



Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences

(Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi)

E-ISSN 2548-0006

JAES

AÇEH

31.03.2022

Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi

*Journal of Anatolian
Environmental and Animal Sciences*

Cilt/Volume 7 • Sayı/Number 1 • 2022



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. Cemal 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. İlia 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 Karslı, 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. Sengül 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. Didem 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 EMMANOUL, 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. Cemal ŞAHİN, 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. Ayşe Gül 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. Rahsan Evren MAZLUM, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Doç. Dr. Tülay ÇAĞATAY, Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Doç. Dr. Ülgen AYATAN, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Doç. Dr. Ahmet Raif ERYAŞAR, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi
Doç. Dr. Gülbin FİRİDİN GAZI ÜNİVERSİTESİ, Fen bilimleri enstitüsü, Çevre ABD.
Dr. Arzu AYDIN UNCUMUSAOĞLU, Giresun Üniversitesi, Çevre Mühendisliği
Dr. Şükür 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 ÖZSEKER, 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: verepoglu@gmail.com, anatolianacademicciense@hotmail.com

Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli

Yayın Tarihi: 31.03.2022

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	Sayfa No Page No
		1-3
Odun Lifi ve Halıfleks Atıklarından Üretilen Liflevhaların Bazı Mekanik ve Fiziksel Özellikleri Some Mechanical and Physical Properties of Fiberboard Made from Wood Fiber and Waste Carpet-flex Derya USTAÖMER & Gökay NEMLİ	Araştırma Research	4-8
<i>Scilla bifolia</i> L. (Orman Sümbülü) Bitki Kısımlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi Determination of Antioxidant Activity of Various Plant Parts of <i>Scilla bifolia</i> L. (Forest Hyacinth) Özen Yusuf ÖĞRETMEN	Araştırma Research	9-14
The Effect of Whey on the Immune Parameters of Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Peynir Altı Suyunun (PAS) Gökkuşuğu Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Bağışıklık Parametreleri Üzerine Etkisi Remziye Eda YARDIMCI, Emre TURGAY, Sevdan YILMAZ, Can SARVAN & Süheyla KARATAŞ	Research Araştırma	15-20
The Determination of Antibiotic Resistance and Biofilm Properties in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolates from Raw Milk Samples Çiğ Süt Örneklerinden İzole Edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarında Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi Sadık SAVAŞAN & Merve Gizem SEZENER	Research Araştırma	21-26
Monthly Average Wind Speed Forecasting in Giresun Province with Fuzzy Regression Functions Approach Bulanık Regresyon Fonksiyonları Yaklaşımı ile Giresun İli Aylık Ortalama Rüzgâr Hızı Tahmini Abdullah YILDIRIM & Eren BAŞ	Research Araştırma	27-32
<i>Oreochromis niloticus</i> 'un Kas ve Karaciğer Dokularında Kurşun Toksikitesi Üzerine Nitroliotriasetik Asitin Etkisi Protective Effect of Nitroliotriacetic Acid on Lead Toxicity in Muscle and Liver Tissues of <i>Oreochromis niloticus</i> Tüzün AYTEKİN	Araştırma Research	33-38
Karadeniz'de Demersal Balıklara Ait Av Miktarlarının Trend Analizi Trend Analysis of Demersal Fish Landings in the Black Sea İsmet SAYGU	Araştırma Research	39-44
The Difference Between The Response To Glutamate Excitotoxicity and The Role Of Ca ²⁺ Channel Blockers in Cortical Neuron and SH-SY5Y Cells Cultures Kortikal Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürlerinde Glutamat Eksitotoksitesine Yanıt ile Ca ²⁺ Kanal Blokerlerinin Rolü Arasındaki Fark Betul CICEK, Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGH, Ahmet HACIMUFTUOĞLU & Aysegül YILMAZ	Research Araştırma	45-52
Olası Bir Gemi Kazası Ardından Oluşacak Petrol Kirliliğinin Sektör Kadıköy Kıyısal Alanındaki Toksik Etkisinin Belirlenmesi Determination of the Toxic Effect of That Will Occur Oil Pollution in the Sector Kadıköy Coastal Area After a Possible Ship Accident Nüket SİVRİ, Serdar YILDIZ, V. Zülal SÖNMEZ & Özkan UĞURLU	Araştırma Research	53-61
Güney Doğu Karadeniz'de Beam Trol ile Avlanan <i>Liocarcinus depurator</i> (Crustacea: Decapoda)'ün Boya Dayalı Büyümesi Length based growth of <i>Liocarcinus depurator</i> (Crustacea: Decapoda: Brachyura) caught by beam trawl in the south-east Black Sea Hatice ONAY & Sabri BİLGİN	Araştırma Research	62-71
Current Approaches to Short and Long-Term Storage of Honey Bee Semen Bal Arısı Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanmasıyla İlgili Güncel Yaklaşımlar Arda Onur ÖZKÖK	Research Araştırma	72-75
Rize İl Sınırları İçerisindeki <i>Rubus</i> L. (Rosaceae) Türlerinin Morfolojik, Mikromorfolojik ve Moleküler Sistematik Özelliklerinin Analizi Analysis of Morphological, Micromorphological and Molecular Systematic Properties of <i>Rubus</i> L. (Rosaceae) Species in Rize Province Fatma KUYUMCU, Fatih Şaban BERİŞ & Vagif ATAMOV	Research Araştırma	76-83
Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı'nda Tespit Edilmiş Endemik Bitkiler Endemic Plants Detected in Kızılcahamam Soğuksu National Park Ömer EYÜBOĞLU	Araştırma Research	84-87
Molecular Phylogeny and Historical Biogeography of <i>Petroleuciscus</i> (Teleostei: Leuciscidae) Species in Turkey Türkiye'deki <i>Petroleuciscus</i> (Teleostei: Leuciscidae) Türlerinin Moleküler Filogenisi ve Tarihsel Biyocoğrafyası Gökhan KALAYCI	Research Araştırma	88-95
Antioxidant Potential of Chestnut Shell, Stinging Nettle, Kiwi Fruit and Citrus Fruit Extracts and Antimicrobial Effects Against Some Fish Pathogens. <i>Kestane Kabuğu, Isırgan Otu, Kivi Meyvesi ve Narenciye Özülerinin Antioksidan Potansiyelleri ve Bazı Balık Patojenlerine Karşı Antimikrobiyal Etkileri.</i> Orhan KOBYA, Büşra KARA, Eren UZUN-YAYLACI & Emre ÇAĞLAK	Erratum 1 Düzeltilme 1	96
Antimicrobial Resistance and Diversity of <i>Lactococcus garvieae</i> by Genomic Approaches <i>Lactococcus garvieae</i> 'nin Genomik Yaklaşımlarla Çeşitliliği ve Antimikrobiyal Direnci Salih KUMRU	Erratum 2 Düzeltilme 2	96
The Fish Fauna of Kuzgun Dam Lake and Its Drainages (Erzurum, Turkey). <i>Kuzgun Baraj Gölü ve Drenajlarının Balık Faunası (Erzurum, Türkiye)</i> Esra. BAYÇELEBİ & Davut TURAN	Erratum 3 Düzeltilme 3	96
Evaluation of Persimmon (<i>Diospyros kaki</i>), Cherry laurel (<i>Prunus laurocerasus</i>) and Blueberry (<i>Vaccinium arctostaphylos</i>) Fruits as a Natural Antioxidant Source. Hurma (<i>Diospyros kaki</i>), Karayemiş (<i>Prunus laurocerasus</i>) ve Mavi Yemiş (<i>Vaccinium arctostaphylos</i>) Meyvelerinin Doğal Antioksidan Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi. Aydın Aytaç GÜRDAL	Erratum 4 Düzeltilme 4	96
Macro and Trace Element Levels of Macroalgae Cystoseira foeniculacea and Gongolaria montagnei Species from Mediterranean Region (Antalya/ Turkey). Akdeniz Bölgesi'nden (Antalya/ Türkiye) Alınan Makroalg Cystoseira foeniculacea ve Gongolaria montagnei Türlerinin Makro ve İz Element Seviyeleri. Baran AŞIKKUTLU & Emine Şükran OKUDAN	Erratum 5 Düzeltilme 5	96



Odun Lifi ve Halıfleks Atıklarından Üretilen Liflevhaların Bazı Mekanik ve Fiziksel Özellikleri^[*]

Derya USTAÖMER^{1*} Gökay NEMLİ¹

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği, Trabzon, Türkiye

Geliş Tarihi: 07.08.2020

Kabul Tarihi: 30.11.2021

Basım Tarihi: 31.03.2022

Atıf yapmak için: Ustaömer, D. & Nemli, G. (2022). Odun Lifi ve Halıfleks Atıklarından Üretilen Liflevhaların Bazı Mekanik ve Fiziksel Özellikleri. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 4-8.

