.8-27)	68.08(3.5-230)	0.717	1.752	0.890	Aegean Sea	<b>This Study</b>
<i>H. sanctori</i> (GL-GW)	747	18.62(9-26.9)	102.34(33-185.9)	4.029	1.104	0.752	Aegean Sea	<b>This Study</b>
<i>H. polii</i> (L-EW)	312	16.7(10.4-25.4)	47.3(19.8-79.1)	17.4	1.77	0.14	NE Atlantic, Med.	González-Wangüemert et al., (2016)
<i>H. tubulosa</i> (L-EW)	282	20.7(12.2-30.9)	83.8(25.0-159.5)	-3.8	4.3	0.38	NE Atlantic, Med.	González-Wangüemert et al., (2016)
<i>H. mammata</i> (L-EW)	298	21.2(12.4-33.5)	88.5(38.0-160.8)	-31.0	5.62	0.41	NE Atlantic, Med.	González-Wangüemert et al., (2016)
<i>H. polii</i> (EL-EW)	839	10.5(6.5-18.2)	37.5(17-84)	3.10	1.05	0.45	Aegean Sea	González-Wangüemert et al., (2014)
<i>H. tubulosa</i> (EL-EW)	754	16.4(8-26)	88.7(30-211)	3.45	1.14	0.41	Aegean Sea	González-Wangüemert et al., (2014)
<i>H. mammata</i> (EL-EW)	422	17(10-28)	109.0(30-210)	6.2	1.00	0.52	Aegean Sea	González-Wangüemert et al., (2014)
<i>H. mammata</i>	280		23.4				Gran Canaria Island	Navarro et al. (2013)
<i>H. sanctori</i>	2032		18.1				Gran Canaria Island	Navarro et al. (2013)
<i>H. tubulosa</i> (L-EW)	314	29.8(13.8-49.4)	108.4(39.4-226.3)	6.71	0.81	0.58	Aegean Sea	Kazamidis et al. (2010)
<i>H. tubulosa</i>	350	10.26(4.3-19.7)	61.8(20.3-164.4)				Aegean Sea	Vafeiadou et al. (2010)
<i>H. sanctori</i> (EL-EW)	340	18.1(11-25)	100.5(51-175.7)	2.320	1.29	0.72	Aegean Sea	Aydın (2013)
<i>H. polii</i> (Wet W)	1558		46.3				Aegean Sea	Aydın and Erkan (2015)
<i>H. tubulosa</i> (Wet W)	1288		83.7				Aegean Sea	Aydın and Erkan (2015)
<i>H. mammata</i> (Wet W)	498		109.8				Aegean Sea	Aydın and Erkan (2015)
<i>H. polii</i> (Wet W)	618		59.25(9.2-264)				Aegean Sea	Aydın and Emre (2009)
<i>H. tubulosa</i> (Wet W)	434		78.62(3-246.2)				Aegean Sea	Aydın and Emre (2009)
<i>H. mammata</i> (Wet W)	28		105.9(25.1-167.2)				Aegean Sea	Aydın and Emre (2009)

GL: Guttled length, GW: Guttled weight, L: Length, EL: Eviscerated length, EW: Eviscerated weight.

## CONCLUSIONS

In conclusion, base data required for maximum usage of sea cucumber stocks in a sustainable perspective, such as length-weight relationship and condition factor were obtained during this study. The data obtained in this study are very important for the stock management of these species, which are exploited and are important part of the marine ecosystem. Therefore, this data is made available to

the relevant institutions for the management of stocks in the region.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Ordu University Scientific Research Coordination Unit with the project No. AR-1501



## REFERENCES

- Aydın, M. (2008).** The Commercial sea cucumbers fishery in Turkey. *SPC Beche de mer Information Bulletin*, 28, 40-43.
- Aydın, M. & Emre, Y. (2009).** *Determination of the sea cucumber stock between Ayvalık and Çeşme*. Project final report. Ministry of Agriculture and Rural Affairs TAGEM. TAGEM/HAYSÜD/2007/09/01/01. 50p.
- Aydın, M. (2013).** Some biological characteristics of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* Delle Chiaje, 1823 (Echinodermata: Holothuroidea). *Biological Diversity and Conservation*, 6(3), 153-159.
- Aydın, M. (2017).** Present status of the sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Beche de Mer Information Bulletin*, 37, 30-34.
- Aydın, M. (2019a).** Biometry, density and the biomass of the commercial sea cucumber population of the Aegean Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(6), 463-474. DOI: [10.4194/1303-2712-v19\\_6\\_02](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_6_02).
- Aydın, M. (2019b).** Density and biomass of commercial sea cucumber species relative to depth in the Northern Aegean Sea. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 35(2), 541-550. DOI: [10.1007/s41208-019-00144-4](https://doi.org/10.1007/s41208-019-00144-4).
- Aydın, M. & Erkan, S. (2015).** Identification and some biological characteristics of commercial sea cucumber in the Turkey coast waters. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 3(1), 260-265.
- Aydın, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y. & Köse, S. (2011).** Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science & Technology* 46(3), 500-508. DOI: [10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x).
- Bagenal, T.B. (1978).** *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters*. 3rd ed., Handbook No:3, Blackwell Scientific Publication, Oxford, 365 p.
- Belbachir, N.E., Lepoint, G. & Mezali, K. (2019).** Comparison of isotopic niches of four sea cucumbers species (Holothuroidea: Echinodermata) inhabiting two seagrass meadows in the southwestern Mediterranean Sea (Mostaganem, Algeria). *Belgian Journal of Zoology*, 149(1), 95-106. DOI: [10.26496/bjz.2019.32](https://doi.org/10.26496/bjz.2019.32).
- Conand, C. (1990).** *The fishery resources of Pacific island countries. Part 2: Holothurians*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 272. Rome. 143 p.
- Dereli, H., Culha, S.T., Culha, M., Özalp, B.H. & Tekinay, A.A. (2016).** Reproduction and population structure of the sea cucumber *Holothuria tubulosa* in the Dardanelles Strait, Turkey. *Mediterranean Marine Science*, 17(1), 47-55. DOI: [10.12681/mms.1360](https://doi.org/10.12681/mms.1360).
- Düzgüneş, O., Kesici, T. & Gürbüz, F. (1983).** *Statistic Methods I*, Ankara University, Faculty of Agriculture press, Ankara, 295p.
- Francour, P. (1990).** Dynamique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* dans le parc national de Port Cros. Analyse des compartiments matie, litière, faune vagile, échinodermes et poissons. Thèse de Doctorat, Univ. P. et M. Curie, Paris. 1-373.
- Froese, R. (2006).** Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 241-253. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x).
- González-Wangüemert, M., Aydın, M. & Chantal, C. (2014).** Assessment of sea cucumber populations from Aegean Sea (Turkey): First insights to sustainable management of new fisheries. *Ocean & Coastal Management*, 92, 87-94. DOI: [10.1016/j.ocecoaman.2014.02.014](https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.02.014).
- González-Wangüemert, M., Valente, S., Henriques, F., Domínguez-Godino, J.A. & Serrãoa, E.A. (2016).** Setting preliminary biometric baselines for new target sea cucumbers species of the NE Atlantic and Mediterranean fisheries. *Fisheries Research*, 179, 57-66. DOI: [10.1016/j.fishres.2016.02.008](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.02.008).
- Kazanidis, G., Antoniadou, C., Lolas, A.P., Neofitou, N., Vafidis, D., et al. (2010).** Population dynamics and reproduction of *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea: Echinodermata) in the Aegean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(05), 895-901. DOI: [10.1017/S0025315410000251](https://doi.org/10.1017/S0025315410000251).
- Le Cren, E.D. (1951).** The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20, 201-219.
- Massin, C. (1982).** Food and feeding mechanisms, Holothuroidea. In: Jangoux, M. et al. (Ed.) *Echinoderm nutrition*. Rotterdam, The: pp. 43-55.
- Navarro, P.G., García-Sanz, S., & Tuya, F. (2013).** Patrones de abundancia y talla de *Holothuria sanctori*, *Holothuria mammata* y *Holothuria arguinensis* (Echinodermata: Holoturoidea) en la

- isla de Gran Canaria, Atlántico oriental. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **48**(2), 273-284. DOI: [10.4067/S0718-19572013000200007](https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000200007).
- Pauly, D. (1983).** *Some simple methods for the assessment of tropical fish stocks*. FAO Fish. Tech. Pap. (234), 52p.
- Purcell, S.W. (2010).** *Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach*. Edited/compiled by Lovatelli, A., Vasconcellos, M., Yimin, Y., FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No:520. Rome, FAO.157p.
- Purcell, S.W., Samyn, Y. & Conand, C. (2012).** *Commercially Important Sea Cucumbers of the World*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No: 6. FAO, Rome,150p.
- Ricker, W.E. (1975).** Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*, **191**, 1-382.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1969).** *Introduction to Biostatistics*, Second Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Sparre, P. & Venema, S.C. (1992).** *Introduction to Tropical Fish Stock Assessment*, Part I, FAO Fisheries Technical Paper 306/1, Rome, 376p.
- TURKSTAT. (2018).** “Sea cucumber trade”. Turkish Statistical Institute. Ankara. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr).
- Vafeiadou, A.M., Antoniadou, C., Vafidis, D., Fryganiotis, K. & Chintiroglou, C. (2010).** Density and biometry of the exploited holothurian *Holothuria tubulosa* at the dodecanese, South Aegean sea. *Rapport Commission internationale Mer Méditerranée*, **39**, 661.
- Venkataraman, C. (2007).** Present status of population of holothurians in India. FAO-BOBLME. pp. 58.
- Veronika, K., Edrisinghe, U., Sivashanthini, K. & Athauda, A.R.S.B. (2018).** Length-weight relationships of four different sea cucumber species in North-East coastal region of Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, **29**(2), 212-217. DOI: <https://doi.org/10.4038/tar.v29i2.8290>.
- Zupo, V. & Fresi, E. (1984).** *A study on the food web of Posidonia oceanica ecosystem*. Analysis of the gut contents of Echinoderms. In: Boudouresque, C.F., Jeudy de Grissac, A., Olivier, J. (eds), *First International workshop on Posidonia oceanica Beds*, Gis Posidonie publ., Fr. **1**, 373-379.



## Anadolu Mandası Dışkılarında İzole Edilen Termofilik *Campylobacter* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu

Timur GÜLHAN \* Merve Gizem SEZENER Serhan AKGÖZ  
Volkan Enes ERGÜDEN Arzu FINDIK Alper ÇİFTÇİ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş/Received: 12.02.2000

Kabul/Accepted: 11.03.2020

Atıf yapmak için: Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E., Arzu Fındık, A. & Çiftçi, A. (2020). Anadolu mandası dışkılarında izole edilen termofilik *Campylobacter* türlerinin moleküler karakterizasyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 86-92.

How to cite: Gülhan, T., Sezener, M.G., Akgöz, S., Ergüden, V.E., Arzu Fındık, A. & Çiftçi, A. (2020). Molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* species isolated from Anatolian buffalo feces. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 86-92.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0003-4798-1427>  
ID: <https://orcid.org/0000-0003-0487-7515>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-5130-7120>  
ID: <https://orcid.org/0000-0003-2215-2868>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-9123-6160>  
ID: <https://orcid.org/0000-0001-8370-8677>

**\*Sorumlu yazarın:**

Prof. Dr. Timur GÜLHAN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
55220 Atakum, Samsun, Türkiye  
✉: [timur.gulhan@omu.edu.tr](mailto:timur.gulhan@omu.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (544) 4463329  
Telefon : +90 (362) 312 19 19-1449  
Faks : +90 (362) 457 69 22

**Öz:** Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur. Bu çalışmada Amasya ili ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılmakta olan Anadolu Mandalarından toplanan 140 dışkı örneği termofilik *Campylobacter* türleri açısından incelendi. Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu amacıyla standart selektif zenginleştirme tekniği kullanıldı. *Campylobacter* şüpheli izolatların cins ve tür düzeyinde identifikasyonları PCR ile yapıldı. 140 dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* cins düzeyinde identifiye edildi. İdentifiye edilen 13 izolatın 2 (% 15,4)'si *C. jejuni*, 1 (% 7,7)'i *C. coli* olarak isimlendirilirken, geriye kalan 10 izolat *Campylobacter* spp. olarak tanımlandı. *C. jejuni* izolatlarında ctx (cytolethal distending toxin) genlerinin (*cdtA*, *cdtB* ve *cdtC*) tespiti mPCR ile gerçekleştirildi. İzolatların hiç birinde *cdt* geni saptanamadı. Bu araştırma ile bölgemizde ilk kez Anadolu Mandalarından sağlanan dışkı örnekleri termofilik *Campylobacter* türleri yönünden incelendi. Araştırmadan elde edilen verilerin, yöremizde yapılacak benzer çalışmalara kaynak teşkil edebileceği kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Anadolu mandası, dışkı, PCR, termofilik *Campylobacter*.

## Molecular Characterization of Thermophilic *Campylobacter* Species Isolated From Anatolian Buffalo Feces

**\*Corresponding author's:**

Prof. Dr. Timur GÜLHAN  
Ondokuz Mayıs University,  
Faculty of veterinary medicine,  
Department of Microbiology,  
55 220 Atakum, Samsun, Turkey  
✉: [timur.gulhan@omu.edu.tr](mailto:timur.gulhan@omu.edu.tr)  
Mobile telephone : +90 (544) 446 33 29  
Telephone : +90 (362) 312 19 19-1449  
Fax : +90 (362) 457 69 22

**Abstract:** Buffaloes as in other animals have been demonstrated to play a role in certain diseases transmitted to susceptible animals and human populations. In this study, 140 fecal samples collected from Anatolian Buffaloes in breeding Amasya and around were examined for thermophilic *Campylobacter* species. Standard selective enrichment methods were used for isolation of thermophilic *Campylobacter* species from fecal samples. Identification of *Campylobacter* suspected isolates at the genus and species levels was performed by PCR. Of the 140 stool samples, 13 (9.3 %) thermophilic *Campylobacter* were identified at the genus level. While 2 (15.4%) of the 13 isolated isolates were named *C. jejuni* and 1 (7.7 %) as *C. coli*, the remaining 10 isolates were defined as *Campylobacter* spp. Detection of ctx (cytolethal distending toxin) genes (*cdtA*, *cdtB* and *cdtC*) in *C. jejuni* isolate was performed by mPCR. The ctx genes were not detected in any of the isolates. Fecal samples obtained from Anatolian Buffaloes were examined first time in our region respect to thermophilic *Campylobacter* species. We concluded that the data obtained of research can constitute a resource to similar studies in our region.

**Keywords:** Anatolian buffaloes, feces, PCR, thermophilic *Campylobacter*.

## GİRİŞ

Manda (*Bubalus bubalis*), dünya çapında büyük bir çoğunluğu Asya kıtasında bulunan (%97,4), başlıca süt, et, deri ve iş gücünden yararlanmak amacıyla yetiştirilen, *Artiodactyla* takımında, *Bovidae* ailesinde *Bubalus* sınıfında bir türdür. Mandalar, Afrika yabani mandası (*Syncerus caffer*) ve Asya mandası (*Bubalus bubalis*) olarak gruplandırılmaktadırlar. Evcil ve yabani formlardan köken alan mandaların yaklaşık 74 ırkı bulunmaktadır. Bu ırklar kabaca, bataklık ve nehir (ırmak) mandaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Türkiye'deki mandalar, nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve Anadolu mandası olarak isimlendirilmektedir. Dünya çapında son verilere göre yaklaşık 194 milyon manda bulunmaktadır. Ülkemizde Eylül 2019 verilerine göre 180,826 manda yetiştirildiği, Amasya ilinde ise yaklaşık 5,974 manda bulunduğu bildirilmektedir (TÜİK, 2019).

*Campylobacter* cinsinde sınıflandırılan bakteriler, zoonoz bakteriyel etkenler arasında en yaygın grubu oluşturmaktadır. Güncel olarak 25 türde sınıflandırılan *Campylobacter*ler içerisinde, termofilik olanlar *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsalensis* insanlarda, özellikle gastrointestinal olmak üzere, çeşitli hastalıklardan izole edilmektedir. Termofilik *Campylobacter* türlerinin insanlara bulaştırılmasında kümes hayvanları, çiğ süt, içme suyu, çiftlik hayvanları ve yabani kanatlı hayvanlar önemli rol oynamaktadır (Crawshaw, 2019; Jansen vd., 2019; Willis vd., 2017).

Termofilik *Campylobacter* türleri, hayvanlarda çok geniş bir yelpazede (gastroenteritis-abortus) enfeksiyonlardan izole edilmektedir. Gastrointestinal sistemde (barsak ve safra kesesi) kommensal olarak bulunmakla birlikte özellikle koyunlarda enzootik, diğer ruminantlarda ise sporadik abortuslara neden oldukları ortaya konulmuştur (Sahin vd., 2008). *Campylobacter* kökenli abortus vakalarının çoğunda herhangi bir klinik belirti olmaksızın yavru atımları şekillenmektedir. Hijyenik şartların iyi olmadığı bölgelerde manda etlerinde yüksek oranda *Campylobacter* kontaminasyonları bildirilmektedir (Rahimi vd., 2013). Bu nedenle taşıyıcı ve saçıcı konumundaki hayvanlarda etkenin varlığı ve sıklığının ortaya konulması önem arz etmektedir.

Ülkemizde farklı hayvan türlerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ancak, Anadolu Mandaları ile ilgili araştırmalar son derece sınırlıdır. Bu çalışma, Amasya ili ve ilçelerinde halk elinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılmakta olan Anadolu Mandalarına ait dışkı örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

## MATERYAL VE METOT

**Dışkı Örnekleri:** Çalışmanın materyalini Amasya ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarından sağlanan 140 adet dışkı örneği oluşturdu (Şekil 1). Bu amaçla, içerisinde modifiye Cary-Blair besi yeri bulunan steril dışkı toplama kaplarına alınan dışkı örnekleri kısa sürede ve soğuk zincirde, OMÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırıldı. Örnekleme yapacağı hayvan popülasyonlarına göre mandalardaki oranın bilinmesi (Thrusfield, 2018) için toplam hayvan sayısı (5974) baz alınarak % 95 güven aralığında % 2,34 tahmini prevalans bazında 140 dışkı örneği toplandı (Tablo 1).



**Şekil 1.** Anadolu Mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler.

**Figure 1.** Origins of collected Anatolian Buffaloes stool samples.

**Tablo 1.** Anadolu Mandası dışkı örneklerinin toplandığı merkezler ve dışkı sayıları.

**Table 1.** Origins of collected Anatolian Buffaloes stool samples and stool numbers.

Merkez	Manda sayısı	Alınan dışkı sayısı
Suluova	2059	20
Taşova	1124	20
Amasya merkez	1008	20
Göynücek	753	20
Gümüşhacıköy	517	20
Merzifon	323	20
Hamamözü	190	20
<b>Toplam</b>	<b>5974</b>	<b>140</b>

**Besiyerleri ve Suplementler:** Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu amacıyla modifiye Cary-Blair besi yeri, modifiye preston broth (Oxoid), modified charcoal cefoperazone desoxycholate agar (mCCD agar, Oxoid), blood agar base, brain heart infüzyon broth besiyerleri kullanıldı. Selektif besi yeri elde etmek için ise modifiye preston supplementi (X114, Acumedia), sefoperazon+amfotersin suplamenti (X112, Acumedia) supplementlerinden, mikroaerobik ortam elde etmek için ise campygen (Thermo) kitinden yararlanıldı.

**İzolasyon ve İdentifikasyon:** Dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu ISO 10272 standartlarına göre yapıldı. Bu amaçla dışkı örnekleri preston sıvı besi yerine ekildi ve mikroaerobik olarak 42°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinden bir öze dolusu alınarak mCCD agara ekildi ve 42°C'de 5 gün süreyle mikroaerobik şartlarda inkübe edildi. Mikroskopik ve makroskopik olarak *Campylobacter* morfolojisine sahip bakteri kolonileri %7'lik koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. *Campylobacter* şüpheli izolatlar moleküler olarak PCR ile cins ve tür tayini yapıncaya kadar 200 µl'lik TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH:8.0) bufferde -20 °C'de ve % 15 gliserol içeren BHI'de -70 °C'de saklandı (Wisessombat vd., 2009).

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):** Anadolu Mandalarından toplanan dışkı örneklerinden izole edilen termofilik *Campylobacter* şüpheli izolatların tür düzeyinde

(*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni* ve *C. upsaliensis*) identifikasyonunda koloni mPCR tekniği kullanıldı (Wang vd., 2002).