How to cite: Ustaömer, D. & Nemli, G. (2022). Some Mechanical and Physical Properties of Fiberboard Made from Wood Fiber and Waste Carpet-flex. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 4-8.

<https://orcid.org/0000-0003-0102-818X>
 <https://orcid.org/0000-0002-8172-1875>

***Sorumlu yazarın:**

Derya USTAÖMER
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman
Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği,
Trabzon, Türkiye.
✉: uderya@ktu.edu.tr

Öz: Son dönemlerde, kompozit levha üretimlerinde alternatif hammadde arayışları ile birlikte birçok malzemenin ve farklı atık türlerinin yaygın olarak kullanım yeri bulunduğu görülmektedir. Bu çalışmada, kayın odun lifleri ve halıfleks atıkları kullanılarak üretilen liflevhaların bazı mekanik ve fiziksel özellikleri araştırılmıştır. Deneme levhaları üretilen formaldehit(UF) ve fenol formaldehit(FF) tutkalları kullanılarak üretilmiş olup atık halıfleksler lif levha üretiminde levha taslağı içerisinde tabaka olarak kullanılmıştır. Üretilen levhaların eğilme direnci, eğilmede elastikiyet modülü, su alma ve kalınlığına şişme değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, halıfleks kullanımı ve tutkal türünün levha gruplarının kalite özelliklerinde etkisinin olduğu, FF tutkalı ve halıfleks kullanımının levhaların mekanik ve fiziksel özelliklerini iyileştirdiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Liflevha, odun lifi, atık halıfleks, tutkal türü.

Some Mechanical and Physical Properties of Fiberboard Made from Wood Fiber and Waste Carpet-flex

***Corresponding author's:**

Derya USTAÖMER
Karadeniz Technical University, Faculty of
Forestry, Forest Industry Engineering, Trabzon,
Turkey.
✉: uderya@ktu.edu.tr

Abstract: Recently, because of searching for alternative raw materials in the composite panels production; various materials and different types of wastes are widely evaluated. In this study, some mechanical and physical properties of fiberboard manufactured with beech wood fibers and waste carpet-flex were investigated. The panels were manufactured using urea formaldehyde (UF) and phenol formaldehyde (PF) adhesives. Waste carpet-flex was used as layer in the panel mat for the panel manufacturing. Modulus of rupture (MOR), modulus of elasticity (MOE), water absorption (WA) and thickness swelling (TS) values of these fiberboard panels were determined. As a result of study, it was found that the carpet-flex material and adhesive type affected the investigated properties of the fiberboard panels. The phenol formaldehyde and waste carpet flex usage improved the mechanical and physical properties of fiberboard.

Keywords: Fiberboard, wood fiber, waste carpet-flex, adhesive type.

GİRİŞ

Dünya genelinde, tüm endüstri kolları için karşılaşılan kaçınılmaz ana problemlerden birisi de hammadde kaynaklarının sürdürülebilirliğinde ve fabrikaların üretimlerinde kapasite artışlarını karşılayacak miktarların temininde yaşadıkları güçlüklerdir.

Odun hammadde kaynaklarında son dönemlerde görülen önemli miktarlardaki azalış sorunundan, odun esaslı tüm endüstri kollarında olduğu gibi MDF endüstrisi de olumsuz yönde etkilenme göstermektedir (Akgül & Tozluoğlu, 2008). Bu sorunu çözümlenebilmek adına

^[*] Bu çalışma "3. Uluslararası Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu (III. International Mediterranean Forest and Environment Symposium), Kahramanmaraş-TÜRKİYE/ IMFES 2019 sözlü bildiri olarak sunulmuş ve IMFES2019 sempozyum bildiriler kitapçığında tam metin olarak basılmıştır.

odun esaslı levha sektörleri için alternatif hammadde kaynak arayışlarına gidilmiştir.

Bu sebeple, son yıllarda özellikle odun atıklarının ve zirai liflerin levha üretiminde kullanımı artış göstermiştir (Nemli vd., 2008). Ayrıca, hasat atıkları, kabuklar, kereste- mobilya ve kağıt fabrikası atıkları, geri dönüştürülmüş kağıtlar alternatif olarak değerlendirilen hammadde kaynaklarıdır (Akgül & Çamlıbel, 2008).

Her yıl atık depolama alanlarına büyük miktarlarda lif içeren atıklar atılmaktadır. Bu durum toplumlara yalnızca ekonomik ve çevresel bir kaygı olarak değil, aynı zamanda kaynakların etkili kullanılmayarak israfı olarak yansımaktadır. Genel olarak, bu geri dönüşüm atıklarının mevcut ilk ürüne dönüştürülmesi istenmesine rağmen; bu yaklaşım, proses süreci zorluğu, enerji ve kirlilik vb. dahil çeşitli faktörler göz önüne alındığında birçok atık türü için uygun olarak görülmemektedir. Çoğu lifsel atıklar pamuk, polyester, naylon, polipropilen vb. gibi doğal ve sentetik polimerik materyallerden oluşmaktadır (Wang vd., 2003; Wang, 2010). Bu lifsel atıkların diğer büyük kaynaklarından birisi de atık halı ürünleridir (Kotliar, 1999).

Bilindiği üzere halıflex ev, işyeri, ticari binalar, otomobil, uçak vb. birçok yerde halen yaygın olarak kullanılan bir döşeme malzemesidir. Sentetik liflerden oluşan ve biyolojik olarak bozunmayan bu malzeme uzun süre dayanıklı bir yapı göstermektedir. Ancak kullanım yerinde belirli bir zaman sonra çeşitli sebeplerle yenilenmeleri gerekebilmekte; dolayısıyla eskiyen malzemeler atık olarak uzaklaştırılmaktadır. Özellikle, Amerika'da her yıl büyük oranlarda eski halı ürün atığının uzaklaştırıldığı, bunun yalnızca çok az bir oranının geri dönüşüme dahil edilebildiği ve önemli oranlarının ise depolama alanlarına atılarak bırakıldığı belirtilmektedir (Jain vd., 2012).

Son dönemlerde, araştırmacılar tarafından halıflex atıklarının geri dönüşümü ve kompozit yapımında değerlendirilmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Zhang vd., 1999; Onal & Karaduman, 2009; Karaduman & Onal, 2011; Jain vd., 2012; Kiziltas & Gardner, 2012; Mishra vd., 2019).

Bu çalışmanın amacı; odun lifleri ve halıflex atıkları ile üretilen lif levhaların bazı mekanik ve fiziksel özelliklerini (su alma, kalınlığına şişme, eğilme direnci, eğilmede elastikiyet modülü) araştırmak ve bu atıkların levhalarda kullanım potansiyelini değerlendirmektir.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, lifsel hammadde olarak Kastamonu Entegre Ağaç Sanayi ve Ticaret AŞ'den temin edilen kayın lifleri kullanılmıştır. Atık materyal olarak ise halıflex atıkları değerlendirilmiştir. Levha üretiminde tutkal olarak

üre formaldehit(ÜF) ve fenol formaldehit(FF) tutkalları kullanılmıştır. Halıflex atıkları küçük parçalar halinde hazırlanarak tek ve iki tabakalı olarak lifler arasına yerleştirilerek ilave edilmiştir. Üre formaldehit tutkalı ve fenol formaldehit tutkalı %12 oranında kullanılmış ve tutkallama işleminden sonra levha taslağı oluşturulmuştur. Daha sonra, oluşturulan bu taslak 170C°'de 7 dakika süre ile sıcak pres kullanılarak levha haline getirilmiştir. Klimatize işlemine bırakılan levhalar bu işlem sonrası ilgili testler yapılmak üzere boyutlandırılmıştır. Üretilen levha gruplarının içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Levha gruplarının içerikleri.

Table 1. The contents of panel groups.

Levha adı	İçerik
UF1	UF'li levha (tek tabaka)
UF2	UF'li levha (iki tabaka)
FF1	FF'li levha (tek tabaka)
FF2	FF'li levha (iki tabaka)
K1	Kontrol-UF
K2	Kontrol-FF

Fiziksel özellikler

Su alma: Üretilen levha örneklerinin 24 saat süre ile su alma değerleri EN 317 (1993) standartına göre yapılmıştır.

Kalınlığına şişme: Üretilen levha örneklerinin 24 saat süre ile kalınlığına şişme değerleri EN 317 (1993) standartına göre yapılmıştır.

Mekanik özellikler

Eğilme direnci: Üretilen levha örneklerinin eğilme direnci değerleri EN 310 (1993) standartına göre yapılmıştır.

Eğilmede elastikiyet modülü: Üretilen levha örneklerinin eğilmede elastikiyet modülü EN 310 (1993) standartına göre yapılmıştır.

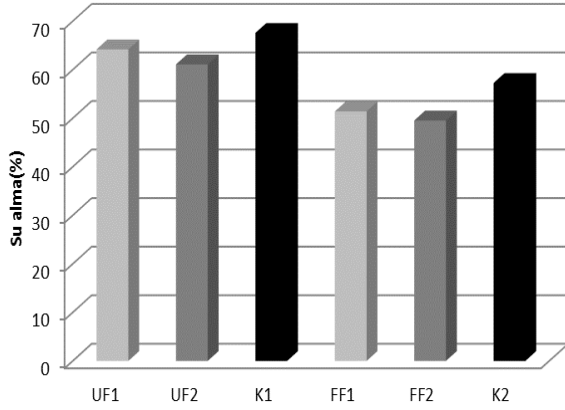
BULGULAR

Fiziksel Özellikler

Su alma: Levha gruplarının atık halıflex ve tutkal türüne bağlı olarak 24 saat süre sonunda su alma oranlarındaki değişim Şekil 1'de verildiği gibidir.

Şekil 1'den görüleceği üzere; üre formaldehit ve fenol formaldehit tutkalları ve halıflex atıkları ile üretilen levha gruplarının su alma değerleri, bu deney parametrelerine bağlı olarak değişim göstermiştir. Su alma değerleri halıflex tabaka sayısının artışıyla azalma eğilimi göstermiştir. UF1, UF2, FF1, FF2 gruplarının su alma değerleri bu grupların kontrollerinin (K1, K2) su alma değerlerinden daha düşük olarak bulunmuştur. Bu durumun, halıflexin yapısının sentetik liflerden oluşmasına bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Tüm gruplar içerisinde FF ile üretilen levha gruplarında UF ile üretilen levha gruplarına kıyasla daha iyi sonuçlar elde

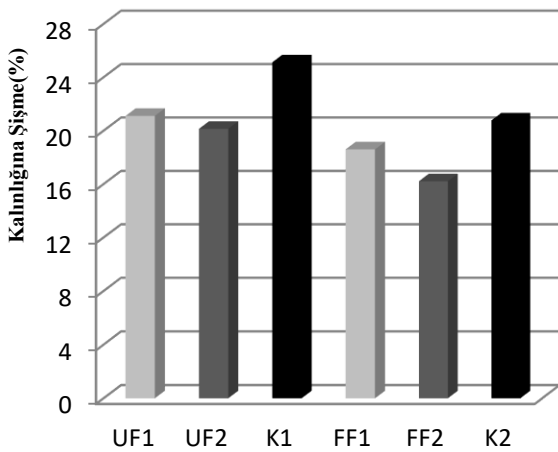
edilmiştir. Bu durum fenolik tutkalların yapısından kaynaklanmaktadır. Fenolik tutkalların çeşitli çözücülere ve suya karşı dayanımları daha yüksektir (Atta-Obeng, 2011). En düşük su alma değeri (49,53) FF tutkalı ile üretilen iki tabaka olarak halıfleks atığı ilaveli FF2 grubu levhalarda, en yüksek su alma değeri ise UF tutkalı ile üretilen K1 kontrol levha grubunda tespit edilmiştir. Tutkal türü ve atık tabaka sayısına bağlı olarak yapılan istatistiksel değerlendirmede de BVA ile levha grupları arasında ($p<0,05$) anlamlı farklılıkların olduğu belirlenmiştir



Şekil 1. Su alma değerleri.

Figure 1. Water absorption values.

Kalınlığa şişme: Levha gruplarının atık halıfleks ve tutkal türüne bağlı olarak 24 saat süre sonunda kalınlığına şişme oranlarındaki değişim Şekil 2' de verildiği gibidir.



Şekil 2. Kalınlığına şişme değerleri.

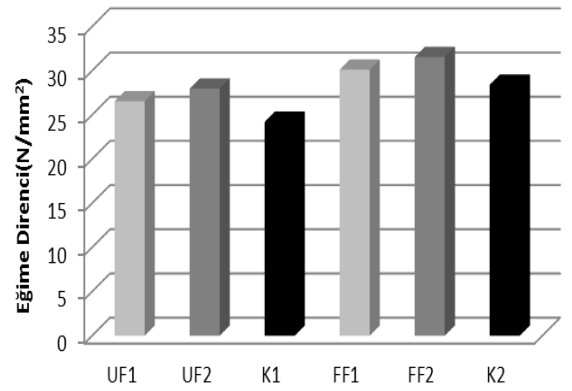
Figure 2. Thickness swelling values.

Şekil 2'den görüleceği üzere; levha gruplarının kalınlığına şişme(KŞ) değerlerindeki değişimde tutkal türü ve atık halıfleks tabaka sayısına bağlı olarak su alma(SA) değerlerindeki değişime benzer bir seyir göstermiştir. Atıkların iki tabaka olarak ilave edildiği levha örneklerinin kalınlığına şişme değerleri azalma göstermiştir. UF1, UF2, FF1, FF2 levha gruplarının kalınlığına şişme değerleri

kendi kontrol gruplarından(K1, K2) çok daha düşük olarak bulunmuştur. En iyi sonuçlar, FF tutkalı kullanılarak üretilen gruplarda elde edilmiştir. En yüksek kalınlığına şişme değeri K1 grubunda, en düşük kalınlığına şişme değeri (16,22) ise FF2 grubunda tespit edilmiştir. Fenol formaldehit ve atık halıfleksin birlikte kullanımı daha olumlu sonuçlar vermiştir. Grupların kalınlığına şişme değerlerinin tutkal türü ve atık tabaka sayısına bağlı olarak yapılan BVA değerlendirmesinde de ($p<0,05$) bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.

Mekanik özellikler

Eğilme direnci: Levha gruplarının atık halıfleks ve tutkal türüne bağlı olarak eğilme direnci değerlerindeki değişim Şekil 3' te verildiği gibidir.



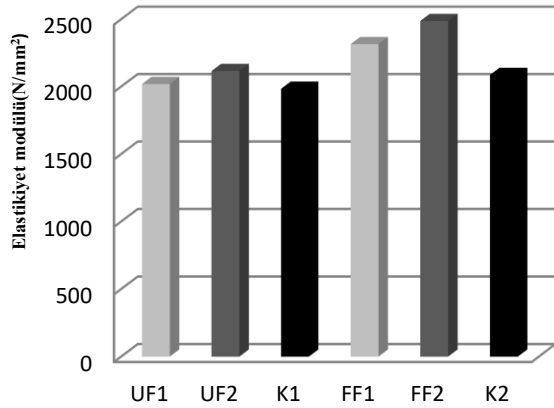
Şekil 3. Eğilme direnci değerleri.

Figure 3. Modulus of rupture values.

Şekil 3'te verilen değişim grafiğine göre; levha örneklerinin eğilme direnci değerleri üzerinde deney parametrelerinin etkisi bulunmaktadır. Eğilme direnci değerleri, atık halıfleks tabaka sayısı artışıyla artma eğilimi göstermiştir. FF tutkalı kullanılarak üretilen levha grupları ile UF tutkalı kullanılarak üretilen levha grupları kıyaslandığında, FF tutkalı levha grupları ile daha yüksek sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu durum, fenolik içerikli tutkalların yüksek mekanik dayanım sağlayan tutkallar olması (Atta-Obeng, 2011) sebebiyledir. UF1, UF2, FF1, FF2 levha gruplarının eğilme direnci değerleri bu grupların kendi kontrol değerlerine (K1, K2) göre daha yüksek olarak bulunmuştur. En düşük eğilme direnci değeri üre formaldehit ile üretilen K1 kontrol grubunda elde edilirken, en yüksek eğilme direnci değeri ise fenol formaldehit tutkalı ile üretilen FF2 grubunda tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda da, levha grupları arasında tutkal türü ve tabaka sayısına bağlı olarak ($p<0,05$) anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Eğilmede Elastikiyet Modülü: Levha gruplarının atık halıfleks ve tutkal türüne bağlı olarak eğilmede

elastikiyet modülü değerlerindeki değişim Şekil 4' te verildiği gibidir.