İzolatlardan DNA ekstraksiyonunda kaynatma prosedüründen yararlanıldı. Saf olarak üretilen kültürlerden bir öze dolusu alınarak 0.5 ml'lik steril distile su ile süspanse edildi. Süspanسیونlar 100 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra 4 °C'de, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar PCR'da templeyt DNA olarak kullanıldı.

İzolatların termofilik *Campylobacter* türleri açısından identifikasyonu ve ayırımında Wang vd., (2002) tarafından bildirilen primer ve PCR şartları kullanıldı. Kullanılan metot *C. fetus* primerleri çıkartılarak modifiye edildi. Böylece *hipO* geni (*C. jejuni*), *glyA* geni (*C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis*) ve 23S rRNA internal kontrolden oluşan 5 farklı primer çifti ile identifikasyon gerçekleştirildi (Tablo 2).

**Tablo 2.** Termofilik *Campylobacter* türlerinin mPCR ile ayırımında kullanılan primer çiftleri ve baz büyüklükleri.

**Table 2.** Primer pairs and base sizes used for separation of Thermophilic *Campylobacter* species by mPCR.

Primer	Boyut (bp)	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Gen lokasyonu
CJF	323	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	<i>C. jejuni hipO</i>	1662-1681
CJR		GCCACAACAAGTAAAGAAGC		1984-1965
CCF	126	GTAACAACCAAGCTTATCGTG	<i>C. coli glyA</i>	337-357
CCR		TCCAGCAATGTGTGCAATG		462-444
CLF	251	TAGAGAGATAGCAAAAGAGA	<i>C. lari glyA</i>	318-337
CLR		TACACATAATAATCCACCC		568-549
CUF	204	AATTGAAACTCTTGCTATCC	<i>C. upsaliensis glyA</i>	63-82
CUR		TCATACATTTTACCCGAGCT		266-247
23SF	650	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	<i>C. jejuni 23S rRNA</i>	3807-3829
23SR		ATCAATTAACCTTCGAGCACCCG		4456-4435

Her mPCR tüpünde 200 µM deoksinüklosid trifosfat (dNTP), 2.5 µl 10x reaksiyon bufferi (500 mM Tris-HCl [pH 8.3], 100 mM KCl, ve 50 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM *C. jejuni* ve *C. lari* primerleri, 1 µM *C. coli* primeri, 2 µM *C. upsaliensis* primeri; 0.2 µM 23S rRNA primeri; 1.25 U FastStart Taq DNA polymerase ve 5 µl templeyt DNA olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. PCR tüplerindeki son hacim 25 µl olacak şekilde steril distile su ile ayarlandı. DNA amplifikasyonu 95°C'de 6 dakika ilk denaturasyon, 95°C'de 30 saniye denaturasyon, 59°C'de 30 saniye bağlanma (annealing), 72 °C'de 30 saniye uzama (extension) 30 siklus ve 72°C'de 7 dak. son uzama (extension) şartlarında Termal Cyclus (Thermo) cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen amplikonlar, % 0.5 etidyum bromür içeren %1.5'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Digi-Doc-IT-Darkroom) incelendi.

*C. jejuni* izolatlarında *cdt* (cytolethal distending toxin) genlerinin mPCR ile belirlenmesinde Pickett vd., (1996) ve Martinez vd., (2006) tarafından bildirilen yöntem uygulandı. mPCR'da *C. jejuni* için kullanılan *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* primer dizilimleri Tablo 3'de gösterildi.

**Tablo 3.** mPCR'da *cdt* genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri ve baz büyüklükleri.

**Table 3.** Primer pairs and base sizes used in determining the *cdt* genes in mPCR.

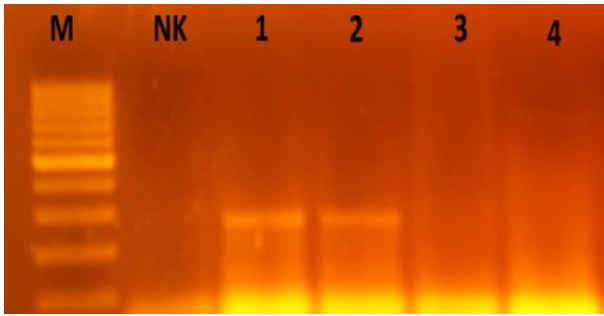
Primer	Sekans (5'-3')	Boyut (bp)	Hedef gen
DTA-F	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C	22	<i>dtA</i>
DTA-R	AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C		
DTB-F	AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C	31	<i>dtB</i>
DTB-R	GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C		
DTC-F	ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G	39	<i>cdtC</i>
DTC-R	CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C		

Toplam hacim 25 µl olacak şekilde 1XPCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM primer, 200 µM deoksinükleosid, 2U taq polimeraz ve 80 ng genomik DNA mPCR karışımı hazırlandı. Amplifikasyon reaksiyonu Bio Rad thermocycler kullanılarak 94°C'de 5 dakika ilk denaturasyon (1 siklus), 94°C'de 1 dakika denaturasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dakika uzama (extension) (30 siklus) ve 72°C'de 5 dak. son uzama (extension, 1 siklus) program dahilinde yapıldı. Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl alınıp, etidiyum bromide ile boyanmış %2 agaroz jele aktarıldı, 100V'da 2 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Digi-Doc-IT-Darkroom) incelendi.



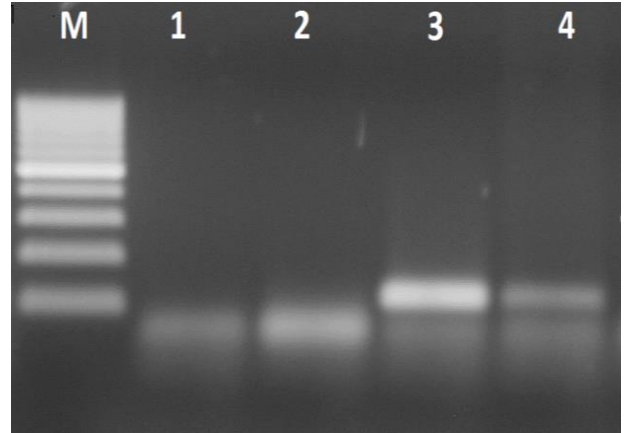
## BULGULAR

Manda dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin selektif izolasyonu sonucu, mCDD besi yerinde gri-saydam renkli şekillenen S formundaki kolonilerden yapılan Gram boyamada tipik olarak Gram negatif S şeklinde kıvrımlı morfolojiye sahip olanlar *Campylobacter* şüpheli olarak tanımlandı. Şüpheli kolonilerden saflaştırılan izolatlar cins ve tür düzeyinde PCR ile tanımlanıldı. Böylece incelenen 140 dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* spp. izole ve tanımlanıldı. PCR ile izolatların 2'si *C. jejuni* (Şekil 2) ve 1'i *C. coli* (Şekil 3) olarak tanımlanırken, diğer izolatlar tür düzeyinde isimlendirilemedi ve *Campylobacter* spp. (Şekil 4) şeklinde ifade edildi. İzolatların dışkı örneklerinin sağlandığı merkezlere göre dağılımı Tablo 4'de sunuldu. *C. jejuni* izolatlarında ctx (cytolethal distending toxin) genlerinin (*cdtA*, *cdtB* ve *cdtC*) tespiti mPCR ile gerçekleştirildi. İzolatların hiç birinde *cdt* geni saptanamadı.



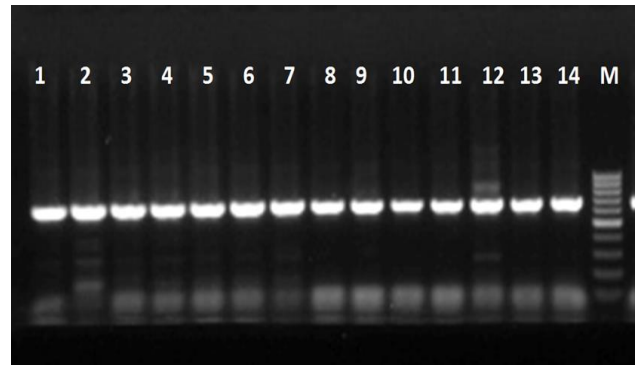
Şekil 2. *C. jejuni* PCR görüntüsü (M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas; NK: Negatif Kontrol; 1 ve 2: *C. jejuni*, 323 bp; 3 ve 4: Negatif örnekler).

Figure 2. *C. jejuni* PCR image (M: Molecular marker 100 bp, Fermentas; NK: Negative Control; 1 and 2: *C. jejuni*, 323 bp; 3 and 4: Negative samples).



Şekil 3. *C. coli* PCR görüntüsü (M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas; 1: Negatif kontrol; 2: Negatif örnek; 3: Pozitif kontrol; 4: *C. coli*, 126 bp)

Figure 3. *C. coli* PCR image (M: Molecular marker 100 bp, Fermentas; 1: Negative control; 2: Negative sample; 3: Positive control; 4: *C. coli*, 126 bp).



Şekil 4. *Campylobacter* spp. PCR görüntüsü (1-13 Pozitif örnekler, 650 bp; 14: Pozitif kontrol; M: Moleküler marker 100 bp, Fermentas).

Figure 4. *Campylobacter* spp. PCR image (1-13 Positive samples, 650 bp; 14: Positive control; M: Molecular marker 100 bp, Fermentas).

Tablo 4. Termofilik *Campylobacter* türlerinin izole edildiği merkezlere göre dağılımı.

Table 4. Distribution of thermophilic *Campylobacter* species according to the centers where they are isolated.

Merkez	Dışkı sayısı	<i>Campylobacter</i> spp. (%)	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)	<i>C. lari</i> (%)	<i>C. upsaliensis</i> (%)	Toplam (%)
Suluova	20	3 (15)	1 (5)	0	0	0	4 (20)
Taşova	20	2 (10)	0	0	0	0	2 (10)
Amasya merkez	20	2 (10)	1 (5)	0	0	0	3 (15)
Göynücek	20	1 (5)	0	0	0	0	1 (5)
Gümüşhacıköy	20	0	0	0	0	0	0
Merzifon	20	2 (10)	0	1 (5)	0	0	3 (15)
Hamamözü	20	0	0	0	0	0	0
<b>Toplam</b>	<b>140</b>	<b>10 (7.2)</b>	<b>2 (1.4)</b>	<b>1 (0.7)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13 (9.3)</b>

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Termofilik *Campylobacter* türleri pek çok memeli ve kanatlı hayvan türünün normal barsak florasını oluşturmakla birlikte özellikle *C. jejuni* ve *C. coli* gibi türlerin, insan ve çok sayıda hayvan türünde önemli enfeksiyonlara yol açtıkları ortaya konulmuştur (Rahimi vd., 2017). Buzağılar başta olmak üzere genç hayvanlarda,

başka klinik belirti oluşturmaksızın, ishallerine neden olmaktadır (Klein vd., 2013). Pek çok termofilik *Campylobacter* türünün zoonotik öneme sahip olduğu belirlenmiştir (Weis vd., 2014; Zhao vd., 2015).

Mandaların diğer hayvanlarda olduğu gibi pek çok patojen etkeni taşıdıkları, bazı hastalıkların duyarlı hayvan popülasyonlarına ve insanlara bulaştırılmasında rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Maktabi vd., 2019). Farklı

hayvan türlerine ait dışkı örneklerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır (Abay vd., 2014; Adıgüzel vd., 2018; Aslantaş, 2019; Kim vd., 2016; Kojima vd., 2015; Rahimi vd., 2017; Viswanathan vd., 2017; Weis vd., 2014). Mandalara ait çeşitli materyallerden farklı bakterilerin tespitine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Ak ve Gülhan, 2018; Gandahi vd., 2010; Nizza vd., 2010; Nuhay ve Gülhan, 2017; Saka ve Terzi Gülel, 2018; Zimmer vd., 2010). Ancak manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik çalışma sayısının sınırlı olduğu görülmektedir (Baserisalehi vd., 2005; Boonmar vd., 2007; Hassanain, 2011; Kakkar ve Dogra, 1990; Osbjer vd., 2016). Diğer yandan, yürütülen çalışmalar daha çok manda et, süt ve atık materyallerinden termofilik *Campylobacter* türlerinin belirlenmesine yöneliktir (Modi vd., 2015; Maktabi vd., 2019; Rahimi vd., 2013; Serraino vd., 2013; Willis vd., 2017). Mandalarda yapılan çalışmaların sınırlı kalmasının belki de en önemli nedenleri; mandaların spesifik coğrafik bölgelerde lokalize olması ve popülasyonunun ülkeden ülkeye değişkenlik göstermesinden kaynaklanabilir.

Hindistan'da sağlıklı ve ishali hayvanlarda yapılan bir çalışmada (Kakkar ve Dogra, 1990) incelenen 5 sağlıklı ve 25 ishali olmak üzere toplam 30 manda dışkı örneğinden 5 (% 16,7) termofilik *Campylobacter* türü izole edilmiştir. İzolatların tamamı ishali hayvanlardan gerçekleştirilmiş ve 3'ü *C. jejuni*, 2'si de *C. coli* olarak tanımlanmıştır.

Aynı ülkede klinik olarak sağlıklı evcil hayvanlarda termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik gerçekleştirilen bir çalışmada (Baserisalehi vd., 2005), incelenen 21 manda dışkısı örneğinin 6 (% 28,6)'sında termofilik *Campylobacter* spp. izole edilmiştir. Araştırmada, izolatların 3'ü *C. jejuni*, 2'si *C. coli* ve 1'i de *C. lari* olarak tanımlanmıştır.

Japonya'da kesimhanelerde sığır ve mandalarda *Campylobacter* spp. prevalansını tespit etmek amacıyla yapılan bir çalışmada (Boonmar vd., 2007), mandalardan alınan 184 sekum örneğinin 3'ünde (% 1,6) ve 100 safranın 1'inde (% 1) *Campylobacter* spp. belirlenmiştir. Sekal kökenli 3 izolatın 2'si ve safradan izole edilen tek izolat *C. jejuni* olarak tanımlanmıştır.

Diğer yandan, Mısır'da yapılan bir çalışmada (Hassanain, 2011) incelenen 55 manda bağırsak içeriği örneğinin tamamı *Campylobacter* spp. açısından negatif bulunmuştur. Benzer bir çalışmada (Osbyer vd., 2016) sağlıklı mandalardan alınan 25 dışkı örneği termofilik *Campylobacter* spp. açısından incelenmiş, örneklerin hiçbirinde kültür ve PCR ile pozitiflik belirlenmemiştir.

Bu çalışmada, incelenen 140 Anadolu mandası dışkı örneğinden 13 (% 9,3) termofilik *Campylobacter* cins düzeyine tanımlanmıştır. İzolatların 2'si *C. jejuni* ve 1'i

*C. coli* olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 10 izolat çalışma kapsamında kullanılan *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ve *C. upsaliensis* türlerine spesifik primerler ile tanımlanamamıştır ve *Campylobacter* spp. olarak tanımlanmıştır.

Manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır. Bazı çalışmalarda etkenlerin çalışılan manda popülasyonlarında belirlenemediği (Hassanain, 2011; Osbyer vd., 2016) bazılarındaki ise yüksek seviyelerde (Baserisalehi vd., 2005; Kakkar ve Dogra, 1990) saptandığı görülmektedir. Çalışma kapsamında örnek alınan manda popülasyonlarında belirlenen toplam pozitiflik oranının farklı ülkelerde bildirilen oranlardan genelde düşük olduğu görüldü. Diğer yandan çalışma popülasyonları arasında örnek alınan bazı manda popülasyonlarından izolasyon yapılamaması negatif bildirim yapılan çalışmalarla (Hassanain, 2011; Osbyer vd., 2016) uyumlu bulundu. İzolasyon oranlarının diğer ülkelerdekilerden düşük olması, araştırma kapsamında alınan dışkı örneklerinin klinik olarak sağlıklı mandalardan sağlanmış olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan metotların, örnek toplanan merkezlerin farklı coğrafik alanlara ait olması ve popülasyon içi bireysel farklılıklar da sonuçları etkileyebilmektedir. Bu durum, önceki yıllarda aynı ülkedeki çalışma bulgularında görülebildiği gibi, farklı ülkeler arasındaki bildirilen değerlerde de saptanabilmektedir.

Bu çalışmada Amasya ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığı, yaygınlığı ve hedef hayvan popülasyonlarındaki taşıyıcılık oranları ilk kez incelendi. Çalışma kapsamındaki bazı Anadolu Mandası popülasyonlarından sağlanan dışkılarından etken izole edilemezken, bazı popülasyonlarda değişken oranlarda tespit edildi. Toplam hayvan popülasyonlarından izole edilen etkenin prevalansı ise %9,3 olarak saptandı. Zoonotik öneme sahip etkenin mandalardaki taşıyıcılık oranının yüksek olması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, Ülkemizde diğer hayvan türlerinde zoonotik öneme sahip etkenlerin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mandalara ait verilerin çok yetersiz olduğu görülmektedir. Yapılan literatür taramalarında manda dışkılarından termofilik *Campylobacter* türlerinin tespiti amacıyla gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu araştırma ile bölgemizdeki manda popülasyonları sınırlı dahi olsa termofilik *Campylobacter* türleri açısından incelendi. Zoonoz karaktere sahip etkenlerin düşük düzeylerde de olsa bazı manda popülasyonlarında tespit edilmesinin önemli olduğu kanısına varıldı. Bu nedenle, örnek alınan manda sahipleri hastalıkla ilgili olarak detaylıca

bilgilendirildi. Ülkemizin farklı bölgelerinde, manda yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda konuyla ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna ulaşıldı.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya PYO.VET. 1904.18.019 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Abay, S., Aydın, F., Hızlısoy, H. & Güneş, V. (2014).** Recovery of thermophilic *Campylobacter* spp. in healthy and diarrhoeic pets by three culture methods and identification of the isolates by multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **20**(5), 735-741.
- Adiguzel, M.C., Kahraman, B.B., Sigirci, B.D., Celik, B., Bagcigil, A.F., Metiner, K., Ikiz, S., Ak, S. & Ozgur, N.Y. (2018).** Phenotypic and genotypic examination of antimicrobial resistance in thermophilic *Campylobacter* species isolated from poultry in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, **62**, 463-468.
- Ak, S. & Gülhan, T. (2018).** Anadolu mandası dışkılarından Enterekok türlerinin izolasyonu ve antibiyotik dirençliliklerinin tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **29**(1), 40-45.
- Aslantaş, Ö. (2019).** Isolation and molecular characterization of thermophilic *Campylobacter* spp. in Dogs and Cats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **25**(3), 341-348.
- Baserisalehi, M., Al-Mahdi, A.Y. & Kapadnis, B.P. (2005).** Antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from environmental samples. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **23**, 48-51.
- Boonmar, S., Chanda, C., Markvichitr, K., Chauchom, S., Yingsakmongkon, S., Yamamoto, S. & Morita, Y. (2007).** Prevalence of *Campylobacter* spp. in slaughtered cattle and buffaloes in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **69**(8), 853-855.
- Crawshaw, T. (2019).** A review of the novel thermophilic *Campylobacter*, *Campylobacter hepaticus*, a pathogen of poultry. *Transboundary and Emerging Diseases*, **66**, 1481-1492.
- Gandahi, A., Chen, Q.S., Yang, P., Shah, M.G., Kamboh, A.A., Malhi, M. & Detho, Z.A. (2010).** Antibiotic sensitivity profile of bacterial isolates from buffalo uteri. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 432-437.
- Hassanain, N.A. (2011).** Antimicrobial resistant *Campylobacter jejuni* isolated from humans and animals in Egypt. *Global Veterinaria*, **6**(2), 195-200.
- Jansen, W., Müller, A., Grabowski, N.T., Kehrenberg, C., Muylkens, B. & Al Dahouk, S. (2019).** Foodborne diseases do not respect borders: Zoonotic pathogens and antimicrobial resistant bacteria in food products of animal origin illegally imported into the European Union. *The Veterinary Journal*, **244**, 75-82.
- Kakkar, M. & Dogra, S.C. (1990).** Prevalence of *Campylobacter* infections in animals and children in Haryana, India. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, **8**(1-2), 34-36.
- Kim, J.S., Lee, M.Y., Kim, S.J., Jeon, S.E., Cha, I., Hong, S., Chung, G.T., Huh, M.J., Kang, Y.H., Yoo, C.K. & Kim, J. (2016).** High-level ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* isolates circulating in humans and animals in Incheon, Republic of Korea. *Zoonoses and Public Health*, **63**, 545-554.
- Klein, D., Alispahic, M., Sofka, D., Iwersen, M., Drillich, M. & Hilbert, F. (2013).** Prevalence and risk factors for shedding of thermophilic *Campylobacter* in calves with and without diarrhea in Austrian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **96**, 1203-1210.
- Kojima, C., Kishimoto, M. & Ezaki, T. (2015).** Distribution of antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from poultry at a slaughterhouse and supermarkets in Japan. *Biocontrol Science*, **20**(3), 179-184.
- Maktabi, S., Ghorbanpoor, M., Hossaini, M. & Motavalibashi, A. (2019).** Detection of multi-antibiotic resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in beef, mutton, chicken and water buffalo meat in Ahvaz, Iran. *Vet. Res. Forum*, **10**(1), 37-42.
- Martinez, I., Mateo, E., Churrua, E., Girbau, C., Alonso, R. & Astorga, A.F. (2006).** Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**, 45-48.
- Modi, S., Brahmabhatt, M.N., Chatur, Y.A. & Nayak, J.B. (2015).** Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Veterinary World*, **8**(1), 1-8.
- Nizza, S., Mallardo, K., Manco, E., Marullo, A., Pisanelli, G., De Martino, L., Iovane, G. & Pagnini, U. (2010).** Lethal co-infection of rotavirus and *E. coli* O157:H7 in Mediterranean buffalo calves of a closed community in Italy. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 470-472.
- Nuhay, Ç. & Gülhan, T. (2017).** Samsun ili ve ilçelerinde yetiştirilen Anadolu Mandalarının dışkı örneklerinde *Escherichia coli* O157:H7'nin tespiti. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **28**(1), 39-45.