Şekil 4. Eğilmeye elastikiyet modülü değerleri.

Figure 4. Modulus of elasticity values.

Şekil 4'ten, levha örneklerinin eğilmeye elastikiyet modülü değerlerinin de eğilme direnci değerlerine benzer şekilde bir eğilim gösterdiği ve bu değerlerin atık halıfleks tabaka sayısı artışıyla arttığı görülmektedir. Şekil 4 incelendiğinde, FF ile üretilen levha gruplarından, UF ile üretilen levha gruplarına kıyasla daha yüksek sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Ayrıca; UF1, UF2, FF1, FF2 levha gruplarının eğilmeye elastikiyet modülü değerleri de bu grupların kontrol değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. En yüksek değer, fenol formaldehit içeren FF2 levha grubunda tespit edilmiştir. Elastikiyet modülü değerlerinin tutkal türü ve tabaka sayısı için yapılan değerlendirmelerinde levha grupları arasında istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda, üretilen levhaların su alma, kalınlığına şişme, eğilme direnci ve eğilmeye elastikiyet modülü değerleri üzerinde tutkal türünün ve atık halıfleks kullanımının belirgin olarak etkisinin bulunduğu ve bu etkinin olumlu yönde olduğu belirlenmiştir. İki tabaka ile üretilen levha gruplarından, tek tabaka ile üretilen levha gruplarına ve bu grupların kontrol levhalarına göre daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Fenol formaldehit tutkalı ile üretilen levha gruplarının su alma, kalınlığına şişme, eğilme direnci ve eğilmeye elastikiyet modülü değerleri, ure formaldehit tutkalı kullanılarak üretilen levha gruplarının değerlerine göre daha iyi bulunmuştur. En iyi sonuçlar, FF2 levha grubu ile tespit edilmiştir. Buna göre, bu atıkların odun esaslı kompozit levhalarda da değerlendirilme potansiyelinin olduğu; farklı yöntem, kombinasyonlar ve üretim faktörleri

optimizasyonu ile kullanılmalari halinde daha olumlu sonuçların elde edileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgül, M. & Tozluoğlu A. (2008).** Utilizing peanut husk (*Arachis hypogaea* L.) in the manufacture of medium-density fiberboards. *Bioresource Technology*, **99**(13), 5590-5594.
- Akgül, M. & Çamlıbel, O. (2008).** Manufacture of medium density fiberboard (MDF) panels from rhododendron (*R. ponticum* L.) biomass. *Building and Environment*, **43**(4), 438-443.
- Atta-Obeng, E. (2011).** Characterization of phenol formaldehyde adhesive and adhesive-wood particle composites reinforced with microcrystalline cellulose, M.S. thesis, Auburn University.
<https://etd.auburn.edu/bitstream/handle/10415/2694/thesis%20auburn.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- EN 310. (1993).** Wood based panels, determination of modulus of elasticity in bending and bending strength, European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.
- EN 317. (1993).** Particleboards and fiberboards, determination of swelling in thickness after immersion, European Committee for Standardization, Brussels, Belgium.
- Jain, A., Pandey, G., Singh, A.K. & Rajagopalan V. (2012).** Fabrication of structural composites from waste carpet. *Advances in Polymer Technology*, **31**(4), 380-389.
- Karaduman, Y. & Onal, L. (2011).** Water absorption behavior of carpet waste jute-reinforced polymer composites. *Journal of Composite Materials*, **45**(15), 1559-1571.
- Kiziltas, A. & Gardner, D.J. (2012).** Utilization of carpet waste as matrix in natural fiber-filled engineering thermoplastic composites for automotive applications. *In Proceedings of SPE Automotive Composites Conference & Exhibition (ACCE)* September 11-13, 2012 Troy, MI.
- Kotliar, A.M. (1999).** Woodlike properties from carpet and textile fibrous waste: mitigating the coming landfill crisis. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **38**(3), 513-531, DOI: [10.1080/03602559909351597](https://doi.org/10.1080/03602559909351597)
- Mishra, K., Das, S. & Vaidyanathan, R. (2019).** The use of recycled carpet in low-cost composite tooling materials. *Recycling*, **4**(12), DOI: [10.3390/recycling4010012](https://doi.org/10.3390/recycling4010012)

- Nemli, G., Yıldız, S., & Gezer, E.D. (2008).** The potential for using the needle litter of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) as a raw material for particleboard manufacturing. *Bioresource Technology*, **99**(14), 6054-6058.
- Onal, L. & Karaduman, Y. (2009).** Mechanical characterization of carpet waste natural fiber-reinforced polymer composites. *Journal of Composite Materials*, **43**(16), 1751-1768.
- Wang Y. (2010).** Fiber and textile waste utilization. *Waste Biomass Valor*, **1**, 135-143. DOI: [10.1007/s12649-009-9005-y](https://doi.org/10.1007/s12649-009-9005-y)
- Wang, Y., Zhang, Y., Polk, M., Kumar, S. & Muzzy J. (2003).** Recycling of carpet and textile fibers , Chapter 16, in *Plastics and the Environment: A Handbook*, Edited by Andrady A.L. (John Wiley & Sons, New York), pp. 697-725.
- Zhang, Y., Muzzy J.D. & Kumar, S. (1999).** Recycling carpet waste by injection and compression molding. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **38**(3), 485-498, DOI: [10.1080/03602559909351595](https://doi.org/10.1080/03602559909351595)



Scilla bifolia L. (Orman Sümbülü) Bitki Kısımlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Özen Yusuf ÖĞRETMEN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama ve İşleme Teknolojisi ABD, Merkez, Rize

Geliş/Received: 10.08.2021

Kabul/Accepted: 22.11.2021

Yayın/Published: 31.03.2022

Atf yapmak için: Öğretmen, Ö.Y. (2022). *Scilla bifolia* L. (Orman Sümbülü) Bitki Kısımlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 9-14.

How to cite: Öğretmen, Ö.Y. (2022). Determination of Antioxidant Activity of Various Plant Parts of *Scilla bifolia* L. (Forest Hyacinth). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 9-14.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1767-2693>

***Sorumlu yazarın:**

Özen Yusuf ÖĞRETMEN
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama ve İşleme Teknolojisi ABD, Merkez, Rize
✉: ozenyusuf.ogretmen@erdogan.edu.tr

Öz: Bu çalışma Trabzon ilinin Tonya ilçesine bağlı yaklaşık 1300m rakıma sahip Kadıralak yaylasında yetişen Orman sümbülü (*Scilla bifolia*) bitkisinin farklı kısımlarının (skapus, yaprak, çiçek, bulb) antioksidan aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Bitki kısımlarının antioksidan aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivitesi ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAK) yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DPPH radikal süpürme aktivitesi ve TEAK skapus>yaprak>çiçek>bulb şeklinde sıralanmış olup, DPPH değerleri sırasıyla %94,20, %92,65, %87,41, %32,01, TEAK miktarları ise sırasıyla 9,32 µmol troloks/g, 9,17 µmol troloks/g, 8,64 µmol troloks/g ve 2,59 µmol troloks/g olarak tespit edilmiştir. Hem DPPH hem de TEAK yönteminde elde edilen sonuçlar kendi arasında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak farklılıklar tespit edilmiştir (p<0,05). Elde edilen sonuçlar neticesinde *Scilla bifolia* L bitkisinin özellikle skapus ve yaprak kısımlarının önemli derecede antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, DPPH radikal süpürme aktivitesi, *Scilla bifolia*, troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi.

Determination of Antioxidant Activity of Various Plant Parts of *Scilla bifolia* L. (Forest Hyacinth)

***Corresponding author's:**

Özen Yusuf ÖĞRETMEN
Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of Fisheries, Department of Seafood Processing Technology, Rize
✉: ozenyusuf.ogretmen@erdogan.edu.tr

Abstract: This study was carried out to determine the antioxidant activity of different parts (scap, leaf, flower, bulb) of the forest hyacinth (*Scilla bifolia*) plant, which grows in Kadıralak plateau, at an altitude of approximately 1300 meters in Tonya district of Trabzon province. Antioxidant activities of plant parts were determined using 2,2-diphenyl-1-picrihydrazil (DPPH) radical scavenging activity and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAK) methods. According to the results obtained, DPPH radical scavenging activity and TEAK were ranked as scap>leaf>flower>bulb. While DPPH values were determined to be 94.20%, 92.65%, 87.41%, 32.01%, respectively, TEAK amounts were determined to be 9.32 µmol trolox/g, 9.17 µmol trolox/g, 8.64 µmol trolox/g and 2.59 µmol trolox/g, respectively. When the results obtained in both DPPH and TEAK methods were evaluated among themselves, statistical differences were found (p<0.05). As a result of the results obtained, it was determined that especially scape and leaf parts of the *Scilla bifolia* plant had significant antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity, *Scilla bifolia*, trolox equivalent antioxidant capacity.

GİRİŞ

Scilla bifolia Liliaceae familyasına ait bir alt türdür. Birçok türü süs bitkisi olarak yetiştirilmekte olup, gıda maddesi ve tıbbi olarak kullanılan türleri de

bulunmaktadır. Dünyada yaklaşık 250 cins ve bu cinslere ait 3500 kadar türü olan temsil eden bu familya ülkemizde ise 35 cinsine ait 400 kadar türü temsil etmektedir. Geniş bir

yayılma sahip olan Liliaceae familyası çoğunlukla tropikal ve ılıman bölgelerde yayılış göstermektedir (Kavaklı & Sarıkaya 2019; Akyol vd., 2012). *Scilla bifolia* türü Büyük Britanya, Kuzey ve Batı Avrupa, Balkan yarımadası, Ege adaları, Türkiye, Lübnan, Suriye, Ukrayna ve Kuzey Kafkasya'ya kadar uzanan geniş bir yayılım alanına sahiptir (Yıldırım & Altıoğlu 2017). *Scilla bifolia* Türkçe'de yaygın olarak orman sümbülü olarak adlandırılmakta olup, iki yapraklı sümbül, alp ada soğanı ve kampana çiçeği olarak da isimlendirilir (Güner vd., 2012; Özhatay vd., 2012).

Çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla bitkilerin kullanımı uzun bir tarihe sahip olup, bu bitkilerin yaprak, gövde, kök gibi kısımları semptomları önlemek ve anormallikleri normale döndürmek amacıyla kullanılmaktadırlar (Özyurt vd., 2021). Bununla beraber Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin mevcut ilaç çeşitliliğini sağlamak için en iyi kaynak olabileceğini belirtmiş ve bu tür bitkilerin etkinliğinin ve güvenilirliğinin daha iyi çalışılması gerektiğini bildirmiştir (Ökmen vd., 2017). WHO verilerine göre gelişmemiş ülkelerde nüfusun %80'i hastalıkların tedavisi için geleneksel reçeteler kullanırken, gelişmiş ülkelerde bu oran %40 düzeyindedir. Ayrıca günümüzde farmasötik ilaçların %25'i tıbbi bitkilerden elde edilirken gelecek yıllarda bu oranın artacağı ön görülmektedir (Karadağ 2019).

Bitkilerin yapısında bulunan fenolik bileşikler, insanların beslenmesinde önemli bir rol oynamakta olup, antioksidan özelliklerinden dolayı büyük ilgi çekmektedir. Bu bileşikler, antiaterojenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, kardiyoprotektör ve vazodilatör gibi fizyolojik özellikler göstermektedirler (Bayram vd., 2019). Antioksidanlar vücudumuza zarar veren serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesini sağlayarak vücuttaki birçok biyomolekülün zarar görmeden işlevini doğru bir şekilde yerine getirmesini sağlamaktadır. Böylece patolojik durumların oluşma riski en aza indirgenmiş olur (Ceylan vd., 2017). Son yıllarda bilinçsiz ve aşırı bir antibiyotik tüketimi bulunmaktadır. Bundan dolayı bulaşıcı hastalık ve enfeksiyona sebep olan birçok mikroorganizma türünün antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği bilimsel çalışmalarda belirtilmiştir (Ceylan vd., 2017; Hussain vd., 2011). Bu nedenden dolayı antioksidan ve antimikrobiyal etkili fenolik bileşiklere olan ilgi artmaktadır. Günümüzde birçok ilacın hammaddesini tıbbi ve aromatik bitkilerden sentezlenmiş bileşikler oluşturmaktadır. Ülkemizde tıbbi ve aromatik bitkilerin antioksidan potansiyellerini araştıran çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Literatür taramalarında ülkemizde yayılım gösteren *Scilla bifolia* bitkisinin antioksidan aktivitesini belirleyen araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı, bu çalışmanın amacı

doğal ortamdan toplanan *S. bifolia* bitkisinin farklı kısımlarının antioksidan kapasitesini tespit ederek, ileride bu bitkiden yapılacak olan çalışmalara kaynak sunmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Trabzon'un Tonya İlçesi'nde yaklaşık 1300 metre rakımda bulunan Kadıralak Yaylası'nda yayılış gösteren *Scilla bifolia* araştırma materyalini oluşturmaktadır (Şekil 1). Örneklerin tür tespiti Mordak (1984) ve Güner vd. (2012)'ye göre yapılmıştır.



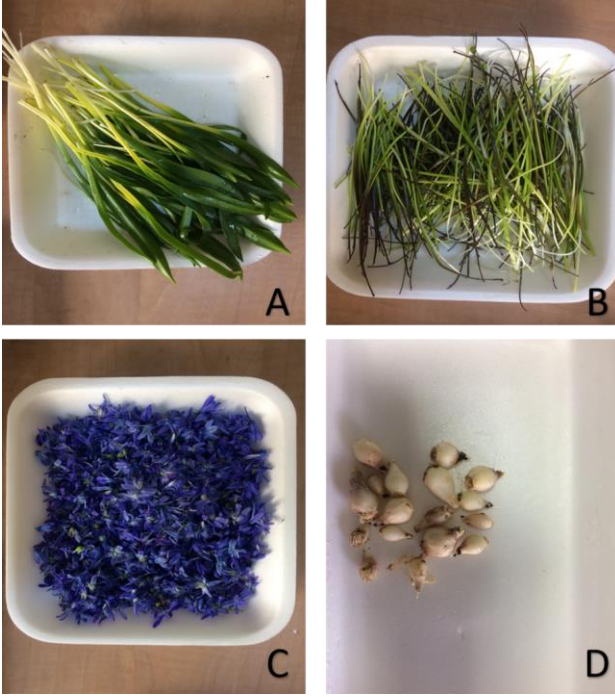
Şekil 1. *Scilla bifolia* bitkisinin doğal yaşam alanı (Trabzon-Kadıralak yaylası).

Figure 1. Natural habitat of *Scilla bifolia* plant (Trabzon-Kadıralak plateau).

Örnekler 1 Nisan 2018 tarihinde toplanmıştır. Örneklerin toplanmasında türün alanda hâkim olmasına, sağlıklı olmasına ve türe ait bireylerin belirli bir olgunluğa gelmiş olmasına dikkat edilmiştir. Yaklaşık olarak 20 adet bitki soğanıyla beraber toplanmıştır. Toplanan örnekler vakit kaybetmeden Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi su ürünleri işleme teknolojisi laboratuvarına getirilmiştir. Daha sonra örnekler çeşme suyu ile yıkanıp gövde, yaprak, çiçek ve soğan kısımları ayrıldıktan sonra 60°C'de 20 saat kurutulup vakum ambalajda oda sıcaklığında analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir. Bitkinin ayrılan kısımları Şekil 2'de gösterilmiştir.

Bitki ekstraktlarının çıkartılması işlemi:

Kurutulan örnekler blender yardımı ile tamamen homojen hale getirildikten sonra 20:1 (mL solvent / g bitki) oranında solvent ile (%60'lık etanol) karıştırıldıktan sonra 50°C'de 90 dakika boyunca ve 100 rpm çalkalama hızında su banyosunda (Darhan, WB-22) ekstraksiyon edilmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra örnekler 2500 rpm devirde 20 dakika santrifüj (Hettich Universal 320 R) işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar filtre kağıdından (Whatman no:1) süzülerek analizleri gerçekleştirilinceye kadar amber renkli cam şişede -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. *Scilla bifolia* L. bitkisinin kısımları. A: Yaprak, B: Skapus, C: Çiçek, D: Bulb.
Figure 2. The plant parts of *Scilla bifolia* L. A: Leaf, B: Scapus, C: Flower, D: Bulb.