- Osbjert, K., Tano, E., Chhayheng, L., Mac-Kwashie, A.O., Fernström, L.L., Ellström, P., Sokerya, S., Sokheng, C., Mom, V., Chheng, K., San, S., Davun, H., Boqvist, S., Rautelin, H. & Magnusson, U. (2016).** Detection of *Campylobacter* in human and animal field samples in Cambodia. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **124**, 508-515.
- Pamuk, Ş., Yıldırım, Y., Seker, E., Gürler, Z. & Kara, R. (2012).** A survey of the occurrence and properties of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, **65**(3), 416-422.
- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russel, G., Erdem, A.N. & Zeytin, H. (1996).** Prevalence of cytotoxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infection and Immunity*, **64**(6), 2070-2078.
- Rahimi, E., Ameri, M., Alimoradi, M., Chakeri, A. & Bahrami, A.R. (2013).** Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw camel, beef, and water buffalo meat in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, **22**, 467-473.
- Rahimi, E., Alipoor-Amroabadi, M. & Khamesipour, F. (2017).** Investigation of prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in livestock feces. *Canadian Journal of Animal Science*, **97**, 207-213.
- Sahin, O., Plummer, P.J., Jordan, D.M., Sulaj, K., Pereira, S., Austerman, S.R., Wang, L., Yaeger, M.J., Hoffman, L.J. & Zhang, Q. (2008).** Emergence of a tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* clone associated with outbreaks of ovine abortion in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(5), 1663-1671.
- Saka, E. & Terzi Gülel, G. (2018).** Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. *Journal of Food Science*, **83**(6), 1716-1722.
- Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Piva, S., Mion, D., Zanoni, R.G. (2013).** Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of Dairy Science*, **96**, 2801-2807.
- Thrusfield, M. (2018).** *Veterinary Epidemiology*, 4rd Edition, 624 pages, Wiley-Blackwell, UK, ISBN 9781118280270.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2019).** Türkiye'deki manda sayılarının illere göre dağılımı. <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>. (24 Ekim 2019)
- Viswanathan, M., Pearl, D.L., Taboada, E.N., Parmley, E.J., Mutschall, S.K. & Jardine, C.M. (2017).** Cluster analysis of *Campylobacter jejuni* genotypes isolated from small and medium-sized mammalian wildlife and bovine livestock from Ontario farms. *Zoonoses and Public Health*, **64**, 185-193.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. & Rodgers, F.G. (2002).** Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**(12), 4744-4747.
- Weis, A.M., Miller, W.A., Byrne, B.A., Chouicha, N., Boyce, W.M. & Townsend, A.K. (2014).** Prevalence and pathogenic potential of *Campylobacter* isolates from free-living, human-commensal American Crows. *Applied Environmental Microbiology*, **80**(5), 1639-1644.
- Willis, C., Jørgensen, F., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Jenkins, C., Fenelon, D., Sadler-Reeves, L. & McLaughlin, J. (2017).** An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *Journal of Applied Microbiology*, **124**, 535-546.
- Wisessombat, S., Kittiniyom, K., Srimanote, P., Wonglumsom, W. & Voravuthikunchai, S.P. (2009).** A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in chicken meat products. *Journal of Microbiological Methods*, **76**, 169-173.
- Zhao, S., Mukherjee, S., Chen, Y., Li, C., Young, S., Warren, M., Abbott, J., Friedman, S., Kabera, C., Karlsson, M. & McDermott, P.F. (2015).** Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, 1314-1321.
- Zimmer, P.A., Draghi, M.G., Benitez, D.F., Crudeli, G., Biotti, G.M., Cetrá, B., Storani, C., Salustio, E., Piazza, E. & Samartino, L. (2010).** Brucellosis in Buffalos in Formosa, Argentina. *Proceedings 9th World Buffalo Congress*, 20 April 2010, Buenos Aires, Argentina, 441-443.



## Usage of *Lactobacillus rhamnosus* as a Probiotic in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[\*]</sup>

Fatma ÖZTÜRK<sup>1\*</sup> Ömer Memduh ESENDAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Fish Processing Technology, Faculty of Fisheries, İzmir Katip Celebi University, İzmir, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine, Near East University, Nicosia, TRNC.

Geliş/Received: 10.02.2020

Kabul/Accepted: 13.03.2020

How to cite: Öztürk, F. & Esendal, Ö.M. (2020). Usage of *Lactobacillus rhamnosus* as a probiotic in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 93-99.

Atıf yapmak için: Öztürk, F. & Esendal, Ö.M. (2020). Levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) probiyotik olarak *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 93-99.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0003-4763-3801>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-2700-2634>

### \*Corresponding author's:

Fatma ÖZTÜRK

Department of Fish Processing Technology,  
Faculty of Fisheries, İzmir Katip Celebi  
University, İzmir, Turkey.

✉: [fatma.ozturk@ikc.edu.tr](mailto:fatma.ozturk@ikc.edu.tr)

Mobile telephone : +90 (533)749 36 64

Telephone : +90 (232) 329 35 35/4215

Fax : +90 (232) 325 0535

**Abstract:** In this study, the effects of *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) used as a probiotic supplement on the deformation rate, survival rate, weight gain, and intestinal microflora in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were investigated. For this purpose, the probiotic agent was incorporated into the rearing water and Artemia nauplii culture at concentrations of 10<sup>6</sup> CFU/mL and 10<sup>8</sup> CFU/mL, respectively. The incorporation of the probiotic was carried out until the 50<sup>th</sup> day. From 50 to 125 days post-hatching, 10<sup>9</sup> CFU/g of probiotic was incorporated into the diet of the both groups every day. The deformation rates of the larvae were recorded as 5% in the group received the probiotic via rearing water, 2% in the group received the probiotic via Artemia culture, and 7% in the control group (P<0.01). Survival rates of the experimental groups received probiotics were found significantly higher than the control group (P<0.01). No significant differences were found on the weight gain of sea bass individuals received probiotic (P>0.01). On the other hand, It was found that the probiotic addition to Artemia culture leads to a decrease in the number of *Vibrio* spp., (P<0.01). As a result, it has been determined that the addition of probiotics to rearing water and especially Artemia culture has positive effects on the rate of larval survival and deformation.

**Keywords:** Deformation, fish, microflora, probiotic, survival rate.

## Levrek Balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) Probiyotik Olarak *Lactobacillus rhamnosus* Kullanımı

**Öz:** Bu çalışmada, levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103)'un balıkların deformasyon oranı, yaşama oranı, ağırlık artışı ve bağırsak mikroflorası üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, probiyotik ilavesi yetiştirme suyuna 10<sup>6</sup> kob/mL ve Artemia nauplii kültürüne 10<sup>8</sup> kob/mL düzeyinde yapılmış ve 50. güne kadar devam etmiştir. 50. günden sonra 125. güne kadar her gün, bu gruplardaki balıkların toz yemine 10<sup>9</sup> kob/g düzeyinde probiyotik ilavesine devam edilmiştir. Deneme sonunda larvalardaki deformasyon oranları; yetiştirme suyuna probiyotik ilave edilen grupta %5, Artemia kültürüne ilave edilen grupta %2 ve kontrol grubunda %7 olarak tespit edilmiştir (P<0.01). Probiyotik ilave edilen deneme gruplarının yaşama oranı kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (P<0.01). Probiyotik ilavesinin balıkların ağırlık artışı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (P>0.01). Ayrıca, Artemia kültürüne probiyotik ilavesinin *Vibrio* spp. sayısında önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (P<0.01). Sonuç olarak yetiştirme suyuna ve özellikle Artemia kültürüne probiyotik ilavesinin larval yaşama oranı ve deformasyon oranı üzerinde olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Balık, deformasyon, mikroflora, probiyotik, yaşama oranı.

### \*Sorumlu yazar:

Fatma ÖZTÜRK

İzmir Katip Celebi Üniversitesi,  
Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Eğitim  
Araştırma Uygulama Birimi. Havaalanı  
Şosesi Cd., 35620 Aosb, Balatçık Kampüsü,  
Balatçık, Çiğli / İzmir, Türkiye.

✉: [fatma.ozturk@ikc.edu.tr](mailto:fatma.ozturk@ikc.edu.tr)

Cep telefonu : +90 (533)749 36 64

Telefon : +90 (232) 329 35 35/4215

Faks : +90 (232) 325 0535

[\*] Produced from PhD thesis titled "The effect of using *Lactobacillus rhamnosus* as a probiotic on the performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*)".



## INTRODUCTION

In parallel with the worldwide expansion of aquaculture, there has been a dramatic increase in microbial fish diseases. Several pathogenic and opportunistic bacteria have caused high mortality rates during larval first-feeding (Franke et al., 2017). Therefore, a wide variety of antibiotics have been used in order to prevent bacterial diseases in industrial animals (Gobi et al., 2018). However, using large amounts of antibiotics in farm animals have resulted in antibiotic residues in tissues, an imbalance of normal intestinal flora, a reduction in beneficial microbial populations in the intestines, and the generation of antibiotic-resistant bacteria (Byun et al., 1997; Lin et al., 2017; Marti et al., 2018; Preena et al., 2019). Consequently, alternative methods are required to support digestive system and immune system of fish larvae. Among these, one of the methods which has gained acceptance in the aquaculture industry is to control potential pathogens through the use of probiotic bacteria (Harzevili et al., 1998; Nikoskelainen et al., 2003; Arig et al., 2013; Gumus et al., 2016; Goda et al., 2018).

Probiotics are defined as a viable pure or mixed culture of microorganisms which provides benefits to the host (Van Doan et al., 2018; Çelik et al., 2019). They prevent colonization of pathogenic microorganisms to the intestinal epithelial cells and avoid their propagation by producing antimicrobial metabolites. They also improve the properties of the indigenous microflora and thus improve the health status of the host and increase feed conversion (Byun et al., 1997; Nguyen et al., 2017). In aquaculture, probiotics are used to increase production, improve water quality, decrease the use of antibiotics and other chemicals, and increase resistance to diseases (Van Doan et al., 2018). They are added to the water and administered to artificial feeds and live foods, such as artemia and rotifer (Sutthi et al., 2018). The most widely used bacteria as probiotics are lactic acid bacteria (LAB) (Silvi et al., 2008; Lamari et al., 2013; Piccolo et al., 2015; Didinen et al., 2016; Ljubobratovic et al., 2017). The normal microflora of the gastrointestinal tract of healthy fish includes LAB. LAB inhibits the growth of various pathogens by producing substances like organic acids and bacteriocins (Byun et al., 1997; Jöborn et al., 1997).

In this study *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) was added to the rearing water, live food cultures and artificial feeds of sea bass in order to study its effects on the deformation rate, survival rate, weight gain and intestinal microbial flora.

## MATERIAL AND METHOD

**Probiotic Strain and Their Preparation:** In this study, *L. rhamnosus* ATCC 53103 strain which was

obtained from a LGC Promochem Ltd. (Teddington, UK) was used as probiotic. In order to produce probiotics that would be used in the experiments, 200 mL Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS, Merck) was put into roux bottles and sterilized at 118°C for 15 min. in autoclave (Nüve, OT 90L). Then, the medium was hardened in roux bottles placed in a horizontal position. One mL of activated culture was aseptically transferred into a roux bottle, and incubated at 37°C for 18-24 hours. After the total number of bacteria was determined in the stock probiotic culture, required concentrations to be used in experimental groups were prepared by sterile physiological saline solution. The bacterial suspensions were kept at 4 °C until used within one week.

**Experimental Design:** In this research, it was carried out in the Hatko Sea Products Inc., Ören hatchery, Milas, Muğla, Turkey in 2005. Ethics committee approval was not required for fish at the time of the study.

Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, average weight 0.21±0.01 mg, were taken in commercial marine hatcheries. The larvae were immediately transferred to the larvae tanks and trials were started. The probiotic bacteria was administered to sea bass for 125 days. The experiment was carried out in three groups; Following the hatching, the larvae were stocked in cylinders-conical tanks (2 m<sup>3</sup>), with initial stocking density of 125 larvae /L.

**Group 1:** *L. rhamnosus* ATCC 53103 was added to the rearing water and diet. Taking the volume of the water in the rearing tanks into consideration, 10<sup>12</sup> CFU/mL *L. rhamnosus* ATCC 53103 strain was added to the rearing water from 9 to 50 days post-hatching (DAH). In this way, the final concentration of bacteria in the tank became 10<sup>6</sup> CFU/mL during 50 DAH. Probiotics were added to the tanks twice a day at 08:00 and 16:00 hours, prior to Artemia nauplii addition. From 50 to 125 DAH, the fishes were given diet containing 10<sup>9</sup> CFU/g *L. rhamnosus* ATCC 53103. Probiotic was sprayed on fish diet and mixed by hand.

**Group 2:** *L. rhamnosus* ATCC 53103 was supplied to larvae via Artemia nauplii and added to the diet. From 9 to 50 DAH, larvae were fed with Artemia nauplii to which 10<sup>8</sup> CFU/mL *L. rhamnosus* ATCC 53103 strain was added. After the 50 DAH, the bacterial administration was performed with diet. From 50 to 125 DAH, the fishes were given diet containing 10<sup>9</sup> CFU/g *L. rhamnosus* ATCC 53103. Probiotic was sprayed on fish diet and mixed by hand.

**Control group:** *L. rhamnosus* ATCC 53103 was not supplied to larvae. Between 9 and 50 DAH, larvae were fed with Artemia nauplii. From 50 to 125 DAH, the fishes were fed with microparticle diet (300 µ - 1.2 mm). Daily feeding rate was about 3.5% of total body weight.

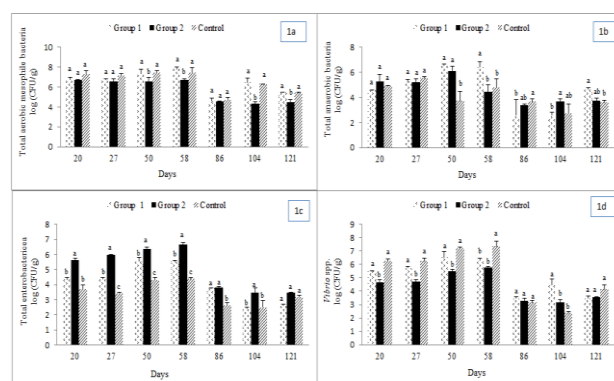
**Determination of Intestinal Microflora of the Fish and Bacterial Load in Artemia Culture:** After hatching, fish samples were taken on days 20, 27, 50, 58, 86, 104 and 121 and microbiological analyzes were done. In order to determine intestinal flora of the fish, during the larval period, about 20 larvae and 5-10 juveniles were put into sterile tubes (Muroga et al., 1987; Grisez et al., 1997). They were immersed in 0.1% benzalkonium chloride saline solution for 1 min; then, they were washed under sterile distilled water for 30 s. After that, these fish samples were homogenized using saline solution. *Artemia nauplii* used in feeding the fish larvae were taken 1 g and were homogenized in 9 mL saline solution (Muroga et al., 1987; Rollo et al., 2006). Homogenates were serially diluted and 0.1 mL of appropriate dilutions was spread onto plates. Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar was used for lactic acid bacteria (LAB) and incubated anaerobically at 30°C for 48 hours, Violet Red Bile Agar (VRBA, Merck) was used for total enterobacteria (TEB) and incubated at 37°C for 24 hours, Plate Count Agar (PCA, Merck) was used for total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) and incubated at 30°C for 48 hours, Blood Agar (BA, Merck) was used for total anaerobic bacteria (TAB) and incubated at 30°C for 24 hours in a steel jar, Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose Agar (TCBSA, Merck) was used for *Vibrio* spp. and incubated at 30°C for 24 hours (Harrigan, 1998, Nikoskelainen et al., 2001; Villamil et al., 2010; Hamza et al., 2016).

**Determination of Survival Rate, Deformation Rate, and Weight Gain:** At the end of the experiment, survival rate of larvae was determined by counting the larvae remaining in the tanks. For determining the rate of deformation, at the end of the rearing period in the hatchery, the deformed larvae were separated from the healthy individuals. In order to do this, larvae were anesthetized with phenoxyethanol (200 ppm) (Crespel et al., 2017). Immobile larvae were placed on an illuminated glass table. The individuals who had spine, mouth, fin, and gill deformations were separated. Larvae weight was measured using the electronic balance (0,0001 g; Shimadzu ATX-224, Japan) at the beginning and end of the experiment. The weight gain of fish was calculated by following formula; Weight gain (g/fish) = Final weight – initial weight.

**Statistical Analysis:** Statistical analysis was carried out with SPSS 11.5 (Chicago, USA). The obtained data about intestinal flora and weight gain were analyzed using ANOVA (analysis of variance). The results were evaluated by Duncan Multiple Comparison Test. Chi-square analysis was used to compare the groups in terms of survival and deformation rates. Differences among treatments were considered significant at the  $P < 0.01$  level. All measurements were carried out in duplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Intestinal Microflora:** In the inoculations made until the 50<sup>th</sup> day, the number of TAMB were not different between Group 1 and Group 2, but later their numbers substantially decreased in Group 2 ( $P < 0.01$ ). Between 20 and 58 days, it was found that the number of TEB were higher both in Groups 1 and 2, than the control group during the experiment period ( $P < 0.01$ ). The number of *Vibrio* spp. were lower in the experimental groups, to which probiotics were added, than the control group. The lowest number *Vibrio* spp. was detected in the fish in Group 2 ( $P < 0.01$ ) (Figure 1a, 1b, 1c, 1d).



**Figure 1.** Changes in the number of TAMB (a), TAB (b), Enterobacteriaceae (c), and *Vibrio* spp. (d) in the intestinal flora of the sea bass.

In this research, after the larvae in the experimental groups started to receive feed, the number of Enterobacteriaceae in their intestines increased, while the number of *Vibrio* spp. decreased. The situation was just the opposite in the control group. When experimental groups are compared, the number of TEB in Group 2 was higher than Group 1. The number of *Vibrio* spp. was lower. The tendency of a decline in the number of *Vibrio* spp. indicates that they are inhibited by the probiotic bacteria. It was observed that more successful results would be obtained by adding probiotic bacteria to *Artemia* culture. These results were similar to many studies. For instance, in the research conducted by Byun et al., (1997), it was determined that the number of aerobic and anaerobic bacteria in the intestinal flora of flounders decreased by using *Lactobacillus* spp. whereas the number of Enterobacteriaceae increased. Gatesoupe, (1991) showed that in rotifer culture, the use of *Lactobacillus plantarum* decreased the number of aerobic bacteria. Rollo et al., (2006) that the use of *Lactobacillus fructivorans* and *L. plantarum* in *Artemia* and rotifer cultures decreased the number of aerobic and anaerobic bacteria as well as Enterobacteriaceae and *Staphylococcus* spp. in sea bream. Hamza et al., (2006) reported that the number of total bacteria in the digestive system of sea bass applied

probiotic (*Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis*) decreased significantly. In contrast, Jöborn et al., (1997), stated that when *Carnobacterium* spp. was used as a probiotic, total number of aerobic bacteria increased in the intestinal flora of rainbow trout. Similarly, Silvi et al., (2008) also reported that *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii* strain on the intestinal microbiota of sea bass was effective. It has been stated that total intestinal microbiota dramatically increases except for day 22, in particular the number of Enterobacteriaceae is affected by probiotic therapy.

In this study, the number of *Vibrio* spp. in the intestines of the fish in Group 1 and Group 2 was found to be lower than the control group. The lowest number of bacteria was observed in Group 2. Not all of the probiotic bacteria added to rearing water could be taken by the fish; however, the bacteria added to Artemia culture was filtered by Artemia and more bacteria could be taken by the fish. As determined in the study conducted by Reitan et al., (1993), it is estimated that the reason of a decrease in the number of *Vibrio* spp. is that probiotic bacteria are bioencapsulated by live feed organisms. Also, Villamil et al., (2010) reported that *Pediococcus acidilactici* transmitted via live feed inhibited *Vibrio splendidus* in turbot larvae. Goda et al., (2018) reported that the Bactozyme, a commercial product containing probiotic, cause decrease the number of *Vibrio* spp. in the intestinal flora of the sea bass. In conclusion, in this study, it was determined that the use of *L. rhamnosus*, especially in Artemia culture, prevented the colonization and proliferation of some opportunistic pathogens.

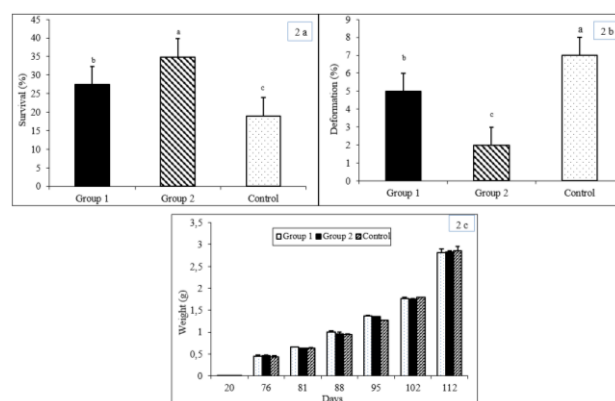
**The Number of Bacteria in Artemia Culture:** It was found that in the inoculations made from Artemia nauplii, the number of *Vibrio* spp. was  $7.01 \pm 0.55$ , TEB was  $4.56 \pm 0.82$  log CFU/g, and TAMB was  $8.00 \pm 0.43$  log CFU/g. After the Artemia culture was incubated with probiotic bacteria for 2 hours,  $10^2$  CFU/g lactic acid bacteria were detected in MRS Agar.

The larval form of most fish is released in an early ontogenetic phase. They start feeding although neither the digestive tract nor the immune system are still fully developed, therefore, these larvae are exposed to gastrointestinal microbiota-associated diseases (Silvi et al., 2008). During first feeding, the microorganisms found in feed and water go to larval intestine. The first colonization in fish intestine is of great importance in terms of host health and development. For the formation of a balanced intestinal microflora, probiotic bacteria must be used soon after hatching (Hamza et al., 2016).

It is a well-known fact that in the formation of the fish intestinal flora, rearing water and the species of bacteria on the live feed are effective. Artemia is one of the best food sources for many species of animals which were

cultured. However, Artemia nauplii have heavy bacterial loads and therefore they are considered as the most important vector which is responsible for carrying pathogenic bacteria into rearing systems (Reitan et al., 1993). In this research, the number of *Vibrio* spp. and TAMB were 7.01 log CFU/nauplii and 8.00 log CFU/nauplii, respectively. Hameed and Balasubramanian, (2000) stated that the number of TAMB was  $3.8 \times 10^3 - 8.1 \times 10^3$  CFU/nauplii and the number of *Vibrio* spp. was  $9.4 \times 10^2 - 4.3 \times 10^3$  CFU/nauplii. Olsen et al., (2000) also stated that total number of bacteria was  $2.4 \times 10^4$  CFU/nauplii and that 58% of the total bacteria consisted of *Vibrio* spp. It is thought that this difference comes from the fact that Artemia is a biological product and they are obtained from different regions. In addition, during the study period in which Artemia was used, the numbers of bacteria found in the intestinal flora of the fish were higher than the period during which commercial diet was used. Therefore, it is concluded that the high bacterial load in the larvae resulted from Artemia culture.

**Survival Rate, Deformation Rate, and Weight Gain:** At the end of the experiment, the survival rates of Group 1, Group 2, and the control group were determined as 27.4%, 34.8% and 18.9%, respectively. The survival rates of the experimental groups that received probiotic bacteria were significantly higher than the control group ( $P < 0.01$ ) (Figure 2a). Deformation rates of the experimental groups are shown in Figure 2b. The differences between the experimental groups and the control group were regarded as significant ( $P < 0.01$ ). The average weights of the fish in experimental groups are shown in Figure 2c. In the 20<sup>th</sup> day of experiment, the average weights of the experimental groups were  $0.21 \pm 0.01$  mg while at the end of the experiment, the average weights of the Group 1, Group 2, and the control group were determined as  $2.82 \pm 0.08$  g,  $2.83 \pm 0.03$  g, and  $2.85 \pm 0.1$  g, respectively. The average weight gains were compared between experimental groups, and no significant differences were observed ( $P > 0.01$ ).



**Figure 2.** The survival, deformation rate, and weight of the sea bass larvae.

In this study, the rate of larval survival in the experimental groups with probiotic bacteria was higher than the control group. The application of probiotics via *Artemia* gave better survival rates. Similar results were obtained by many researchers. For example, Silvi et al., (2008) and stated that the *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* strain influenced the survival rate of sea bass. Piccolo et al., (2015) reported that the *L. plantarum* strain increased survival of sea bass. In the study carried out by Hamza et al., (2016) two separate probiotics (*Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis*) were mixed with the diet of sea bass, and the survival rate was found to be significantly higher.

Developmental conformation is a critical issue for fish hatcheries. The skeletal deformities develop during especially ontogenesis as far as metamorphosis (Lamari et al., 2013). In many studies it was stated that these deformities could be reduced by using probiotics (Lamari et al., 2013; Aubin et al., 2005; Lin et al., 2017). In this research, the deformation rate in larvae is 5% in Group 1, 2% in Group 2 and 7% in the Control Group. Tovar-Ramirez et al., (2004) reported that the addition of *Debaryomyces hansenii* to the feed of sea bass larvae decreased deformation rates significantly. It has been reported that skeletal deformation significantly decreased in the pike-perch where *Lactobacillus* strains were used (Ljubobratovic et al., 2017). Lamari et al., (2013) investigated the effects of lactic acid bacteria on the histological development of the sea bass and indicated that the spine deformities had the highest incidence in the *Lactobacillus casei* group. In another study, it was reported that the incidence of common vertebral deformities decreased when *P. acidilactici* was used in trout (Aubin et al., 2005). Consequently, It was determined that vertebral malformations could be prevented by the addition of probiotic in the first stages of larval development. But, the interaction between probiotic microorganisms, especially lactic acid bacteria and bone conformation has not been clarified, it probably has indirect effect and may be associated with the inhibition of pathogenic bacteria (Villamil et al., 2010). In addition, probiotics may stimulate the immune system and reduce inflammation in fish larvae, local inflammation can affect the integrity of the spine and in this case, it can causes a risk of deformation (Gil-Martens, 2010).

In this research, it was observed that *L. rhamnosus* ATCC 53103 strain, which was added to *Artemia* culture or rearing water, did not increase weight gain in sea bass larvae. Nikoskelainen et al., (2001), reported similar results with the use of *L. rhamnosus* as probiotics in rainbow trouts. The studies carried out regarding the use of *Leuconostoc mesenteroides* and *L. plantarum* (Vendrell et al., 2008) in rainbow trout and the use of *Lactobacillus*

*lactis* (Harzevili et al., 1998) in rotifer cultures also revealed that probiotic bacteria supplements did not have a significant effect on growth performance. Unlike these studies, It has been reported that the body weight of fish is increased in some studies where lactic acid bacteria are used (Carnevali et al., 2006; Lin et al., 2017; Nguyen et al., 2017; Goda et al., 2018). The differences in the results obtained in these studies may be due to fish species used, the concentration of bacteria and the mode of administration.

As a result, the addition of probiotic bacteria to *Artemia* cultures used as live feeds in larvae was found to be more effective. The use of *L. rhamnosus* ATCC 53103 strain as a probiotic increased survival rate, decreased deformation rate and significantly inhibited *Vibrio* spp. the potential pathogenic agent for sea bass.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by TUBİTAK ((Project No: TOVAG 104-O-496). We thank to HATKO Sea Products Inc. Products Inc., (Ören, Muğla, TURKEY).

## REFERENCES

- Arıg, N., Suzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., Çoban, D., Yıldırım, Ş., Kamacı, H.O., Fırat, H.K. & Saka, Ş. (2013). Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **13**(3), 407-414. DOI: 10.4194/1303-2712-v13\_3\_03.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbé, L. & Lebrun, L. (2005). Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture Research*, **36**(8), 758-767.
- Byun, J.W., Park, S. & Benno, Y. (1997). Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of General and Applied Microbiology*, **43**, 305-308.
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. & Cresci, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, **258**(1-4), 430-438.
- Crespel, A., Zambonino-Infante, J.L., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Fragkouli, S., Quazuguel, P., Huelvan, C., Madec, L., Servili, A. & Claireaux, G. (2017). The development of contemporary European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) is not affected by projected ocean acidification scenarios. *Marine Biology*, **164**(7), 155. DOI: 10.1007/s00227-017-3178-x.



- Çelik, E.Ş., Ergün, S., & Yılmaz, S. (2019). *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus plantarum* probiyotik bakterilerinin bazı balık patojenleri üzerine in vitro antagonistik etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 278-284. DOI: [10.35229/jaes.592933](https://doi.org/10.35229/jaes.592933).
- Didinen, B.I., Koca, B., Metin, S., Diler, O., Erol, K.G., Dulluc, A., Koca, H.U., Yiğit, N.O., Ozkok, R. & Kucukkara, R. (2016). Effect of lactic acid bacteria and the potential probiotic *Hafnia alvei* on growth and survival rates of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch., 1823) stage II juveniles. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(4), 1307-1317.
- Franke, A., Roth, O., De Schryver, P., Bayer, T., Garcia-Gonzalez, L., Künzel, S. & Clemmesen, C. (2017). Poly-β-hydroxybutyrate administration during early life: effects on performance, immunity and microbial community of European sea bass yolk-sac larvae. *Scientific Reports*, 7(1), 15022. DOI: [10.1038/s41598-017-14785-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-14785-z).
- Gatesoupe, F.J. (1991). The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96(3-4), 335-342.
- Gil-Martens, L. (2010). Inflammation as a potential risk factor for spinal deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 26(2), 350-354.
- Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J.C., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M. & Iswarya, A. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 501-508. DOI: [10.1016/j.fsi.2017.12.066](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.066).
- Goda, A.M., Omar, E.A., Srour, T.M., Kotiet, A.M., El-Haroun, E. & Davies, S.J. (2018). Effect of diets supplemented with feed additives on growth, feed utilization, survival, body composition and intestinal bacterial load of early weaning European sea bass, *Dicentrarchus labrax* post-larvae. *Aquaculture International*, 26(1), 169-183. DOI: [10.1007/s10499-017-0200-8d](https://doi.org/10.1007/s10499-017-0200-8d).
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., & Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 155(1-4), 387-399.
- Gumus, E., Aydin, B., & Kanyilmaz, M. (2016). Growth and feed utilization of goldfish (*Carassius auratus*) fed graded levels of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(3), 1124-1133. DOI: [10.22092/IJFS.2018.114596](https://doi.org/10.22092/IJFS.2018.114596).
- Hameed, A.S. & Balasubramanian, G. (2000). Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load. *Aquaculture*, 183(3-4), 195-205.
- Hamza, A., Fdhila, K., Zouiten, D. & Masmoudi, A.S. (2016). *Virgibacillus proomii* and *Bacillus mojavensis* as probiotics in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 495-507. DOI: [10.1007/s10695-015-0154-6](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0154-6).
- Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Harzevili, A.R., Duffel, H.V., Dhert, P., Swings, J. & Sargeloos, P. (1998). Use of potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Research*, 29, 411-417. DOI: [10.1046/j.1365-2109.1998.00217.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00217.x).
- Jöborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L. & Kjelleberg, S. (1997). Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Disease*, 20, 383-392. DOI: [10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x).
- Lamari, F., Castex, M., Larcher, T., Ledevin, M., Mazurais, D., Bakhrouf, A. & Gatesoupe, F.J. (2013). Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota. *Aquaculture*, 376, 137-145. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2012.11.016](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.016).
- Lin, H.L., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Huang, S.L. & Liu, C.H. (2017). Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance, immunity, and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 474-482. DOI: [10.1016/j.fsi.2016.11.026](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.026).
- Ljubobratovic, U., Kosanovic, D., Vukotic, G., Molnar, Z., Stanisavljevi, N.S., Ristic, T. & Jeney, G. (2017). Supplementation of lactobacilli improves growth, regulates microbiota composition and suppresses skeletal anomalies in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) reared in recirculating aquaculture system (RAS): a pilot study. *Research in Veterinary Science*, 115, 451-462. DOI: [10.1016/j.rvsc.2017.07.018](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.07.018).
- Marti, E., Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marcé, R. & Balcázar, J.L. (2018). Abundance of



- antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wild freshwater fish species. *Chemosphere*, **196**, 115-119. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2017.12.108](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.108).
- Muroga, K., Higashi, M. & Keitoku, H. (1987).** The isolation of intestinal microflora of farmed red sea bream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, **65**, 79-88.
- Nguyen, T.L., Park, C.I. & Kim, D.H. (2017).** Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, **471**, 113-120. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.008).
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. & Bylund, G. (2001).** Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, **198**, 229-236.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. & Lilius, E.M. (2003).** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, **15**(5), 443-452. DOI: [10.1016/S1050-4648\(03\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00023-8).
- Olsen, A.I., Olsen, Y., Attramadala, M.Y., Christie, K., Birkbeck, T.H., Skjermo, J. & Vadstein, O. (2000).** Effect of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, **190**, 11-25.
- Piccolo, G., Bovera, F., Lombardi, P., Mastellone, V., Nizza, S., Meo, C.D. & Marono, S. (2015).** Effect of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and hematological traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture International*, **23**(4), 1025-1032. DOI: [10.1007/s10499-014-9861-8](https://doi.org/10.1007/s10499-014-9861-8).
- Preena, P.G., Dharmaratnam, A., Raj, N.S., Kumar, T.V.A., Raja, S.A. & Swaminathan, T.R. (2019).** Antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from freshwater ornamental fish, guppy showing bacterial disease. *Biologia*, **118**, 257-275. DOI: [10.2478/s11756-019-00261-8](https://doi.org/10.2478/s11756-019-00261-8).
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. & Olsen, Y. (1993).** Nutritional effects of algal addition in first feeding tanks of turbot (*S. maximus*) larvae. *Aquaculture*, **118**, 257-275.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M. & Carnevali, O. (2006).** Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, **32**(2), 167-177. DOI: [10.1007/s10695-006-0009-2](https://doi.org/10.1007/s10695-006-0009-2).
- Silvi, S., Nardi, M., Sulpizio, R., Orpianesi, C., Caggiano, M., Carnevali, O. & Cresci, A. (2008).** Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the well-being of European sea bass. *Microbiol Ecology in Health and Disease*, **20**(1), 53-59. DOI: [10.1080/08910600701876020](https://doi.org/10.1080/08910600701876020).
- Sutthi, N., Thaimuangphol, W., Rodmongkoldee, M., Leelapatra, W. & Panase, P. (2018).** Growth performances, survival rate, and biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in water treated with probiotic. *Comparative Clinical Pathology*, **27**(3), 597-603. DOI: [10.1007/s00580-017-2633-x](https://doi.org/10.1007/s00580-017-2633-x).
- Tovar-Ramirez, D., Infante, Z.J., Cahu, C., Gatesoupe, F.J. & Vazquez-Juarez, R. (2004).** Influence of dietary live yeast on European sea bass larval development. *Aquaculture*, **234**, 415-427. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2004.01.028](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028).
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Khanongnuch, C., Kanpiengjai, A., Unban, K. & Srichaiyo, S. (2018).** Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, **491**, 94-100. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2018.03.019](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.019).
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O. & Múzquiz, J.L. (2008).** Protection of rainbow trout from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **31**, 337-345. DOI: [10.1016/j.cimid.2007.04.002](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.04.002).
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M. & Novoa, B. (2010).** *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot larvae: administration pathways. *Aquaculture*, **307**(1-2), 83-88. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.07.004](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.004).



## Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularında Görülen Gaz Kabarcığı Hastalığı ve Tedavisi Üzerine Bir Araştırma

Fikri BALTA<sup>1\*</sup> Zeynep DENGİZ BALTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su ürünleri Yetiştiriciliği Böl. Hastalık ABD/RİZE

<sup>2</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı /RİZE

Geliş/Received: 20.03.2020

Kabul/Accepted: 27.03.2020

Atıf yapmak için: Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2020). Juvenil Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) görülen Gaz Kabarcığı Hastalığı ve Tedavisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(1), 100-105.

How to cite: Balta, F. & Dengiz Balta, Z.. (2020). Gas Bubble Disease and Treatment Observed in Juvenile Rainbow Trouts (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 100-105.

\* <https://orcid.org/0000-0002-1823-5823>

<https://orcid.org/0000-0002-7795-828X>

**\*Sorumlu yazarın:**

Fikri BALTA  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri  
Fakültesi, Zihni Deri.n Yerleşkesi, Fener Mah. 53100  
/ Rize, Türkiye.  
✉: [fikri.balta@erdogan.edu.tr](mailto:fikri.balta@erdogan.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (532) 427 64 89

**Öz:** Doğu Karadeniz Bölgesindeki 12 farklı gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kuluçkahanesindeki yavru balıklarda gaz kabarcığı hastalığı vakasına rastlanıldı. Yapılan araştırma sonuçlarına göre balıkların sularının yüksek ve uzak bir yerden kapalı boru içinde geldiği tespit edildi. Suyun boruyu tam olarak doldurmadığı ve direkt balık havuzlarına akıtıldığı belirlendi. Yavru balıkların bulunduğu havuzlarda çözünmüş oksijen (O<sub>2</sub>) miktarı 12,6-14,5 mg/l olduğu, saturasyonu %115,2-130,5 ve su sıcaklığı 8,2-9,7°C olarak ölçüldü. Sudaki erimiş gazlar uçurularak gaz saturasyonunun %100'ün altına düşürülmesi sağlandı ve gaz kabarcığı problemi çözüldü. Süpersaturasyon vakalarında, sudaki çözünmüş gaz giderildiğinde gökkuşığı alabalık yavrularında %10-30 aralığında bir ölüm meydana geldiği tespit edildi. Suyun süpersaturasyon durumu çözülmediği takdirde ise ölüm oranı %100'e yaklaştığı görüldü.

**Anahtar kelimeler:** Gaz doygunluğu, gaz kabarcığı hastalığı, kuluçkahane yönetimi, *Oncorhynchus mykiss*.

## A Study on Gas Bubble Disease and Treatment Observed in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry

**Abstract:** Gas bubble disease was observed in juvenile fish in 12 different rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatcheries in the Eastern Black Sea Region. According to the results of the research, it was determined that the waters of the fish came from a high and remote place in a closed pipe. And also, result of the study showed that the water in the pipe was not filling up the pipe and was observed the water was drained directly in the fish pond from the pipe. Dissolved oxygen, oxygen saturation and water temperature values in fry fish pond were determined as 12.6-14.5 mg/l, 115.2-130.5% and 8.2-9.7°C respectively. Molten gases in the water were blown away, allowing the gas saturation to fall below 100%, and the gas bubble problem was solved. As a result, the gas bubble problem was solved. In the cases of supersaturation, it was found that when the dissolved gas in the water was removed, a death of 10-30% occurred in rainbow trout fry. If the supersaturation status of the water is not resolved, the mortality rate has reached 100% in rainbow trout fry.