% DPPH radikali süpürme aktivitesi ve Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAK): DPPH Brand-Williams vd (1995)'in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Yöntemin prensibi, DPPH solüsyonunun hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile elektronunun yer değiştirmesi sonucunda başlangıçtaki mor menekşe renginin kaybı ile 517 nm'de sarı renkli indirgenmiş form oluşmasına dayanmaktadır. 100µl bitki ekstraktı 3,9 ml DPPH çalışma çözeltisi solüsyonuna ilave edilmiştir. Karışım vorteks yardımı ile iyice karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika beklemeye alınmıştır. Daha sonra spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda kuantaz küvet kullanılarak kontrol örneğine karşı (100µl metanol ve 3,9 ml DPPH çalışma çözeltisi) okuma yapılmıştır. Örnekler 3 paralelli yapılmıştır ve her örneğin radikal süpürme aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{inhibisyon} = 100 * \frac{(A \text{ kontrol} - A \text{ örnek})}{A \text{ kontrol}}$$

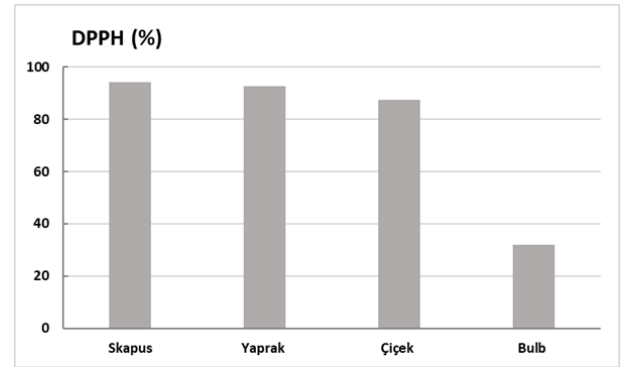
A kontrol: 515 nm dalga boyunda kontrolün absorpsiyonu
A örnek: 515 nm dalga boyunda örneğin absorpsiyonu

TEAK yönteminde ise troloks kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre gerekli hesaplamalar yapılarak sonuçlar g kuru ağırlık başına µmol troloks eşdeğeri olarak (µmol troloks/g) ifade edilmiştir (Kulczynski vd., 2020)

İstatistiksel Analiz: Elde edilen veriler, JMP Pro 13 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ortalama değerleri arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde $p < 0,05$ olasılık düzeyinde, tek yönlü varyans analizi ve Tukey post-hoc testi kullanılmıştır. Analizler 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada Trabzon'un Tonya ilçesinde bulunan Kadıralak yaylasından toplanan *Scilla bifolia* bitkisinin skapus, bulb, çiçek ve yarak kısımları ayrıldıktan sonra her bir kısmının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre DPPH radikali süpürme aktivitesi en yüksek bitkinin skapus kısmında (%94,20±0,36), en düşük bulb kısmında (%32,01±0,06) tespit edilmiştir. Yaprak ve çiçek kısımlarında elde edilen DPPH radikali süpürme aktivitesi ise sırasıyla %92,65±0,27 ve %87,41±0,34 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. *Scilla bifolia* bitki kısımlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri.

Figure 3. DPPH radical scavenging activities of the plant parts of *Scilla bifolia*.

Bitkinin farklı kısımlarından elde edilen DPPH radikali süpürme aktivitesi değerleri istatistiksel olarak incelendiğinde farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Özay vd. (2013) *Scilla autumnalis* bitkisinin bulb kısmından elde ettikleri ekstaktlarda DPPH radikali süpürme aktivitesini en yüksek %54,76 en düşük %26,19 olarak tespit etmiş olup mevcut çalışma ile benzerlik göstermektedir. Farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda DPPH radikali süpürme aktivitesini; İnci vd. (2019) mantar bitkisinin toprak üstü kısmında %1-20 arasında, Berktaş ve Çam (2020) iğde ağacının meyve ve yaprak kısmında sırasıyla %30,53 ve %3,6 olarak, Demir vd. (2019) nar kabuğunda %4,48, Ökmen vd. (2021) gündelik olarak yemeklerimizde kullanılan çeşitli baharatlarda %1,64-73,4 arasında ve Kulczynski vd. (2020) kestane kabağında %0,79 tespit etmiş olup çalışmada kullanılan *S. bifolia* bitkisinden elde edilen sonuçlardan düşük bulmuşlardır. Tablo 1'de farklı araştırmacıların çeşitli bitki ve meyvelerden elde edilen

ekstraktlardaki DPPH radikali süpürme aktiviteleri ve TEAK değerleri verilmiştir. Tablo 1'deki değerlere göre *S. bifolia* bitkisinin skapus ve yaprak ve çiçek kısımlarının

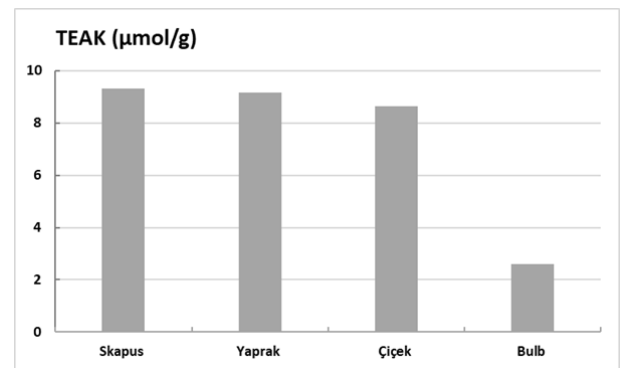
birçok meyve ve bitkiden daha yüksek antioksidan etki gösterdiği görülmektedir.

Tablo 1. Farklı bitki ve meyvelere ait DPPH radikali süpürme aktivitesi ve TEAK değerleri.

Table 1. DPPH radical scavenging activity and TEAK values of different plants and fruits.

Bitki adı	Bitkinin bölümü	Çözücü	DPPH (%)	TEAK (µmol /g)	Kaynak				
Limon	Kabuk	%50 etanol	25,62	92,30	Güzel ve Akpınar (2017)				
Mandalina			20,90	62,30					
Portakal			18,40	66,63					
Greyfurt			21,46	65,58					
Nane (<i>M. piperita</i>)			Bütünü	Etanol		1,64	1,67	Ökmen vd. (2021)	
Kuş üzümü (<i>R. nigrum</i>)	Yenilebilir kısım	%50 etanol	29,5	1,95	Fu vd. (2011)				
Çörek otu (<i>N. sativa</i>)			63,3	2,27					
Mercanköşk (<i>O. majorana</i>)			24,7	1,90					
Kekik (<i>T. serpyllum</i>)			52,8	2,17					
Kişniş (<i>C. sativum</i>)			73,4	2,38					
Safran (<i>C. sativus</i>)			72,8	2,37					
Kestane kabağı (<i>Cucurbita maxima</i>)			% 80 etanol (1 saat 50°C)	0,79		0,57	Kulczynski vd. (2020)		
Elma (Yeşil)			Yenilebilir kısım	%50 etanol			4,98		
Elma (kırmızı)							4,62		
Avokado							1,16		
Muz	3,44								
Yaban mersini	1,26								
Çeri domates	3,94								
Üzüm (yeşil)	1,27								
Üzüm (kırmızı)	3,95								
Limon	2,54								
Mango	4,01								
Kavun	2,92								
Erik (siyah)	6,48								
Erik (kırmızı)	5,22								
Uşkun bitkisi	Kabuksuz kısım				11-91		2,4-3,2		Meral (2017)
Üvez meyvesi (<i>Sorbus aucuparia</i>)	Meyve kısmı	Etanol-su			92,18				Bayram vd. (2019)
		Metanol-su	63,61						
		Aseton-su	64,74						
Meyan bitkisi (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	Kök	Etanol ve su		1,03-1,04	Durmaz vd. (2018)				
Zeytin (<i>Olea europaea</i> L.)	Yaprak	Normal su (25°C)	57,59-80,82		Kobyva vd. (2019)				
		Sıcak su (75°C)	85,71-88,20						
		Etanol (25°C)	48,26-90,20						
Sakız ağacı (<i>Pistacia lentiscus</i>)	Yaprak	Metanol	97,33		Amessis-Ouchemoukh vd. (2014)				
Mersin ağacı (<i>Myrtus communis</i>)	Meyve		88,75						
Mersin ağacı (<i>Myrtus communis</i>)	Yaprak		96,95						
Ada soğanı (<i>Scilla maritima</i>)	Bulb		56,31						
Karaderme (<i>Marrubium vulgare</i>)	Yaprak		52,04						
Deniz boğa dikeneni (<i>Eryngium maritimum</i>)	Kök		48,95						
Kürtre çiçeği (<i>Globularia alypum</i>)	Çiçek		84,76						
Mantar bitkisi (<i>Helvella leucomelaena</i>)	Toprak üstü kısmı	Metanol	1-20		İnci vd. (2019)				
İğde (<i>Elaeagnus angustifolia</i> L.)	Meyve	Metanol	30,53	38,68	Berktaş ve Çam (2020)				
	Yaprak		3,6	5,33					
Nar (<i>Punica granatum</i> L.)	Kabuk	Etanol (%33)	4,48	5,31	Demir vd. (2019)				