**Keywords:** Gas bubble disease, gas saturation, hatchery management, *Oncorhynchus mykiss*.

## GİRİŞ

Gaz kabarcığı hastalığı balıklarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olan ve sudaki toplam çözünmüş gazın aşırı doymuş seviyeleri tarafından oluşturulduğu çeşitli literatürde bildirilmektedir. Doğal ve kültür balıklarında bu

hastalıkla ilişkili bozukluklara ait çok sayıda yayın bulunduğu rapor edilmiştir (Grahn vd., 2007; Weitkamp & Katz, 1980). Aşırı doymuş kuyu veya kaynak suyunun kullanıldığı bazı kuluçkahanelerde yüksek azot basınçları

gaz kabarcığı hastalığına neden olmasının yanı sıra, atmosferik hava ile havalandırmanın da ciddi aşırı gaz doygunluğuna neden olabileceği de bildirilmiştir (Colt & Westers, 1986). Çin'de üç büyük baraj türbinlerinden dökülen suyun süpersature (%120-%140) olması nedeni ile doğal ortamlardaki mersin balıklarında ölüm meydana geldiği rapor edilmiştir (Liu vd., 2019). Çinde yukarı Yangtze nehri üzerinde inşa edilen yüksek barajlarındaki türbin deşarjı tarafından çıkış suyunun aşırı süpersature olduğu ve balıklarda gaz kabarcığı hastalığının oluşmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2015) Ayrıca, yüksek barajlardan dökülen suyun deşarjının süper doygunluğu (%140-150) nedeni ile balıkların gaz kabarcığı hastalığından kolayca etkilendiği bildirilmiştir (Shen vd., 2019). Balıklardaki lezyonlar kan damarları ve dokuların içinde gaz baloncuklarının birikimi ile şekillenmektedir. Hastalığın nedeni genellikle kaynak/yer altı suyunda özellikle azotun artan kısmı bir basıncı, oksijen ya da azot gazının aşırı doygunluğu hastalığa neden olduğu, ancak, toplam çözünmüş gazın bireysel gazlardan veya değişen gaz kombine oranından daha önemli olduğu rapor edilmiştir. Suda solunum yapan balığın kandaki gaz basıncı sudaki gaz basıncı ile aynı seviyededir. Eğer bu basınç oksijenin çok kullanılmasından dolayı düşmüşse ve suyun sıcaklığında düşme varsa ya da içindeki gaz miktarı düşük olan yeni bir su eklenmişse bu durumda kanda erimiş sıvı halinde bulunan azot gazı gaz formuna dönüşerek kan damarlarında kabarcıkların oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Balıklar çözünmüş oksijeni %300'e kadar dayanabilmesine karşın, aşırı doyma nitrojen kaynaklı olduğunda ciddi ve ağır problemlere sebep olduğu bildirilmektedir (Pennell & Mclean, 1996; Timur & Timur, 2003). Hastalığa amfibiler ve sucul omurgasızlar yanı sıra bütün balık türlerin duyarlı olduğu, balık türlerinde ve yaş gruplarında hassasiyet farklı olduğu; yavrular serbest yüzene kadar çok hassas olduğu bildirilmektedir. Hastalık toplam gaz basıncı yaklaşık %103 olduğunda kronik form ve %110-115 üzerinde akut form meydana geldiği rapor edilmiştir. Kronik formda, özellikle yavru balıkların semptom göstermeksizin yavaş yavaş öldüğü ve ölümün %5 seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Akut formun klinik semptomları; oryantasyon (uyum) bozukluğu, deri altı amfizem, emboli, çoğunlukla sadece tek taraflı ekzofthalmus, deride kararma olan balıkların su yüzeyine yakın yüzdüğü, kanamalar ve %100 ulaşan yüksek ölüm meydana geldiği rapor edilmiştir. Toplam gaz basıncındaki artışa paralel olarak balık kayıpların da arttığı ve bazı bateriyel hastalıklarda olduğu gibi büyük ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Balta & Dengiz Balta, 2019). Kronik formdaki ölümler, genellikle, amfiyatöz dokunun sekonder enfeksiyonları tarafından artış gösterdiği bildirilmiştir. Teknik işlemler, örneğin; su pompalama, su ısıtma veya ılık su ile soğuk suyu karıştırma toplam gaz basıncının artmasına

neden olduğu bildirilmektedir. Gaz kabarcığı hastalığının ana sebebi nitrojen (N<sub>2</sub>) olmakla birlikte karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve nadiren bazı gazlar (argon) daha az önemli olduğu rapor edilmektedir. Çözünmüş oksijen (DO) konsantrasyon, akan suyun derecesine ve oksijen çözünürlüğüne bağlı olduğu rapor edilmiştir. Oksijen çözünürlüğü sıcaklık ve tuzlulukla azalırken barometrik basınçla arttığı bildirilmektedir (Colt, 1984; Hitchman, 1978). Deniz seviyesinde (BP = 760 mm Hg) 10°C'de tatlı suda atmosfer basıncı ile dengede (%100 doygunluk) 11,3 mg/l bir oksijen konsantrasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir. Eğer doygunluk %95 ise bu durumda oksijen  $0,95 \times 11,3 = 10,7$  mg/l olarak hesaplanırken, eğer doygunluk %15,0 ise bu durumda da  $1,5 \times 11,3 = 17,0$  mg/l olarak hesaplandığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, gaz kabarcığı hastalığına neden olan suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri klasik yöntem ve oksijen metre ile ölçülerek belirlenmiştir. Sulardaki süpersaturasyonun önlenmesi için çeşitli yöntemlere başvurulmuştur. Kaynak suyunun su geliş sisteminde değişiklikler yapılarak toplam gaz doygunluğunun %100'ün altına düşürdüğünde hastalık semptomlarının ortadan kalktığı, ölümlerin yavaş yavaş azaldığı ve balıkların normal davranışlarına geri döndüğü tespit edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

**Materyal:** Bu çalışma, 1999-2018 yılları arasında Doğu Karadeniz bölgesindeki 4 farklı ildeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinden Fakültemiz laboratuvarına getirilen yavru balıklarda gaz kabarcığı hastalık semptomları tespit edildi. Trabzon (5), Rize (5), Artvin (1) ve Gümüşhane (1) olmak üzere toplam 12 değişik çiftliklerde hastalık vakasına rastlanıldı. Özellikle, kış ve bahar aylarında gökkuşağı alabalık çiftliklerinin kuluçkahanelerdeki yavru havuzlarında yumurta kesesini yeni bitirmiş (0,2-0,3 g) ve yavru balıklarda (1-2 g) şiddetli ölümlere rastlanıldı.

**Metot:** Gaz kabarcığı hastalık belirtileri gösteren çiftliklerin su kaynakları ve yavru balıklar yerinde incelendi. Kaynak suyunu balık çiftliklerine kapalı borularla yüksek ve uzak mesafelerden getirildiği görüldü. Kuluçkahaneye akıtılan kaynak sularından su örnekleri alınarak laboratuvara getirildi ve klasik yöntemlerle kimyasal analizleri yapıldı. Kaynak suyunun sıcaklığı, pH'sı, serbest oksijen seviyesi, oksijen doygunluğu ve basıncı (hektopaskal=hpa) oksijen metre (Hach HQ40d multi) ile yerinde ölçüdü (Şekil 1). Kuluçkahanelere gelen kaynak suyunun mesafesi, getiriliş şekli ve boru çapları özellikleri incelendi.

**Balıkların muayenesi:** Balık çiftliklerindeki yavru tanklarındaki balıkların sırt üstü dönmüş ve karında gaz kabarcığı semptomu gösteren balıklarından 10'ar adet balık alındı (Şekil 2). Solungaç lamelleri mikroskop altında gaz yönünden muayene edildi. Balıkların bağırsak içerinden

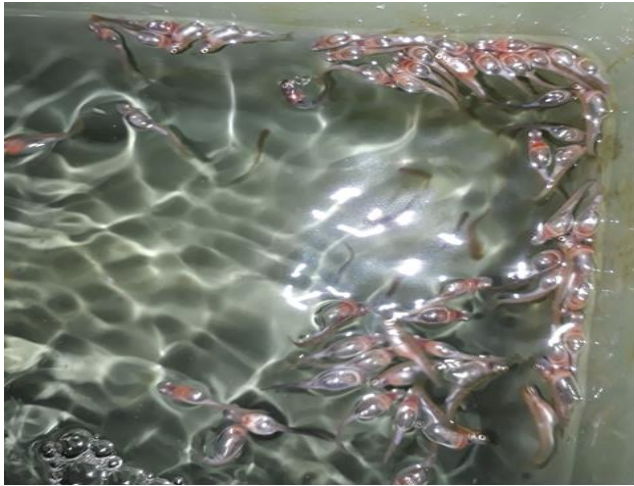


alınan dışkı örnekleri, solungaç lamellerinden ve deri yüzeyinden alınan kazıntı örnekleri parazit yönünden mikroskopik muayenesi yapıldı. Hastalıklı balıkların böbrek ve dalaklarından Triptik Soy Agar (TSA)'a, Triptik Soy Broth (TSB)'a ve Anacker Ordal Agar (AOA) ve Anacker Ordal Broth'a ekimler yapıldı. Besi yerleri soğutmalı etüvde  $20\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı.



Şekil 1. Oksijen metre (Hach Lange HQ40d multimetre) ile havuz girişinde kaynak suyunun ölçüm sonuçları.

Figure 1. Measurement results of spring water at the pool entrance with oxygen meter (Hach Lange HQ40d multimeter).



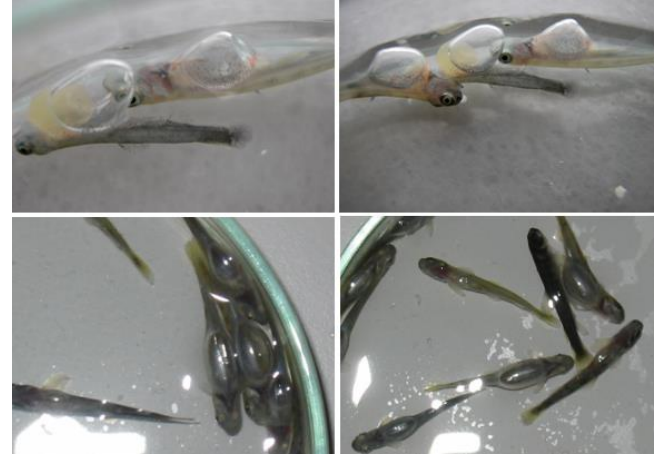
Şekil 1. Fiberglass tanklarda gaz kabarcığı hastalık semptomları gösteren yavru balıkların görünümü (Orijinal).

Figure 1. The appearance of juvenile fish showing symptoms of gas bubbles disease in fiberglass tanks (Original).

## BULGULAR

**Hastalık Semptomları:** Balık çiftliklerinin kuluçkahanelerindeki havuzlarda, yavru balıklarının su yüzeyinde sırt üstü ters bir şekilde durdukları, karın altı şişkin olduğu, yavru balıkların yem almadığı ve balık ölümlerinin olduğu tespit edildi. Gökkuşluğu alabalık yavrularında hastalık vakarlarında yapılan ilk muayenelerde kuluçka havuzlarındaki yavru balıkların su yüzeyinde sırt üstü dönmüş bir şekilde su yüzeyinde bir araya toplandığı, halsiz oldukları, yem alamadıkları ve balıklara yaklaşıncaya su dibine kaçamadıkları gözlemlendi. Yem kesesini yeni bitirmiş veya 1-2 g'lık yavru balıkların karın altındaki derinin gazla dolu şeffaf balon şeklinde şişkin olduğu gözlemlendi. Balıkların bazılarında renkte kararırma belirlendi.

Hasta balıklara ait resimler Şekil 2'de verildi. Tanklardaki balıklarda morbitidenin %100 olduğu görüldü. Yavru ölümlerin gün geçtikçe arttığı ve saturasyonun düzeltilmediği takdirde ölümlerin %100 yaklaştığı tespit edildi.



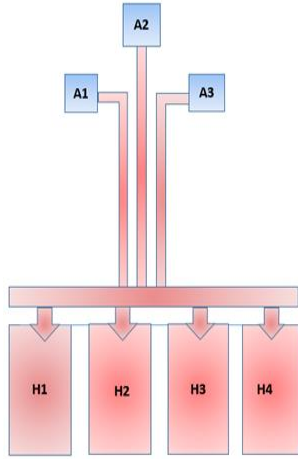
Şekil 2. Gaz kabarcığı hastalık semptomları gösteren yavru balıkların görünümü (Orijinal).

Figure 1. The appearance of juvenile fish with symptoms of gas bubbles disease (Original).

**Suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri:** Karadeniz bölgesindeki balık çiftlikleri genellikle engebeli ve dik arazilere kurulmuş olması ve kaynak sularından uzak mesafelerden getirilmesi, kaynak suyunun gözesi ile kuluçkahane arasında kot farklı bulunduğu belirlendi. Balık çiftliği kuluçkahanelerine gelen kaynak suları genellikle kapalı plastik borularla (50-75 mm çaplı) uzak mesafelerden (0,5 km-5 km) getirildiği, arazinin orman ve zeminin taşlık olması nedeniyle toprağa gömülmediği yapılan incelemelerde tespit edildi. Suyun kuluçkahane seviyesinden çok daha yüksek bir yerden (yaklaşık 30-50 m arasında) geldiği, suyun boruyu tam olarak dolduramadığı ve hava emdiği tespit edildi. Ayrıca, boruların ek yerlerinin iyi yapılandırılmamış olması nedeni ile ek yerlerinden hava aldığı belirlendi. Kaynak sularının tazyikli, beyazımsı ve bazen suyun kesik kesik aktığı görüldü. Bazı üreticilerin  $10^\circ\text{C}$ 'deki kaynak suyunun yetersizliğinde  $4^\circ\text{C}$ 'deki dere suyu ile karıştırdıklarında bu olayın daha şiddetli olduğunu bildirdiler. Üreticilerin bazıları bu durumun kar sularının erimesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bu durumdaki suyun yavru havuzlarına tazyikli olarak beyazımsı renkte aktığı görüldü. Yapılan ölçümlerde suya ait fiziksel ve kimyasal değerler Tablo 1'de verildi. Oksijen metre ile 2 nolu çiftlikte  $9,7^\circ\text{C}$ 'deki su sıcaklığında en düşük saturasyon % 114 ve  $11,72 \text{ mg/l O}_2$  ölçülmesine karşın 9 nolu çiftlikte  $10,9^\circ\text{C}$ 'deki su sıcaklığında en yüksek saturasyon % 195,4 ve  $19,78 \text{ mg/l O}_2$  ölçülerek kayıt edildi ve Tablo 2'de verildi. Uzak mesafelerden gelen kaynak sularına ait geliş şeması Şekil 3'de şematize edildi.

**Balıkların muayenesi:** Gaz kabarcığı belirtisi gösteren yavru balıkların solungaç lamellerinin mikroskop

altındaki muayenesinde gaz kabarcığına rastlanılmadı. Ayrıca, balıkların deri, solungaç kazıntıları ve bağırsak içeriğinin mikroskopik muayenesinde bakteriyel ve paraziter hastalık etkenine rastlanılmadı. Hastalıklı balıkların böbrek ve dalaklarından yapılan ekimler 7 gün süresince takip edildi. TSA, TSB, AOA ve AOB'da herhangi bir bakteriyel etkene rastlanılmadı.



**Şekil 3.** Kaynak suyunun akış şeması (A: Suyun kaynağı, H: Yavru havuzları).

**Figure 3.** Flow chart of spring water (A: Source of water, H: Juvenile pools).

**Tablo 1.** Kaynak suyuna ait fiziksel ve kimyasal özellikler.

**Table 1.** Physical and chemical properties of spring water.

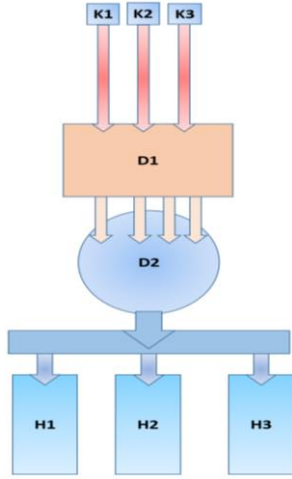
Kaynak suyuna ait parametreler	Gaz kabarcığı hastalığı vakası tespit edilen çiftlikler											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mesafe (km)	2,5	1,3	1,2	2,8	3,1	3,4	3,2	3,5	3,8	2,7	1,2	2,9
Yükseklik (m)	20	12	13	25	15	13	30	30	40	25	10	17
Sıcaklık (°C)	7,2	7,5	8,2	7,8	8,8	9,5	8,9	9,7	14,4	12	10	20,9
pH	7,15	7,04	7,04	7,07	7,15	7,11	7,05	7,07	7,04	7,10	7,08	7,12
O <sub>2</sub> (mg/l)	9,88	11,6	11,4	11,9	11,85	12,1	11,9	12,2	9,99	10,64	10,96	10,68
CO <sub>3</sub>	0	75	69,5	40,3	61	0	58,2	67,1	68,04	0	0	0
HCO <sub>3</sub>	52,5	46,9	40,2	43,6	45,40	0	0	44,6	0	43,7	50,2	0
CO <sub>2</sub>	1,5	0,6	0,5	1,1	1,2	0	0	1,2	0	0,9	1,3	0,6
Alkalinite	33	42,5	53	32	45,5	48,5	30,6	36,4	46,6	49,1	46,6	38,5
Nitrit (µg/l)	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrat (mg/l)	1,2	0	0	0	0,8	0	0	0	0	0	0	0,4
Amonyak	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca	1,0	1,5	1,9	2,4	1,7	6,8	8,3	12	7,1	2,3	3,9	5,6
Mg	1,4	2,0	2,3	3,4	2,3	3,9	4,2	3,8	4,8	3,1	2,5	3,3
OH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam sertlik	23	14	20	23	34	23	14	26	30	36	28	18

**Tablo 2.** Hastalık vakası çıkan çiftliklerde yavru havuzlarının giriş suyunun oksijen değerleri.

**Table 2.** Oxygen values of the inlet water of juvenile pools in farms with disease cases.

Çiftlikler	Serbest O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> Doymunluğu	Sıcaklık	Basınç
1	14,58 mg/l	% 125	8,9 °C	880 hpa
2	<b>11,72 mg/l</b>	<b>% 114</b>	<b>9,7 °C</b>	886 hpa
3	12,62 mg/l	% 127,1	7,5 °C	865 hpa
4	15,05 mg/l	% 155,6	8,2 °C	930 hpa
5	13,64 mg/l	% 135,4	9,5 °C	945 hpa
6	13,64 mg/l	% 135,4	8,6 °C	956 hpa
7	18,62 mg/l	% 186,8	9,8°C	930 hpa
8	18,01 mg/l	% 180,5	10,6°C	930 hpa
9	<b>19,78 mg/l</b>	<b>% 195,4</b>	<b>10,9°C</b>	930 hpa
10	15,61 mg/l	% 156,1	11,5°C	918 hpa
11	12,90 mg/l	% 118,4	11,9°C	925 hpa
12	13,88 mg/l	% 139,1	9,9°C	969 hpa





**Şekil 4.** Suyun doygunluğunun giderilmesi (K: Kaynak, D: Dinlendirme havuzu, H: Yavru havuzları)

**Figure 4.** The way of saturation removal of water (K: Source, D: Collection pool, H: Juvenil pools).

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Çözünmüş oksijen miktarı sudaki yaşamı sürdürmek için gereklidir. Bazı durumlarda balık refahı için en önemli sınırlayıcı faktörlerden biridir. Suda oksijenin tüketilmesi muhtemelen en sık görülen su kirliliği biçimlerinin genel bir sonucudur. Sudaki oksijen azlığına maruz kalan balıklar yem tüketmezler, su yüzeyine yakın yüzerler, hava için soluklanırlar (sazanlarda), su girişine toplanırlar, uyuşuk, tepkisiz, kaçma ve yakalama kabiliyetlerini kaybederler ve en sonunda boğularak ölürler. Ancak, sudaki çözünmüş fazla oksijen miktarları (aşırı doygunluk) tarafından balıklarda meydana gelen hasara nadiren rastlanılmaktadır. Suyun oksijen doygunluk kritik değeri %250-300 seviyelerinde olduğu bildirilmiştir. Oksijen aşırı doygunluğuna yanıt olarak, etkilenen balıkların solungaçları belirgin şekilde açık kırmızı bir renge ve solungaç lamellerin uçlarının yıpranmış olduğu rapor edilmiştir. Bu durumdaki balıkların sekonder mantar enfeksiyonlarından muzdarip oldukları ve bazılarının da öldüğü bildirilmiştir (Svobodova vd., 1993).

Suudi Arabistan'daki bir araştırmada dört farklı balık çiftliğinde gaz kabarcığı hastalığı salgınının görüldüğü, tüm vakalarda toplam su gazı basıncı %111,2 ve %113,4 arasında değiştiği, oksijen normal değerlerde iken azot gazının aşırı doymuş olduğu bildirilmiştir. İlk iki vakanın tuzlu suda yetiştirilen 52,5 g'lık tilapia yalar (*Oreochromis spilurus*)'da gerçekleştiği; vakalardan birinde stokun yaklaşık %50'sini etkiledi ve yaklaşık %30'luk bir ölümle sebep olduğu ve ikinci vakada ise popülasyonun yaklaşık %25'ini etkilediği ve %5'nin öldüğü bildirilirken, 3. vakanın acı sudaki (%0,5 tuzluluk) 270 g ağırlığındaki yetişkin tilapia yalar (*Oreochromis niloticus*) arasında salgına neden olduğu ve yaklaşık %40 ölümüne neden olduğu, 4. salgın ise üç aylık 15 g'lık orfoz

(*Epinephelus fuscoguttatus*) balıkları arasında meydana geldiği ve %10'luk ölüm oranı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Kaynak suyunun sıçratılarak veya daha düşük gaz basıncı olan bir su kaynağı kullanarak, gaz basıncını düşürülmesi ile salgınların hafifletildiği bildirilmiştir (Saeed & Al-Thobaiti, 1997). Bu çalışmada, kuluçkahane suyunda süpersaturasyon vakalarında yavru gökkuşacağı alabalıklarda %100'lük morbitide ve saturasyon problemi çözülmediği durumlarda %100'e yakın mortalite görülmesine karşın saturasyonun giderilmesi durumunda %10-30'luk mortalitenin meydana geldiği tespit edildi. Artezyen suyu kullanılarak kültürü yapılan Nil Tilapyası ve Melez Kırmızı Tilapya (*Cichlidae*, *Oreochromis* spp.)'da görülen gaz kabarcığı hastalığında balıkların Ağustos ayında %50'sinin etkilediği ve çoğunun öldüğü, aynı araştırmada tüm balıkların Aralık ayında etkilediği ve hepsi öldüğü rapor edilmiştir (Midilli vd., 2019). Karadeniz Bölgesindeki alabalık üretiminin sürdürülebilirliğini etkileyen süpersaturasyon toplu ölümlere (%80) nedeni ile önemli ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Balta & Dengiz Balta, 2019).

Suyun aşırı doygun hale gelmesinin dört yolunun olduğu bildirilmiştir. (1); Su, aşırı doygun hale gazın normalde havada bulunandan daha yüksek bir yüzdesini içeren çözünmüş bir gaz karışımından ileri geldiği ve sadece deneysel koşullar altında bu mekanizmanın etkili olduğu için büyük bir önem taşımadığı ileri sürülmüştür. (2); Su, atmosferden daha yüksek bir basınç altında çözünmüş gaz içerdiği ve aşırı doygunluk vakalarının çoğunda bu mekanizmanın etkili olduğu bildirilmiştir. Örneğin; hidroelektrik santrallerin çalışma sisteminde hava enjeksiyonu yoluyla; su ve hava su kanalında karıştırılır ve kanal sistemi ile çıkışa taşındığı bildirilmiştir. Balık çiftliklerinde yeraltı suyu kullanımından veya suyun pompalanmasından da kaynaklandığı belirtilmiştir. (3); Su, ortam sıcaklığından daha düşük bir sıcaklıkta çözünmüş gaz içerdiği durumlarda aşırı doygun hale geldiği ileri sürülmüştür. Su balık kültürü için ısıtıldığında, enerji üreten tesislerde ve doğal suların jeotermal ısıtılmasında suyun soğutulması sırasında aşırı doygunluğa neden olur, çünkü artan su sıcaklığı ile gazların çözünürlüğü azaldığı bildirilmiştir. Sudaki konsantrasyonları belirli bir sıcaklıktaki çözünürlüklerinden daha yüksekse, suyun ısıtılması gazların salınmasına neden olduğu bildirilmiştir. (4); Farklı sıcaklıklarda iki doymuş su kütlesi karıştırıldığında aşırı doygunluğa neden olabileceği, fakat çoğu zaman gaz kabarcığı hastalığının meydana gelmesine neden olacak kadar yüksek seviyelerde doygunluk üretmediği rapor edilmiştir (Lindroth, 1957). Büyük miktarda su kullanan kapalı akan sitemlerde, su bir yoğunlaşmış sütun (dar helozonik sütunlar) gaz giderici kullanarak aşırı gazların çıkartılabildiği rapor edilmiştir. Pasif gaz gidericilerin gaz konsantrasyonunu %100'e

indirmek için kullanıldığı, fakat vakumlu gaz giderme sistemlerinin daha büyük bir güven sınırı sağladığı bildirilmiştir (Colt, 1986).

Gaz kabarcığı hastalığının tedavisinde ilk yapılması gerekli işlemin su kaynağındaki aşırı gazın elimine (uzaklaştırılması) edilmesi gerektiği ve süpersature olan suyun direkt yavru balık havuzlarına verilmesi engellenmiştir. Bu amaçla, suyun girişindeki borunun hava yapmayacak boyutlarda olması sağlanmıştır. Süpersature olmuş su bir engele çarptırılarak birinci depoya akışı sağlanmış ve havuzun üzerine hava bacaları yerleştirilerek gazın dışarı atılması sağlanmıştır. Bu havuzdaki suyu 2. depoya aktarırken kanal sistemine suyun gazını uzaklaştırmaya yardımcı olmak amacıyla kanal içine taş engeller konulmuş, kanalın üzeri kapatılmış ve kanal boyunca gaz bacaları bırakılmıştır. Başka bir çiftlikte uzak mesafeden getirilen ve hava emerek süpersature olan su önce bir fiberglas tanka çarptırılarak veya fıskiye tarzında dökülerek gazın çıkarılması sağlanmıştır. Birinci dinlenme tankından suyun taşarak akması ve su akışının altına tahta yerleştirilerek suyun dağılarak içindeki gazın uçurulması amaçlanmıştır. Böylece, sudaki gazın uzaklaştırılması ve 2. depodaki suyun saturasyonunun %100 altına düşürülmesi sağlandıktan sonra yavru tanklarına su verildiğinde birkaç gün sonra problemin çözüldüğü tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonuçlarına göre kaynak sularının fiziko-kimyasal analiz sonuçları, balık çiftliğine sağlanan suyun çok iyi kalitede olduğunu göstermiştir. Kaynak suyu analizlerinde amonyağın olmaması ve çok düşük konsantrasyonlarda, nitratlar, nitritler, klorürler ve toplam fosfor değerleri (veya sınırının altındaki miktarlarda) ile birlikte, kanalizasyon veya tarımsal atık suları ile kontaminasyonun olmadığını da göstermektedir. Sürdürülebilir üretim için üreticilerin iyi bir gözlemci olmaları ve süpersature olan suyun zamanında tespit etmeleri gerekmektedir. Gökkuşluğu alabalığı yavrularına süpersature olan suyun direkt verilmemesi, su değerlerinin mutlaka saturasyon yönünden ölçülmesi ve sudaki erimiş gazların uçurulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2019).** The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, **4**(1), 27-33. DOI: [10.35229/jaes.527258](https://doi.org/10.35229/jaes.527258)
- Colt, J. & Westers, H. (1982).** Production of gas supersaturation by aeration. *Transaction of the American Fisheries Society*, **111**(3), 342-360.
- Colt, J. (1984).** *Computation of dissolved gas concentration in water as functions of temperature, salinity and pressure.* American Fisheries Society, Special publication no: 14, 154p.
- Colt, J. (1986).** Gas supersaturation-impact on the design and operation of aquatic systems. *Aquacultural Engineering*, **5**, 49-85. DOI: [10.1016/0144-8609\(86\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0144-8609(86)90005-1).
- Edsall, D.A. & Smith, C.E. (1991).** Oxygen-induced gas bubble disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. **22**(2), 135-140. DOI: [10.1111/j.1365-2109.1991.tb00503.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1991.tb00503.x).
- Grah, B.H., Sangste, C., Breaux, C., Stephe, C. & Sandmeyer, L. (2007).** Case report: Clinical and pathologic manifestations of gas bubble disease in captive fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, **16**(2), 104-112. DOI: [10.1053/j.jepm.2007.03.008](https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.03.008).
- Hitchman, M.L. (1978).** *Measurement of dissolved oxygen.* Wiley interscience; New York NY 255p.
- Lindroth, A. (1957).** Abiogenic gas supersaturation of river water. *Archiv fur Hydrobiologie*, **53**, 589-597.
- Liu, X., Li, N., Feng, C., Fu, C., Gong, Q., Lai, Ji., Jiang, Z., Yang, Y. & Shi, H. (2019).** Lethal effect of total dissolved gas-supersaturated water with suspended sediment on river sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Scientific Reports*. **9**, 13373. DOI: [10.1038/s41598-019-49800-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-49800-y).
- Midilli, S., Çoban, D., Güler, M. & Küçük, S. (2019).** Kültür koşullarında Nil Tilapyası ve Melez Kırmızı Tilapya (*Cichlidae, Oreochromis spp.*)'da görülen gaz kabarcığı hastalığı. *Su Ürünleri Dergisi*, **36**(3), 285-291. DOI: [10.12714/egejfas.2019.36.3.09](https://doi.org/10.12714/egejfas.2019.36.3.09).
- Pennell, W. & McLean, W. E. (1996).** Early rearing. *In principles of salmonid culture*, vol. 29 (eds. William, P. and Barton, B. A.), 365-465 pp. The Netherlands, Amsterdam, Elsevier.
- Saeed, M. & al-Thobaiti, S.A. (1997).** Gas bubble disease in farmed fish in Saudi Arabia. *Vet. Res.*, **140**(26), 682-684. DOI: [10.1136/vr.140.26.682](https://doi.org/10.1136/vr.140.26.682).
- Shen, X., Li, R., Hodges, B.R., Feng, J., Cai, H. & Ma, X. (2019).** Experiment and simulation of supersaturated total dissolved gas dissipation: Focus on the effect of confluence types. *Water Research*, **155**, 320-332. DOI: [10.1016/j.watres.2019.02.056](https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.056).
- Svobodova, Z., Lloyd, R., Machova, J. & Vykusova, B. (1993).** *Water quality and fish health* (No. 35). EIFAC, Rome. 59pp.
- Timur, G. & Timmur, M. (2003).** *Balık hastalıkları.* İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:5, Dilek Ofset, İstanbul, 588s.
- Wang, Y., Li, K., Li, J., Li, R. & Deng, Y. (2015).** Tolerance and avoidance characteristics of Prenant's Schizothoracin *Schizothorax prenanti* to total dissolved gas supersaturated water. *North American Journal of Fisheries Management* **35**(4), 827-834. DOI: [10.1080/02755947.2015.1052160](https://doi.org/10.1080/02755947.2015.1052160).
- Weitkamp, D.E. & Katz, M. (1980).** A Review of Dissolved Gas Supersaturation Literature. *Transactions of the American Fisheries Society*, **109**, 659-70.



## Lepistes Balıklarında Bazı Herbisitlerin Akut Toksik Etkisinin Araştırılması [\*]

Bülent VEREP\* Huri YILDIRIM

RTEÜ Su Ürünleri Fakültesi Zihni Derin Yerleşkesi, 53100, Rize-TÜRKİYE

Geliş/Received: 23.03.2020

Kabul/Accepted: 27.03.2020

Atıf yapmak için: Verep, B. & Yıldırım, H. (2020). Lepistes Balıklarında Bazı Herbisitlerin Akut Toksik Etkisinin Araştırılması. *Anadolu Çev. ve Hayv. Dergisi*, 5(1), 106-114.

How to cite: Verep, B. & Yıldırım, H. (2020). A Research on Acute Toxic Effects of Some Herbicides on Guppies. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(1), 106-114.

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4238-8325>

\*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3973-1682>

\*Sorumlu yazarın:

Bülent VEREP

RTEÜ Su Ürünleri Fakültesi Zihni Derin Yerleşkesi, 53100, Rize-Türkiye.

✉: [bulent.verep@erdogan.edu.tr](mailto:bulent.verep@erdogan.edu.tr)

Cep telefonu : +90 (533) 453 68 42

Telefon : +90 (464) 223 33 85

Faks : 90 (464) 223 41 18

**Öz:** Bu çalışmada, tarımsal uygulamalarda kullanılmakta olan bazı herbisitlerin Lepistes (*Poecilia reticulata*) balıkları üzerindeki akut toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullandığımız herbisitler özellikle fındık ve çay üretimi gibi zirai tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Denemelerde üç farklı herbisit (Glifosat, 2,4- Diklorofenoksiasetik Asit ve Asetoklor) kullanılmıştır. Biyodenedelerde biri kontrol olmak üzere beş ayrı akvaryum kullanılarak her birine belirli konsantrasyonlarda herbisit eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında glifosat, 2,4-D ve asetoklor'un lepistes (*Poecilia reticulata*) balıkları üzerinde akut toksik etkileri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen çalışmada statik yöntem kullanılmıştır. Lepistes balığının glifosat, 2,4-D ve asetoklor'a karşı 24, 48, 72 ve 96 saat aralıklarında letal konsantrasyon (LC<sub>50</sub>) değerleri sırasıyla 7,051; 1,201 ve 0,557 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre lepistes balığı açısından çalışılan herbisitlerin akut toksik sıralaması asetoklor > 2,4-D > glifosat olduğu söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** 2,4-D, Asetoklor, glifosat, lepistes, pestisid.

## A Research on Acute Toxic Effects of Some Herbicides on Guppies

\*Corresponding author's:

Bülent VEREP

Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Fisheries, Zihni Derin Campus, 53100, Rize, Turkey.

✉: [bulent.verep@erdogan.edu.tr](mailto:bulent.verep@erdogan.edu.tr)

Mobile telephone : +90 (533) 453 68 42

Telephone : +90 (464) 223 33 85

Fax : 90 (464) 223 41 18

**Abstract:** Acute toxic effects of some herbicides used in agricultural applications on guppy fish (*Poecilia reticulata*) were investigated. The herbicides we use in the study are widely used in industrial agriculture, especially hazelnut and tea farming. Three different herbicides (Glyphosate, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Acetochlor) were used in the experiments. In bioassays, five different aquariums, one of which is a control, were added to each of them with certain concentrations of herbicides. Static method was used in the study conducted to determine the acute toxic effects of Glyphosate, 2,4-D and acetochlor on guppies (*Poecilia reticulata*) at certain time intervals. Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values of guppy fish against Glyphosate, 2,4-D and acetochlor at intervals of 24, 48, 72 and 96 hours were calculated as 7.051; 1.201 and 0.557 mg/L respectively. According to these results, it can be said that the acute toxic order of herbicides studied in terms of guppy fish is acetochlor > 2,4-D > Glyphosate.

**Keywords:** 2,4-D, Acetochlor, glyphosate, guppy, pesticide.

## GİRİŞ

Son yıllarda ülkesel ve bölgesel çapta ilerleyen kalkınma hamlesi nüfus artışı ve yoğunluğuyla birlikte gıda ihtiyacının karşılanması tarımsal üretimin artırılmasını ve çeşitlendirilmesini zorunlu kılmıştır. Tarımsal üretimin artırılması ve çeşitlendirilmesi kapsamında tarım ürünlerine zarar veren çok çeşitli tür ve özellikle zararlılara karşı mücadelede en kolay yol olan kimyasal mücadele olarak

pestisitler tercih edilmektedir. Diğer taraftan halk sağlığı konularında şehirleşmeyle birlikte ortaya çıkan çevresel problemlerin çözümünde haşereyle mücadele kapsamında ev/işyeri/sokak vb. alanların ilaçlanmasında yine önemli ölçüde sentetik kimyasallar olan pestisitler tercih edilmektedir.

[\*] ,Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.

Çevresel hassasiyetin artmaya başlamasıyla çevre dostu ürünlerin kullanımını gündeme gelmişse bile ucuz, kolay ve geleneksel bir yöntem olması sebebiyle pestisitler günümüzde önemli miktarda kullanılmakta, atmosfer ve su kaynakları yoluyla göl ve denizlere karışmaktadır. Su kaynaklarına bulaşan pestisitlerin canlı bünyesinde akümülyasyona uğraması ve akabinde ise besin zincirine karışarak biyomagnifikasyonla üst besin seviyelerinde konsantrasyonunun artması önemli bir su kirliliği problemi olarak sucül ekosistemleri ve dolayısıyla insanları tehdit etmektedir.

Pestisitler çevresel etkilerin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Başta insanlar olmak üzere çevreyi geliştirme amacı ile oluşturduğumuz birçok yenilik aslında çevreyi olumsuz etkilemektedir. Buna benzer sebeplerden dolayı oluşturduğumuz olumsuz etkiyi önlemek amacı ile kimyasallar oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kimyasallara genel kapsamlı olarak pestisit denilmektedir. Pestisitler kullanım alanına göre sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. Pestisitlerin kullanım alanlarının başında tarımsal üretim buna bağlı olarak da bahçecilik gelmektedir. Pestisitlerin kullanıldığı diğer önemli alanlardan biri de balık yetiştiriciliğidir. Bunun sebebi bilindiği gibi sudaki mikroorganizmalardır (Anonim, 2012).

Su ortamında çözülmeyen klorlu pestisitler organizmaların yağlı dokularında birikirler ve bu birikim beslenme ile su ortamındaki tek hücreli canlılardan başlayarak balık ve insanlara kadar ulaşır. İnsanın hem bitkisel hem de hayvansal gıdalarla besleniyor olması ve besin zincirinin en son halkasını oluşturuyor olmasından dolayı bu tür bileşikler insanda büyük bir yoğunluk kazanır.

Diğer kullanım alanları ise; ormancılık, şehir düzenleme (park, bahçe ve oyun alanları), endüstriyel böcek kontrolü, inşaatlarda, ev ve bahçeler, deniz ve sucül böcek kontrolü, gıda saklanması, hayvancılık, toplum hijyeni, böcek kontrolü ve beşeri ilaç olarak kullanılmaktadır (Anonim, 2012). Genellikle zirai amaçlı kullanılan pestisitler genel anlamda zararlı böceklerin ürünlere vermiş olduğu zararı en aza indirmek içindir. Pestisitlerin toksik etkisi bulunduğu için kullanılmaktadır. Öldürücü etkiye sahip olan bu pestisitler hemen hemen tüm doğal çevre etkilenir. Pestisitler sadece böceklerle karşı değil görünmeyen mikroorganizmalara, yabancı otlara ve diğer hayvan türlerine karşı da kullanılır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Bitkilerin yetiştirildiği tüm zirai alanlarda yabancı otlar sorun teşkil etmektedir. Bu yabancı otlardan kurtulmanın en uygun pratik yöntemi kimyasal mücadeledir. Kimyasal ilaçlama her ne kadar iyi bir yöntemmiş gibi bilirse de zararlı etkilere sahiptir. Zararlı etkilerin en başında hedef dışı bitkiler gelmektedir. Diğer bir zarar ise kimyasalların toprağa karışması ve su ile birlikte canlılara etki etmesidir. Herbisitlerin toprakta kalma ve suda

çözünürlük süreleri zarar ve yararları açısından önemlidir. Bitki yüzeyine uygulanan herbisitlerin bir kısmı yaprakтан alınırken yere düşen ilacın bir kısmı da kökler tarafından alınabilmektedir. Bu durum yabancı otlar açısından yararlı olsa da bir sonraki sezona kadar toprakta kalabileceğinden dolayı hassas ürün hasatın da fitotoksisteye sebep olabilmektedir (Delen, 1990).