Çalışmadaki TEAK değerleri bitkinin farklı kısımlarına göre $9,32 \pm 0,03$ ile $2,59 \pm 0,00$ µmol/g arasında değişmekte olup, DPPH değerlerinde olduğu gibi skapus, yaprak ve çiçek kısımlarında en yüksek, bulb kısmında ise en düşük miktarda tespit edilmiştir (Şekil 4). Elde edilen TEAK sonuçları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0,05$)



Şekil 4. *Scilla bifolia* bitki kısımlarının TEAK değerleri
Figure 4. TEAK values of the plant parts of *Scilla bifolia*

SONUÇ

Bu çalışmayla birlikte Trabzon'un Tonya ilçesinden toplanan *S. bifolia* bitkisinin antioksidan aktivitesi (% DPPH radikal süpürme aktivitesi ve Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi miktarı) ilk defa saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilere göre *S. bifolia* bitkisinin yüksek oranda antioksidan kapasitesine ve biyoaktif bileşenlere sahip olacağı düşünülmekte olup, farmasötik ve gıda endüstrisinde potansiyel bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bununla yabani bitkilerin hastalıkları önleme ve tedavi etmede kullanılması üzerine daha fazla araştırma yapılması ve bu bitkilerin içeriklerinin belirlenerek yapılan bilimsel araştırmaların endüstriyel alana yönelik devamlılığın sağlanması bakımından önem teşkil edebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akyol, Y., Yetişen, K. & Özdemir, C. (2012).** *Scilla siberica* Haw. subsp. armena (Grossh.) Mordak (Liliaceae) Üzerine Morfolojik ve Anatomik Bir Çalışma. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, *12*(1), 43-47. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/akufemubid/issue/1593/19788>
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L., Serralheiro, M.L. & Araújo, M.E.M. (2014).** Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, *53*, 6-15. DOI: [10.1016/j.indcrop.2013.12.008](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.008)
- Bayram, Y., Torlak, Y. & Sağdıç, O. (2019).** Üvez Meyvesinin Antioksidan Aktivitesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *16*(16), 933-939. DOI: [10.31590/ejosat.589736](https://doi.org/10.31590/ejosat.589736)
- Brand-Williams, W. & Cuvelier, M.E. (1995).** Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, *28*, 25-30. DOI: [10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Berktaş, S. & Mustafa, Ç.A.M. (2020).** İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) Meyve ve Yapraklarının Antioksidan ve Antidiyabetik Özellikleri. *Akademik Gıda*, *18*(3), 270-278. DOI: [10.24323/akademik-gida.818125](https://doi.org/10.24323/akademik-gida.818125)
- Ceylan, Ş., Saral, Ö., Mehmet, Ö. & Harşit, B. (2017).** Yaban mersininin (*Vaccinium myrtillus* L.) farklı çözücü ekstraktlarındaki antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, *18*(1), 21-27. DOI: [10.17474/artvinofd.271088](https://doi.org/10.17474/artvinofd.271088)
- Demir, T., Akpınar, Ö., KARA, H. & Güngör, H. (2019).** Nar (*Punica granatum* L.) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antienflamatuar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, *17*(1), 61-71. DOI: [10.24323/akademik-gida.544647](https://doi.org/10.24323/akademik-gida.544647)
- Durmaz, H., Hülül, M. & Çelik, H. (2018).** Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) Bitkisinin Antibakteriyel ve Antioksidan Aktiviteleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Özel Sayı, 37-41. DOI: [10.31196/huvfd.501426](https://doi.org/10.31196/huvfd.501426)
- Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q. & Li, H.B. (2011).** Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food chemistry*, *129*(2), 345-350. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.04.079](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.079)
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (eds.) (2012).** *Türkiye Bitkileri Listesi, Damarlı Bitkiler*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, ISBN 978-605-60425-7-7. 1290 s, İstanbul.
- Güzel, M. & Akpınar, Ö. (2017).** Turunçgil kabuklarının biyoaktif bileşenleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *7*(2), 153-167. DOI: [10.17714/gufbed.2017.07.010](https://doi.org/10.17714/gufbed.2017.07.010)
- Hussain T., Arshad, M., Khan, S., Satar, H. & Qureshi, M.S. (2011).** In Vitro Screening of Methanol Plant Extracts for Their Antibacterial Activity. *Pakistan Journal of Botany*. *43*, 531-538. DOI: [10.1142/9789814354868_0024](https://doi.org/10.1142/9789814354868_0024)
- İnci, Ş., Kadioğlu Dalkılıç, L., Dalkılıç, S. & Kırbağ, S. (2019).** *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.'ın antimikrobiyal ve antioksidan Etkisi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, *20*(2), 249-253. DOI: [10.17474/artvinofd.601528](https://doi.org/10.17474/artvinofd.601528)
- Karadağ, A. (2019).** Türkiye'deki Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antioksidan Potansiyelleri ve Fenolik Kompozisyonları. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *16*(16), 631-637. DOI: [10.31590/ejosat.592711](https://doi.org/10.31590/ejosat.592711)
- Kavaklı, S.A. & Sarıkaya, A.G. (2019).** Uludağ (Bursa)'da Doğal Yayılış Gösteren *Scilla bifolia* L.'nin Bazı Morfolojik ve Fenolojik Özellikleri ile Yetiştirme Yeri Ait Gözlemler. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *16*(16), 454-459. DOI: [10.31590/ejosat.574256](https://doi.org/10.31590/ejosat.574256)
- Kobyay, O., Çağlak, E. & Kara, B. (2019).** Balıkesir-Ayvalık ve Trabzon-Çarşıbaşı 'ndan Toplanan Zeytin Yapraklarının (*Olea europaea* L.) Farklı Yöntemlerle Kurutulması ile Elde Edilen Ekstraktların Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkilerinin Karşılaştırılması. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, *4* (2), 257-262. DOI: [10.35229/jaes.584408](https://doi.org/10.35229/jaes.584408)
- Kulczynski, B., Gramza-Michalowska, A. & Krolczyk, J.B. (2020).** Optimization of extraction conditions for the antioxidant potential of different pumpkin varieties (*Cucurbita maxima*). *Sustainability*, *12*(4), 1305. DOI: [10.3390/su12041305](https://doi.org/10.3390/su12041305)

- Meral, R. (2017).** Farklı sıcaklık derecelerinin uşkun bitkisinin antioksidan aktivitesi ve fenolik profili üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(1), 88-94. DOI: [10.29133/yyutbd.285999](https://doi.org/10.29133/yyutbd.285999)
- Mordak, E.V. (1984).** *Scilla bifolia* L., Şu eserde: Davis PH (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 8: 216.
- Ökmen, G., Arslan, A., Vurkun, M., Mammadkhanli, M. & Ceylan, O. (2017).** Farklı Baharatların Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 15(1), 16-28.
- Ökmen, G., Arslan, K., Tekin, R., Camur, I. & Gorda, S. (2021).** Antimicrobial And Antioxidant Activities Of Different Spice Extracts. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, Özel Sayı*, 22, 421-429. DOI: [10.31590/ejosat.848958](https://doi.org/10.31590/ejosat.848958)
- Özay, C., Ermiş, A., Evgen, E., Kardeşler, A. & Çelik, A. (2013).** Antioxidant and free radical scavenging activity of *Scilla autumnalis* bulbs and leaves ethanolic extracts.
- Özhatay, N., Koçyiğit, M. & Bona, M. (2012).** *İstanbul'un Ballı Bitkileri*. İstanbul, BAL-DER 264 s.
- Özyurt, M., Kopar, H., Özyurt, S., Demirhan, İ. & Belge Kurutaş, E. (2021).** Menengiç, Işgın ve Çiriş Otu'nda Antioksidan Aktivitenin Araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(4), 733-737. DOI: [10.18016/ksutarimdog.vi.819974](https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.819974)
- Yıldırım, H. & Altoğlu, Y. (2017).** *Scilla bilgineri* (Asparagaceae: Scilloideae): a new species of *Scilla* L. from eastern Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 41 (1), 88-95. DOI: [10.3906/bot-1601-25](https://doi.org/10.3906/bot-1601-25)



The Effect of Whey on the Immune Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Remziye Eda YARDIMCI^{1*} Emre TURGAY¹ Sevdan YILMAZ² Can SARVAN³ Süheyla KARATAŞ¹

¹Faculty of Aquatic Science, Department of Aquaculture and Fish Diseases, Istanbul University, Istanbul, Turkey

²Faculty of Marine Science and Technology, Department of Aquaculture, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

³Institute of Science, Department of Aquaculture and Fish Diseases, Istanbul University, Istanbul, Turkey

Geliş/Received: 04.11.2021

Kabul/Accepted: 24.01.2022

Yayın/Published: 31.03.2022

How to cite: Yardımcı, R.E., Turgay, E., Yılmaz, S., Sarvan, C. & Karataş, S. (2022). The Effect of Whey on the Immune Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 15-20.