Glifosat İzopropilamin tuzu ülkemizin zirai mücadele ilaçları satan marketlerinde Roundup, Fullot, Glifosat, Glycol, Glysa vb. ticari markalar adı altında ve sıvı formda 480 g/L konsantrasyonda pazarlanmaktadır. Glifosat'ın çıkış sonrası kullanılması ile beraber turunçgil, fındık, bağ ve meyve bahçelerinde ruhsatlıdır. Tek yıllık yabancı otlar için uygulama dozu 300 ml/da iken çok yıllık yabancı otlarda ise 600 ml/da şeklindedir. Glifosat selektif ve rezidüel etkisi olmayan çıkış şeklinde iki türlü etki gösterir. Bunlarla birlikte ekili olmayan alanlarda 300 ml/da konsantrasyonda tek yıllık yabancı otların daha genç ve aktif olarak büyüdüğü devrede kullanılır. Bu yabancı otlar; yabancı yulaf, yabancı havuç, Kısır brom, Kuşyemi, Çimensi mürdümük, Ballıbaba, Kanarya otu, Mısır hardalı, Dügün çiçeği, Yabancı fiğ, Turnagagası, Kuş otu, Yabancı hardal, Ebegümece, Yabancı Yonca, Sütleğen, Benekli darıcan, Tilkikuyruğu, Yapışkan ot, Sirken, Horozibiği, Yeşil horozibiği, Semizotu, Kırmızı köklü tilkikuyruğu, Zincir pıtrağı, domuz pıtrağıdır. Turunçgil, Fındık, Bağ, Meyve bahçeleri ve ekili olmayan alanlarda çok yıllık yabancı otlar: Köpekdişi ayrığı, Geliç, Topalak, Tarla sarmaşığı, Isırgan otu, Pelin otu da 600 ml/da yabancı otların aktif olarak büyüdüğü çiçeklenme öncesi devrede kullanılır. Glifosat özellikle yeni yapılmış ve süregelen karayolu, demiryolu kenarları, havaalanları, fabrika bahçeleri, tarla kenarları ve tarihi alanlarda yabancı bitkilere karşı 1000 ml/da aktif büyüme evresinde kullanılır. Bunun yanı sıra 1000-1500 ml/da arasında banketler, su ve drenaj kanallarında yer alan yabancı otlara karşı aktif büyüme evresinde kullanılır (Benbrook, 2016).

Tarımsal ekimlerde verim oldukça önemlidir. Bu nedenle verimi düşüren yabancı otların ortadan kaldırılması için üreticiler tarafından ilaçlama yapılması uygun görülmektedir. Yapılan bu zirai ilaçlamalarda, hemen hemen her tarımcının kullandığı zirai ilaçlar, herbisit adı altında bitki öldürücüler olarak da bilinmektedir. Bitki öldürücü olarak bilinen bu herbisitler; tarımsal üretimde ki yabancı otları öldürmek ve büyümesini engellemek için kullanılan kimyasallara verilen genel addir. Herbisitlerin içine birçok madde dâhil olsa da en çok kullanılan pestisit türü Glifosattır. Glifosat her ne kadar organik ürünlere yasaklansa da zirai ilaçlamada kullanılmaya devam edilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda özellikle son zamanlarda Glifosatın üzerine ağırlık verildiğini göstermektedir. Yayınlanan makale ve dergilerde gündem haline gelen Glifosatın yararından çok zararının olduğunu

öne sürmekle beraber bazı maddelerle etkileşiminin de kanserojen etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bunların en büyük sebebi; tarımcıya insan gücü gerektirmeden daha kolay bir tarım öne sürmek üzere tarım ürünlerine direnç geni aşılmasından kaynaklanmaktadır. GDO'lu ürünler ve Glifosat başlığı adı altında birçok yazıya denk gelmiş olup genel kapsamda bitkiler kadar insanlar ve diğer canlılarda ki hormonal fonksiyonların bozulduğu üzerinde durulmuştur. Bunların yanı sıra Glifosat ile yapılan ilaçlama sonucu suya karışan maddenin etkisi devam ettiği sürece sudaki canlılara da zarar vermektedir (Benbrook, 2016).

Bu herbisit türünde akut toksik etkisi daha çok kas sisteminde görülmektedir. 2,4-D'nin yüksek dozda verilmesi sonucunda canlılarda vücut fonksiyonlarını bozarak ölüme yol açmaktadır. Bu herbisitinin uygulanması sonucunda tek dozda canlıda birkaç saat içerisinde kaslarda kasılma, vücutta istemsiz hareketsizlik, kaslarda zayıflık ve koma görülür. Ayrıca karaciğer ve böbreklerde de rahatsızlık görülür. 2,4-D'nin etkileri insanlarda da aynı sorunlara sebep olmaktadır. Bu herbisitinin akut zehirlenmeleri genellikle ölüme sonuçlanır. 1962-1969 yılları arasında yaşanan Güney Vietnam savaşında bu herbisit ve 2,4, 5-Trichlorophenoxyacetic asit karışımı savaş aracı olarak kullanılarak askerlerin bitkilerin arkasına saklanması engellenmiştir. (Sevim, 2011).

**Literatür Çalışması:** Pestisitlerle ilgili bilimsel literatür incelendiğinde yüzlerce pestisitinin canlılar ve çevre üzerindeki etkilerini inceleyen makale, kitap, dergi ve yayın söz konusudur (Ağar vd., 1991; Güler ve Çobanoğlu, 1997; Atamanalp vd., 2002).

Sucul organizmalar arasında önemli bir yer tutan balıklar biyotestlerde olduğu kadar toksikolojik çalışmalar için de en uygun organizmalardır. Bu amaçla yapılan akut letal toksisite testleri toksik maddenin konsantrasyonunun belirlenmesi yanında toksik etkinin mekanizmasının anlaşılabilmesi için fizyolojik ve histopatolojik çalışmalarla desteklenmesi gerekir (Arellano vd., 1999). Kırletici maddelerin sucul canlılara olan toksik ve histopatolojik etkileri konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Ancak bu canlıların larva, yavru ve ergin gibi değişik hayat dönemlerine pestisitlerin toksik ve histopatolojik etkileri ile ilgili çalışmalar yeterli düzeyde değildir (Westernhagen, 1988).

Kullanılmak üzere 2006-2008 yılları arasında en çok tercih edilip temin edilen pestisitler; ditiyokarbamat pestisitlerine dahil olan mankozep, thiram ve propinebin olduğunu Delen vd. (2010) tarafından belirtmektedirler. Bu gruba dahil olan mankozep, etilen bisditiyokarbamat (EBDC) pestisittir. Bu pestisit bozulmayı önleme ve mantar hastalıklarını tedavi etmede etkili olması nedeniyle geniş spektrumlu fungusit olarak da kullanılmaktadır (EPA, 2009; Ripley vd., 1978). Bisditiyokarbamat (EBDC) pestisitlerin tercih edilmesinde ki en büyük sebep; aynı

semptomları taşıyan hastalıklarda tedavi edici diğer ilaçlardan daha uygun maliyette olmalarıdır. EBDC grubuna ait bu pestisitlerin hidrolizi sonucu Etilen tiyo üre (ETU) oluşmaktadır (Ripley vd., 1978). Ayrıca, ETU'nin farelerde büyümeyi engellediği, tiroid bezinde ağırlık ve boyut artışına neden olduğu ve dokularda hiperplazi oluşturduğu tespit edilmiştir (Seifter ve Ehrlich, 1948).

Leeuwen vd., (1985)'e göre, maneb ve diğer bazı pestisitlerin gökkuşağı alabalıklarının erken hayat dönemlerinin farklı aşamalarına olan etkileri konusunda yaptıkları bir çalışmada, kullanılan bu pestisitlere olan hassasiyetin en fazla balığın yumurta keseli olduğu dönemden sonraki yavru balık döneminde olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca deney süresi boyunca bu maddelerin en fazla balığın yumurta keseli olduğu dönemde biyo-birikim oluşturdukları saptanmıştır. Hayvansal organizmalar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise manebin sinir sistemindeki dopaminerjik sinir hücrelerinde önemli hasarlara sebep olduğu, ayrıca vücudun hücresel antioksidan sistemine zarar vererek canlının savunma sistemini zayıflatığı tespit edilmiştir (Barlow vd., 2005).

Maneb, farelerin merkezi ve çevresel sinir sistemleri üzerinde hasara yol açarak, canlılarda sinirliliğe, uyku süresinde azalmaya ve hareket sisteminde aksamalara sebep olmaktadır (Morato vd., 1989). Maneb, canlılarda DNA replikasyonu ve onarımını etkilemekte, DNA zararı ve kromozom anormallikleri oluşturarak hücrelerde mutasyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca manebin memelilerde üreme sistemini etkilediği, embriyo ve fetüste toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır (Gerber vd., 2002). Oral yolla maneb verilen hamile farelerin ve fetüsün böbreklerinde kontrol grubuna oranla çok yüksek miktarda manganez birikimi olmaktadır. Ayrıca manebin fetüsün böbreklerinde çok sayıda histopatolojik değişikliklere sebep olduğu saptanmıştır (Güven vd., 1998). Benzer bir çalışmada (Deveci, 2006), organometalik fungusitler propineb ve manebin farelerin karaciğer dokularında yağ damlacıkları oluşumu, hepatositlerde ödem ve nekroz gibi önemli histolojik değişimlere neden olduğu, ayrıca organlarda kontrol grubuna oranla çok yüksek miktarda metal birikimi meydana geldiği belirlenmiştir. Manebin farelerin karaciğer ve böbrek dokusu üzerindeki histopatolojik etkilerinin makroskobik ve mikroskobik düzeyde araştırıldığı diğer bir çalışmada da karaciğer ve böbreklerin kontrol grubuna oranla boyutlarının büyük ve renklerinin daha koyu olduğu belirlenmiştir (Özbay vd., 1991).

N-metil karbamat grubu pestisitlerden olan karbarilin sucul canlılar üzerine toksik etkileri konusunda çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen histopatolojik etkileri konusunda dikkate değer bir araştırma yapılmamıştır (Rao vd., 1984). Karbaril ve onun en önemli yıkım ürünü olan 1-naftol'un hint sazı (*Cirrhinus mrigala*) üzerine toksik etkilerini araştırdıkları bir çalışmada 96 saatlik



deneyde balıkların beyin, solungaçlar, böbrek ve kaslarındaki protein metabolizmasının önemli derecede değiştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, karaciğerin glikojen içeriğinde artış olduğunu ve beyinin lipit içeriğinde önemli bir azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Kulshrestha ve Arora (1984) karbaril ve endosülfanın tatlısu balığı olan yılanbaşı (*Channa striatus*) yumurtalıkları üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, pestisit maruz kalan balıkların yumurtalıklarındaki oosit miktarında azalma, boyutlarında küçülme, deformasyon, yumurta kesesinde bozulma, oositlerde tıkanma, kan damarlarında genişleme ve gonadosomatik indekste azalma meydana geldiğini saptamışlardır. Ayrıca, histopatolojik etkilerin pestisit dozu, maruz kalma süresi ve çeşidine göre değiştiğini tespit etmişlerdir (Tablo 8).

Karbarilin teknik ve ticari formülasyonları farklı toksik etki göstermektedir. Bu formülasyonların kedi balığı (*Clarias batrachus*) üzerine akut toksik etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, karbarilin teknik formülasyonunun ticari formülasyona göre 2,5 kat daha fazla toksik olduğu tespit edilmiştir (Sinha vd., 1991).

Tatlısu karidesi (*Palaemonetes pugio*) larvaları kullanılarak yapılan toksikolojik çalışmalarda, 96 saat süreli test sonucunda karbaril için LC<sub>50</sub> değeri alabalıklara nazaran çok daha düşük (43,02 µg/l) bulunmuştur (Key vd., 2008). Kedi balığı öldürücü dozun altında karbarile maruz kaldığında, gonadlarında testis ve yumurtalıklardaki gonadosomatik indekste azalma ve nekrozlar tespit edilmiştir. Ayrıca, yumurta ve sperm oluşumunda durma, yumurtalıklarda foliküller arası ödem ve testislerdeki taban zarlarında kalınlaşma olduğu belirlenmiştir (Jyothi ve Narayan, 1999).

Todd ve Leeuwen (2002), karbarilin dört farklı konsantrasyonunu kullanarak, bu konsantrasyonlara maruz kalan döllenmiş zebra balığı (*Danio rerio*) yumurtalarında oluşan ölüm oranlarını belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda ortalama ölüm oranının düşük olduğunu ve kullanılan konsantrasyonlardaki karbarilin direkt olarak embriyoları öldürmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, aynı çalışmada yumurta ve embriyoların boyutlarının kontrol grubuna göre çok daha küçük olduğu saptanmıştır.

Boran vd. (2007) karbamat grubu pestisitlerden olan karbaril, metiyokarb ve karbosülfanın gökkuşağı alabalıkları ve lepistes balıkları (*Poecilia reticulata*) üzerine akut toksik etkilerini 96 saat süreyle ve statik test yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda karbaril ve metiyokarbin gökkuşağı alabalıkları üzerine toksik etkilerinin lepistes balıklarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak lepistes balıklarının karbosülfan aktif maddesine karşı alabalıklara göre daha hassas oldukları belirlenmiştir. Test edilen balıklardaki ölüm oranlarının, akvaryumlardaki çözeltiler içerisinde bulunan aktif maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak önemli derecede

arttığı saptanmıştır. En düşük karbaril, metiyokarb ve karbosülfan konsantrasyonlarına maruz kalan alabalıkların %50'sinin ölmesi için gereken zaman sırasıyla 51 saat 12 dakika, 74 saat 35 dakika ve 107 saat 57 dakika olarak tespit edilmiştir. İnsektisit konsantrasyonu arttıkça bu sürenin azaldığı görülmüştür (Tablo 9).

Ülkemizde toksik maddelerin suda yaşayan canlılara olan olumsuz etkilerinin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalar daha ziyade bu canlıların dokularındaki pestisit kalıntı miktarlarının tespitine yöneliktir. Özellikle tarımsal mücadelede kullanılan pestisitlerin balıklar üzerinde oluşturduğu toksik etkilere yönelik olarak yapılan toksikolojik çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu nedenle bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak kullanılan pestisitlerden glifosat, 2,4-D ve asetoklor'un Lepistes balıkları üzerine olan toksisitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Materyal:** Bu çalışmada Rize çevresindeki bazı su kaynaklarında pestisid kirliliğinin belirlenmesi yanında bazı pestisidlerin lepistes (*Poecilia reticulata*) balıkları üzerinde akut toksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada pestisid olarak yabancı otlarla mücadelede kullanılan Glifosat, 2,4-D ve Asetoklor gibi herbisidler kullanılmıştır. Karadeniz bölgesinde ve ülkemizin diğer bölgelerinde çay, fındık üretimi yanında buğday, darı, mısır gibi bahçe bitkileri üretiminde yabancı zararlı bitkilerin uzaklaştırılmasında kullanılan bu pestisidlerin sucul canlılar üzerinde toksik oldukları bilinmektedir. Bu çalışmada bölgemizde kullanılan herbisidlerin genel bir test balığı olarak bilinen lepistes (*Poecilia reticulata*) balıkları kullanılacaktır. Böylece çalışmada tarımsal üretimin önemli olduğu Rize çevresinde yoğun olarak kullanılan herbisidlerin bölge koşullarında akut toksik özellikleri ve su kaynaklarında yapılacak pestisid taramasıyla pestisid kirliliği düzeyi hakkında önemli bilgiler edinilecektir. Biyo-denemelerde kullanılan Lepistes balığı ve herbisidler hakkında genel bilgiler Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

**Metod:** Bu proje çalışmasında organik pestisidlerin Rize çevresindeki su kaynaklarındaki durumu, lepistes balıkları (*Poecilia reticulata*) üzerine akut toksik etkisi araştırılmış olup herbisidlerin lepistes balıklarına akut toksik etkisi statik akut toksik deneylerle gerçekleştirilmiştir. Aynı koşullardaki benzer özellikteki çevre koşullarına sahip ancak herbisit içermeyen kontrol akvaryumlarında da her akvaryumda 10 adet olacak şekilde balık bireyi stoklanmıştır. Deney akvaryumları farklı konsantrasyonlarda olmak üzere kronik etki yapabilecek düzeyde 4 farklı konsantrasyon içermektedir. Deney sonuna kadar tüm balıkların canlı kalmasına, deneme boyunca akvaryumlarda herbisit konsantrasyonlarının stabil

kalmasına ve deney süresince gece gündüz periyotlarının ayarlanmasına dikkat edilmiştir. Deneyde kullanılacak balık bireylerinin boylarının homojen fiziksel boyutlarda olmalarına özen gösterilmiştir. Biyo-deneyde akvaryumlarda kullanılan Lepistes balıkları Şekil 2'de gösterilmiş olup çalışmada kullanılan herbisidler ve konsantrasyonları (mg/l) Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan herbisidlerin özellikler.

**Table 2.** Properties of herbicides used in the study.

Özellikler	Herbisidler		
	Glifosat	Amin tuzu	Asetoklor
<b>Kullanılan kimyasal içerik</b>	Herbisit grup G (yabancı ot ilacı)	2,4 D Amin tuzu	Asetoklor
<b>Ticari marka</b>	Süper fullot 48SL	Sahel-2D	Roundup Star
<b>Etken madde</b>	480 gr/L Glifosat izopropilamin tuzu	2,4-diklorofenoksi asetik asit	Prometrin 15% +asetoklor 25
<b>Çözelti durumu</b>	Solüsyon	Çözelti (72% SL, 86% SL)	Çözelti (1.157g/cm <sup>3</sup> )

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan herbisidler ve konsantrasyonları (mg/l).

**Table 3.** Herbicides and their concentrations (mg / l) used in the study.

Herbisid	Kontrol	1	2	3	4	5
<b>Glifosat</b>	0	2	5	10	15	25
<b>2,4-D</b>	0	2	5	10	25	50
<b>Asetoklor</b>	0	0.064	0.125	0.25	0.375	0.50

Çalışmada biyodeneyle sırasında akvaryum koşulları taşınabilir su kalite cihazıyla takip edilmiştir. Akvaryum sularının aşırı kirlenmesi durumunda akvaryum suları değiştirilerek deney ortamı yeniden oluşturulmuştur. Deney ortamlarına dozlama balık eklenmesinden önce gerçekleştirilmiştir. Herbisitlerin lepistes balıkları (*Poecilia reticulata*) üzerinde akut ve kronik toksik konsantrasyonlarının belirlenmesinde akut toksik biyodeneyle sonucunda elde edilen ölü birey sayıları EPA Probit yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Rize çevresi su kaynaklarından (İyidere, Salarha ve Fırtına) alınan su örnekleri de akredite olmuş laboratuvara pestisid analizi için gönderilmiştir. Pestisid analizleri için akredite laboratuvarında GC-MS-MS ve LC-MS metodları kullanılmıştır. Rize ve çevresi su kaynaklarından alınan su örneklerinde GC-MS metoduyla 76 farklı pestisit analizi araştırılmıştır. Araştırmada kullanılacak herbisidler Glifosat, 2,4-D ve Asetoklor etken maddeli pestisidlerdir. Suda ölçülecek pestisid seviyeleri müsaade edilebilir ulusal ve uluslararası standartlara göre değerlendirilecektir.

Akut toksik test yöntemi (LC<sub>50</sub> Deneyi), deneyde kullanılacak balıklar adaptasyon öncesi incelenerek vücutlarının dış yüzeyinde parazit bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir (AFS-FHS, 2003). Daha sonra adaptasyona alınan balıklar, 40 litrelik statik su içeren cam akvaryumlara aktarılmıştır. Pestisitlerin toksik etkilerinin belirleneceği akvaryumlara 10'ar adet balık konulmuştur. Balıkların içerisinde tutulacağı suların nominal pestisit konsantrasyonları, kontrol grubu dahil 6 farklı konsantrasyon olacak şekilde seçilmiştir. Deneylerde kullanılan pestisitler için deneyler üç paralel olacak şekilde

**Tablo 1.** Lepistes balığı hakkında genel bilgiler.

**Table 1.** General information about guppy fish.

Latince Adı	<i>Poecilia reticulata</i>
Türkçe Adı	Lepistes balığı
İngilizce Adı	Guppy fish
Bir deney için kullanılan adet	60 adet

yürütülmüştür. Ayrıca deney süresince meydana gelen balık ölümlerinin kullanılan pestisitler dışında başka faktörlerden olup olmadığını gözlemek amacıyla kontrol grubu oluşturulmuştur.

Deney süresince akvaryumlardaki suların %50'si test çözeltisi içerisindeki pestisit konsantrasyonları değişmeyecek şekilde yenilenmiştir (OECD, 1992). 96 saat devam eden test süresince havalandırılan test sularının çözünmüş oksijen değeri, sıcaklık ve pH'sı günlük olarak; toplam sertlik, alkalinite, amonyak ve nitrit miktarları ise haftalık olarak ölçülmüştür. Deney süresince yapılan gözlemlerde, vücut ve operkulum hareketleri durmuş olan balıklar ölmüş kabul edilmiş ve deney ortamından uzaklaştırılmıştır. Ölen balıkların tespiti için 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerde gözlemler yapılmıştır. Ölü balık sayıları tespit edildikten sonra SPSS Probit Analiz Yöntemi kullanılarak LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen LC<sub>50</sub> değerleri balık ve sucul omurgasızlar için toksisite kategorisi aralıkları kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Balık ve sucul omurgasızlar toksisite kategorisi için nitel tanımlayıcılar.

**Table 4.** Qualitative descriptors for the toxicity category of fish and aquatic invertebrates.

LC <sub>50</sub> veya EC <sub>50</sub>	Kategori açıklaması
<0.1 ppm	Çok toksik
0.1-1 ppm	Yüksek toksik
>1<10 ppm	Orta düzey toksik
>10<100 ppm	Hafif toksik
>100 ppm	Pratik olarak toksik değil

**Toksikolojik Deneylerde Su Kalitesi:** Deneylerde kullanılacak organizmaların kültürlerinin yapılmasında ve test konsantrasyon sularının hazırlanmasında kullanılacak suların; yerleşim yerlerinden ve tarımsal alanlardan uzak, sanayi atık sularından etkilenmeyen, yüzey veya kaynak suları olması gerekmektedir. Toksikolojik çalışmalarda kullanılacak suların özellikleri Tablo 5'de belirtilmiştir (APHA, 1995; EPA, 2002).

**Tablo 5.** Akut toksikolojik biyodenyelerde kullanılacak suların özellikleri.

**Table 5.** Properties of waters to be used in acute toxicological bioassays.

Parametre	Sınır ve Normal Değerler
pH	6-9 (Optimal 7)
Çözünmüş oksijen	Soğuksu Balıkları için $\geq 6$ mg/L Ilıksu Balıkları için $\geq 4$ mg/L
Sıcaklık	Soğuksu Balıkları için 12-15 Ilıksu Balıkları için 20-25
Sertlik	40-200 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Amonyak	<20 µg/L

Toksikolojik deneylerde kullanılacak suların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin önceden belirlenmiş olması gerekmektedir. Kullanılacak suyun sıcaklığı, çözünmüş oksijen miktarı, alkalitesi, sertliği ve pH değerinin deney öncesinde bilinmesi gerekmektedir. Ayrıca bu kriterlerin belirlenmesinde kullanılacak canlı türünün de göz önünde bulundurulması gerekir. Deney süresince test suyu sıcaklığında meydana gelen değişikliğin  $\pm 2^\circ\text{C}$ 'yi geçmemesi ve çözünmüş oksijen miktarının 4 mg/l'nin altına düşmemesi sağlanmalıdır (APHA, 1995; EPA, 2002).

**Verilerin Değerlendirilmesi:** Çalışmada akut toksik Biyodenyelerde sonuçların değerlendirilmesi EPA Probit programıyla gerçekleştirilecek olup diğer verilerin değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanılarak standart istatistiksel parametreler hesaplanacaktır.

## BULGULAR

Bu çalışmada sucul canlılara pestisit kirliliğinin etkilerinin araştırılmasına yönelik üç farklı herbisit in lepestes balığı üzerindeki akut toksik etkilerini belirlemek üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada glifosat için 5 farklı konsantrasyon içeren akvaryumlarda tutulan balık bireylerinin 96 saat süresince tepkileri ve ölümler aşağıda tabloda sunulmuştur. Deney sonunda 30 balık ölümü gerçekleşmiş olup Kontrol grubunda hiçbir balık ölümü olmamıştır. Düşük konsantrasyonda Glifosat'ın eklendiği akvaryumlarda lepestes balıklarının dipte toplandığı gözlenirken, yüksek konsantrasyon eklenen akvaryumlardaki balıklarda ise ilk başlarda hızlanma, yüzeyde toplanma ve kuyruk sallamanın arttığı, ölümün başladığı süreden itibaren ise belirgin bir yavaşlama gözlenmiştir. Glifosat, 2,4-D Amin tuzu ve Asetoklor içeren akvaryum ortamında biyo-denyede saatlere göre balık ölümleri Tablo 6'da verilmiştir.

Çalışmada 2,4-D için 5 farklı konsantrasyon içeren akvaryumlarda tutulan balık bireylerinin 96 saat süresince tepkileri ve ölümler aşağıdaki Tablo 6'da verilmiştir. Deney sonunda 22 balık ölümü gerçekleşmiş olup Kontrol grubunda hiçbir balık ölümü olmamıştır. Deneyde düşük konsantrasyon eklenen akvaryumlarda hareketlerde belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte yüksek konsantrasyonda

2,4-D eklenen akvaryumlarda lepestes balıklarının yukarı aşağı doğru hızlı iniş çıkışları gözlenmiştir. Ölümün başladığı süreden itibaren balıklar dip köşe bölgelerde toplanmıştır.

**Tablo 6.** Herbisit içeren akvaryum ortamında biyodenyede saatlere göre balık ölümleri.

**Table 6.** Fish deaths by hours in the bioassay in an aquarium environment containing herbicides.

h (saat)	Kontrol	Glifosat				
		1	2	3	4	5
24	-	-	-	4	10	10
48	-	-	-	5	-	-
72	-	-	1	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-

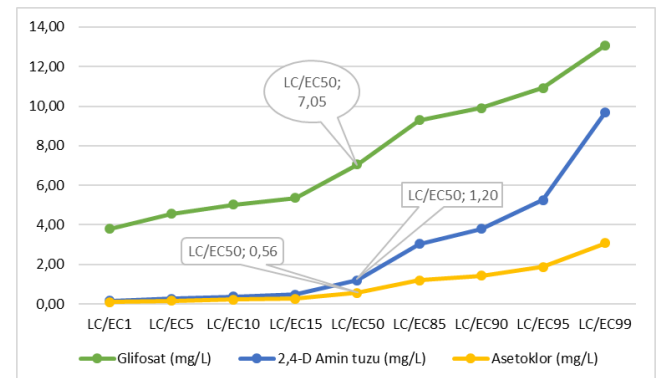
h (saat)	Kontrol	2,4-D Amin tuzu				
		1	2	3	4	5
24	-	-	-	-	1	10
48	-	1	1	-	2	-
72	-	-	-	2	2	-
96	-	-	1	-	2	-

h (saat)	Kontrol	Asetoklor				
		1	2	3	4	5
24	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	1	-
72	-	-	-	1	-	2
96	-	-	-	1	2	2

Çalışmada Asetoklor için 5 farklı konsantrasyon içeren akvaryumlarda tutulan balık bireylerinin 96 saat süresince tepkileri ve ölümler aşağıdaki Tablo 6'da bulunmaktadır. Deney sonunda 9 balık ölümü gerçekleşmiş olup Kontrol grubunda hiçbir balık ölümü olmamıştır. Deneyde düşük konsantrasyon eklenen akvaryumlarda balık hareketlerinde değişim olmamıştır. Fakat yüksek konsantrasyon eklenen akvaryumlarda balıkların yüzeye doğru hareketlenip yüzey köşelerinde toplandığı gözlenmiştir.

96 saat süren deney sonunda kaydedilen balık ölüm sayıları kullanılarak EPA Probit programıyla hesaplanan ve çizilen letal konsantrasyonlar (LC) ve eğrileri her bir herbisit için elde edilmiştir. Herbisitler için hesaplanan letal konsantrasyon (LC) değerleri Şekil 1 ve Tablo 7'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Çalışmada kullanılan herbisitlerin letal konsantrasyonları.  
**Figure 1.** Lethal concentrations of herbicides used in the study.

## TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Doğu Karadeniz bölgesinde tarımsal faaliyetlerde zararlı bitkilerle mücadelede yoğun olarak kullanılan 3 farklı herbisidin sucul canlılara etkilerinin incelenmesi bağlamında glifosat, 2,4-D ve asetoklor etken maddeli pestisitlerle ilgili olarak gerçekleştirilen biyodenedeylerde lepistes balığı üzerinde bu maddelerin etkileri akut toksikolojik olarak incelenmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde lepistes üzerinde glifosat'ın akut toksik etkisi 7,051 mg/l konsantrasyonunda iken tüm balıkları öldürebilecek en düşük konsantrasyonun 13,084 mg/l olduğu ve hiçbir balığın ölmeyeceği en yüksek konsantrasyonun ise 3,800 mg/l olduğu anlaşılmıştır. Diğer taraftan lepistes üzerinde 2,4-D maddesinin akut toksik etkisi 1,201 mg/l konsantrasyonunda iken tüm balıkları öldürebilecek en düşük konsantrasyonun 9,694 mg/l olduğu ve hiçbir balığın ölmeyeceği en yüksek konsantrasyonun ise 0,149 mg/l olduğu anlaşılmıştır.

**Tablo 7.** Herbisid biyodenedeylerinde hesaplanan letal konsantrasyon değerleri.

**Table 7.** Lethal concentration values calculated in herbicide bioassays.

LC	Glifosat		2,4 D Amin tuzu		Asetoklor	
	Kons.(mg/L)	Güvenlik Aralığı	Kons.(mg/L)	Güvenlik Aralığı	Kons.(mg/L)	Güvenlik Aralığı
LC/EC <sub>1</sub>	3,80	1,69-5,02	0,15	0,02-0,30	0,10	0,00-0,19
LC/EC <sub>5</sub>	4,56	2,46-5,75	0,27	0,07-0,48	0,17	0,01-0,25
LC/EC <sub>10</sub>	5,02	2,99-6,21	0,38	0,13-0,61	0,22	0,02-0,31
LC/EC <sub>15</sub>	5,35	3,41-6,57	0,47	0,19-0,72	0,26	0,06-0,37
LC/EC <sub>50</sub>	<b>7,05</b>	<b>5,51-8,85</b>	<b>1,20</b>	<b>0,79-1,88</b>	<b>0,56</b>	<b>0,39-5,69</b>
LC/EC <sub>85</sub>	9,29	7,60-13,98	3,05	1,94-8,23	1,19	0,64-354,74
LC/EC <sub>90</sub>	9,91	8,06-15,85	3,79	2,29-12,13	1,43	0,72-955,06
LC/EC <sub>95</sub>	10,92	8,73-19,22	5,26	2,94-21,76	1,87	0,84-4154,51
LC/EC <sub>99</sub>	13,08	10,03-27,94	9,69	4,58-66,21	3,08	1,11-65808,81

Son olarak ise lepistes üzerinde asetoklor maddesinin akut toksik etkisi 0,557 mg/l konsantrasyonunda iken tüm balıkları öldürebilecek en düşük konsantrasyonun 3,078 mg/l olduğu ve hiçbir balığın ölmeyeceği en yüksek konsantrasyonun ise 0,101 mg/l olduğu anlaşılmıştır.

Glifosat herbisidinin lepistes üzerine akut toksik etkileri üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmadığı halde diğer balık türleri hakkında birçok çalışma vardır. Akut toksisite çalışmalarında 96 saatlik LC<sub>50</sub> değerleri yoğun kullanılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde 140 mg/l, *Pimephales promelas* için 97 mg/l, *Cyprinus carpio* için 620 mg/l ve *Ictalurus punctatus* türü için ise 130 mg/l civarında olduğu bildirilmektedir (Perez vd., 2011). Bu çalışmada lepistes üzerinde glifosatın akut toksik etkisinin yukarıda belirtilen türlerin tümüne göre daha hassas olduğu (7,051 mg/l) görülmektedir.

2,4-D'nin üzerine benzer çalışmalar incelendiğinde oldukça önemli farklılıklar görülmüştür. Yalçinkaya (2006), tarafından yürütülen bir çalışmada 2,4-D'nin Lepistesin medula spinalis organına etkilerinin araştırıldığı araştırma kapsamında letal konsantrasyonlar da hesaplanmış ve LC<sub>50</sub> değerinin 30 mg/l gibi yüksek değerde belirlenirken bu çalışmada 1,201 mg/l değerinde olduğu görülmüştür.

Asetoklor herbisidinin akut toksik etkileri için ise Lepistes ve Zebra balıklarının incelendiği bir çalışmada sırasıyla ergin lepistes bireyi üzerinde 96 saatlik LC<sub>50</sub> değeri 1,7 mg/l (juvenil için 1,3 mg/l) iken zebra balığında ise 0,37 mg/l tespit edilmiştir (Kovriznych ve Urbancikova, 1998). Bu sonuçlara göre asetoklora karşı

lepistes balıklarının zebra balıklarına göre daha toleranslı olduğu görünürken bu araştırma da ise lepistes balıklarının 96 saatlik letal konsantrasyonu (LC<sub>50</sub>) değeri 0,557 mg/l olarak bulunmuştur. Böylece bu sonuçlara göre daha önce yüksek ölçüde toksik sınıfta değerlendirilen asetoklor, bu çalışmanın sonuçlarına göre çok yüksek ölçüde toksik sınıfta olduğu görülmektedir.

Gittikçe yaygınlaşan çevre bilinci pestisidlerin kullanımını sınırlamakla beraber bölgede üretimi yapılan çay bitkisi tarımında doğrudan herhangi bir zirai mücadele kimyasalı kullanılmadığı bildirilmektedir. Gübre dışında herhangi bir pestisidin doğrudan çay bitkisine uygulanmaması yanında zararlı otlar ve yabancı bitkilerin üretim alanı içerisinde uzaklaştırılmasında özellikle fındık ve çay tarımında bazı herbisitlerin kullanıldığı bilinmektedir. Ağırlıklı olarak Glifosat herbisiti kullanılan bu uygulamaların su kaynaklarında yansımaları bu çalışmada belirlenmemiştir. Bu sonuçlar bölgede kullanılan herbisitlerin uygulama alanlarında öncelikle bitkiler, toprak ve suda dağılım gösterdiğini ancak su ortamlarına geçiş konusunda ölçülen değerlerin çok düşük düzeyde veya ölçüm limitlerini aşmayacak düzeyde olması sebebiyle sucul ortamları etkileyebilecek bir herbisit veya pestisit kirliliğinin olmadığını göstermektedir. Ancak bu tür analizlerin bitki ve toprak ortamında da yapılması ve bu sonuçlara göre gerekli tedbirlerin alınması oldukça önem arz etmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu makale bir Yüksek Lisans Tezinden üretilmiş olup Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015.53002.103.01.04 nolu proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- AFS-FHS. (2003).** American Fisheries Society-Fish Health Section, Suggested Procedures For The Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, 5th Edition. Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- Ağar, S., Aydınoglu, H., Temel, O., İkizunal, K. & Ece, H., (1991).** Pestisit Kullanımının Tarihçesi, Bugünü ve Geleceği. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 15(4), 247-256, ISSN 1010-6960.
- Anonim. (2012).** Pestisitler Kontrollü ve Bilinçli Kullanılmalı, *Dünya Gıda Dergisi*, Nisan 2012, İstanbul.
- APHA. (1995).** Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 18th ed., American Public Health Association Washington, D.C.
- Arellano, A., Santoyo, S., Martin, C. & Ygartua, P. (1999).** Influence of Propylene Glycol and Isopropyl Myristate on The In-Vitro Percutaneous Penetration of Declofinace Sodium from Capobol Gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 7(2),129-135.
- Atamanalp, M. & Yanık, T. (2002).** Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4), 555-563.
- Barlow, B.K., Lee, D.W., Cory-Slechta, D.A. & Opanashuk, L.A. (2005).** Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology*, 26(1), 63-75. DOI: 10.1016/j.neuro.2004.07.004
- Benbrook C.M. (2016).** Trends in Glifosat Herbicide Use in the United States and Globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(3), 1-15, DOI: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- Boran, M., Altınok, I., Capkin, E., Karacam, H. & Bicer, V. (2007).** Acute Toxicity of Carbaryl, Methiocarb, and Carbosulfan to the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Guppy (*Poecilia reticulata*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(1), 39-45.
- Delen, N. (1990).** Pestisitler. E.Ü. Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayınları: Y-3, Bornova. 1-4s.
- Delen, N., Kınay, P., Yıldız, F., Yıldız, M., Altınok, H. & Uçkun, Z. (2010).** Türkiye Tarımında Kimyasal Savaşımın Durumu ve Entegre Savaşım Olanakları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongre*, Ankara.
- Deveci, E. (2006).** Histopathological effects of organometallic maneb on testis in rats: a light and electron microscopic study. *Toxicology and Industrial Health*, 22, 395-398.
- EPA 1656A. (2009).** Method 1656, Revision A: Organohalide Pesticides In Wastewater, Soil, Sludge, Sediment, And Tissue By Gc/Hsd, EPA-821-R-00-017, U.S. Environmental Protection Agency.
- EPA. (2002).** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, Fifth Edition, US Environmental Protection Agency, 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington D.C.
- Gerber, G.B., Leonard, A. & Hantson, P. (2002).** Carcinogenicity, Mutagenicity and Teratogenicity of Manganese Compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42, 25-34. DOI: 10.1016/S1040-8428(01)00178-0.
- Güler, Ç. & Çobanoğlu, Z. (1997).** "Pestisitler", Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No:52, T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Güven, K., Deveci, E., Akba, O., Onen A. & Pomerai, D. (1998).** The accumulation and histological effects of organometallic fungicides Propineb and Maneb in the kidneys of fetus and female rats during pregnancy. *Toxicology Letters*, 99, 91-98, DOI: 10.1016/S0378-4274(98)00128-3.
- Jyothi, B. & Narayan, G. (1999).** Toxic effects of carbaryl on gonads of freshwater fish, *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Journal of Environmental Biology*, 20, 73-76.
- Key, P.B., Chung, KW., Hoguet, J., Shaddrix, B. & Fulton, MH. (2008).** Toxicity and physiological effects of brominated flame retardant PBDE-47 on two life stages of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Science of the Total Environment*, 399, 28-32, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.021.
- Kovriznych, J.A. and Urbancikova, M. (1998).** Acute toxicity of Acetochlor for zebrafish (*Danio rerio*) and guppy (*Poecilia reticulata*). *Ekologia Bratislava*, 17, 449-456.
- Morato, G.S., Lemos, T. ve Takahashi, R.N. (1989).** Maneb'e akut maruziyet, faredeki bazı davranışsal fonksiyonları değişim. *Nörotoksikol Terat*, 11, 421-5.
- OECD. (1992).** OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
- Özbay, G., Barlas, N. & Kolankaya, D. (1991).** Histopathological effects of the residual maneb and zineb in the lettuces on the liver and kidney of albino mice. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 4(4), 336-339.



- Pérez, G.L., Vera, M.S. & Miranda, L. (2011).** Effects of herbicide Glifosat and Glifosat-based formulations on aquatic ecosystems. In: Herbicides and environment. InTech (PDF) Glifosat toxicity for animals. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/321822115\\_Glifosat\\_toxicity\\_for\\_animals](https://www.researchgate.net/publication/321822115_Glifosat_toxicity_for_animals).
- Rao, T.K., Lijinsky, W. & Epler, J.L. (1984).** Genotoxicology of N-nitroso compounds, Plenum Press, New York.
- Ripley, B.D. & Cox, D.F., (1978).** Residues of ethylenebis (Dithiocarbamate) and ethylenethiourea in treated tomatoes and commercial tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 1137-1143.
- Seifter, J. & Ehrich, W.E. (1948).** Goitrogenic compounds: Pharmacological and pathological effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **92**, 303-314.
- Sevim, R. (2011).** *Toksikoloji: Pestisitler*. Akdeniz Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, 17s.
- Sinha, N., Lal, B. & Singh, T.B. (1991).** Carbaryl induced thyroid dysfunction in the freshwater catfish *Clarias Batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 240-247, DOI: [10.1016/0742-8413\(91\)90133-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90133-E).
- Todd, N.E. & Van Leeuwen, M. (2002).** Effects of Sevin (carbaryl insecticide) on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**, 267-272. DOI: [10.1006/eesa.2002.2231](https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2231).
- Van Leeuwen, C.J, Maas-D. Iepeveen, J.L., Niebeek, G., Vergouw, W.H.A., Griffioen, P.Sa & Luyke, M.W. (1985).** Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquatic Toxicology*, **7**, 59-78.
- Westernhagen, V.H. (1988).** *Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae*. Fish Physiology. Academic Press, New York, XIA 253-346.
- Yalçınkaya, M. (2006).** *Bir herbisit olan 2,4-d (diklorofenoksiasetik asit)'nin Poecilia reticulata p., 1859'da Medulla spinalis üzerine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, 97s.