Atıf yapmak için: Yardımcı, R.E., Turgay, E., Yılmaz, S., Sarvan, C. & Karataş, S. (2022). Peynir Altı Suyunun (PAS) Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Bağışıklık Parametreleri Üzerine Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 15-20.

<https://orcid.org/0000-0001-7737-8739>
<https://orcid.org/0000-0001-9964-3919>
<https://orcid.org/0000-0002-4809-5809>
<https://orcid.org/0000-0003-2465-5434>
<https://orcid.org/0000-0003-2006-7854>

***Corresponding author:**

Remziye Eda YARDIMCI
Faculty of Aquatic Science, Department of
Aquaculture and Fish Diseases, Istanbul
University, Istanbul, Turkey
✉: etepecik@istanbul.edu.tr

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of whey on the immune system of cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). It was targeted to use whey, which is a by-product of the dairy industry, in the aquaculture industry as a promoter of fish immune system and as a source of fish feed protein. Rainbow trout individuals with an average weight of 70.28 ± 1.50 g were placed in 6 tanks with a stock density of 10 kg/m^3 . While fish meal (52%) was used as a protein source in the control group feeds, in the experimental group feeds whey powder (48%) was used. The fish were fed these pellet feeds that were isocaloric (21 kJ/g) and isonitrogenous (41% protein) for 3 weeks. Blood samples were collected once a week and while hematocrit and hemoglobin values were determined using a fully automated hematology analyzer, standard hemocytometry methods were used in erythrocyte and leukocyte counts. In addition, free radical production and complement 3 concentrations were determined quantitatively. According to the one-way ANOVA analysis, the control group and the experimental group were statistically similar ($p > 0,05$). However, it was found that C3 complement concentration, which was measured equally at the beginning in the control and experimental groups, showed a statistically significant increase ($p < 0,05$) in the experimental group compared to the control group in the second week.

Keywords: Diet, rainbow trout, whey, immune system, C3 complement.

Peynir Altı Suyunun (PAS) Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Bağışıklık Parametreleri Üzerine Etkisi

Öz: Bu çalışmanın amacı kültürü yapılan gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık sistemi üzerine peynir altı suyunun (PAS) etkisinin incelenmesidir. Süt ve süt ürünleri endüstrisi atığı olan PAS'ın akuakültür endüstrisinde balık bağışıklık sistemi destekleyicisi ve balık yemi protein kaynağı olarak kullanılması hedeflenmiştir. Ortalama ağırlığı $70,28 \pm 1,50$ g olan gökkuşığı alabalığı bireyleri 10 kg/m^3 stok yoğunluğunda olacak şekilde 6 adet tanka yerleştirilmiştir. Kontrol grubu yemlerinde protein kaynağı olarak balık unu kullanılırken deney grubu yemlerinde ise balık unu yerine PAS kullanılmıştır. Balıklar izokalorik (21 kJ/g) ve izonitrojenik (%41 protein) olarak hazırlanan bu pelet yemlerle 3 hafta boyunca beslenmiştir. Haftada birer kez olmak üzere balıklardan kan örnekleri alınmış; hematokrit ve hemoglobin değerleri tam otomatik hematoloji analizatörü ile belirlenmiş, eritrosit ve lökosit sayıları ise standart hemositometri yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Bunlara ek olarak oksidatif radikal üretimi ve kompleman 3 konsantrasyonu da kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak kontrol grubu ile deney grubu arasında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Bununla birlikte, kontrol ve deney grubunda başlangıçta eşit olarak ölçülen C3 kompleman konsantrasyonunun, deney grubunda ikinci haftada kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

***Sorumlu yazar:**

Remziye Eda YARDIMCI
İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi,
Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları
Bölümü, İstanbul, Türkiye
✉: etepecik@istanbul.edu.tr

Anahtar kelimeler: Diyet, gökkuşığı alabalığı, peynir altı suyu (PAS), bağışıklık sistemi, C3 kompleman.

INTRODUCTION

The rapid growth of aquaculture in recent years has been accompanied by increased demand for aquaculture feeds (Gatlin et al., 2007). Approximately 50-60% of the operating cost is feed expenses and the price of the fish meal used as the main protein source in fish feeds increases in proportion to the increasing aquaculture production (Rana et al., 2009). It is predicted that the current state of fish meal production will not meet the future needs of the developing aquaculture sector. For this reason, aquaculture feed industry has tried to replace fish meal and fish oil in feeds with sustainably produced vegetable raw materials, however, such protein sources may lack some indispensable amino acids such as methionine or lack components such as taurine, hydroxyproline and nucleotides (Bañuelos-Vargas et al., 2014).

To date, many studies have been conducted to replace fish meal such as soybean flour, corn gluten, wheat gluten and canola flour as vegetable protein, and it has been reported that the alternative vegetable protein sources adequately meet the amount of essential amino acids needed by rainbow trout (Bell and et al., 2001; Rosenlund et al., 2001; Caballero et al., 2002; Yang et al., 2011; Kriton et al., 2018; Yıldız et al., 2018). Diseases that lead to economic losses, the decreased number of effective antibiotics that can be used, and failures in treatment have directed the aquaculture feed industry to using food additives that can activate the fish's immune system (WHO, 2006).

Whey is a natural ingredient derived from fresh milk containing high quality proteins, lactose, bioactive ingredients, minerals and vitamins and is used in human and animal nutrition as a food additive that can activate the immune system (EWPA, 2020). Whey does not contain anti-nutritional factors, it can be easily given with other foods and it is easy to digest. Whey has been reported to have a probiotic effect associated with bioactive functions such as supporting tissue repair, destroying pathogens, and eliminating toxins (Clare et al., 2003). It has been observed that humoral immune responses and neutrophil levels have been increased in animals fed diets supplemented with whey. It has also been reported that whey proteins modulate immune functions and protect glutamine stores in the muscle by increasing the production of glutathione (GSH) in various tissues, an important part of the body's antioxidant protection system, which regulates immune functions. Therefore, combining whey proteins with diet is important because of providing strong immunity and health-protecting effect (Wong et al., 1997; Wong et al., 1998; Amer et al., 2019). While the mice fed with whey-added feeds did not change the cellular immune response functions, there was a significant increase in natural leukocyte cellular response

and lymphoid cellular response compared to the control group (Rutherford-Markwicket et al., 2005). Wong and Watson (1995) reported that the effect of whey on the immune system of mice increased cellular immune response in the 5th-8th week of feeding in their study.

The effect of whey on some blood parameters of male athletes was investigated by Eslami et al. (2010) and there was no difference in the blood parameters (such as WBC, RBC, HGB, HCT) of the athletes fed with 6.6 g whey every day for a month compared to the control group. Rusu et al. (2009) showed that different concentrations of whey on human neutrophils have no direct effect on chemotaxis, phagocytosis, oxidative metabolism and degranulation. Szczurek et al. (2013) investigated the effect of whey added to the breeding chicken feed on some blood parameters, it was reported that whey had no effect on blood leukocytes, hematocrit and hemoglobin, while increasing the number of erythrocytes. Abou-El-Atta et al. (2019), fed Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) with probiotic *Lactobacillus plantarum* and feeds with different ratios of whey added (1, 2 and 3 g/kg feed) and after 60 days, they examined the effects of fish on growth, antioxidant activity, lysozyme activity, NBT and some blood parameters. As a result of the study, it was found that feeding with high whey doses (2 and 3 g/kg feed) significantly increased the antioxidant capacity of fish, NBT, lysozyme and red blood cell count. In addition, the addition of 2 and 3 g/kg whey doses with *L. plantarum* has been reported to show synergistic effects and increase their resistance to *Aeromonas sobria*. Similarly, another study with Nile tilapias (*O. niloticus*) was investigated by adding whey in various ratios to fish feed and its effects on growth and some immune parameters (Amer et al., 2019). It has been reported that adding 27.7% PAS to feed instead of fish meal increases C3 complement, lysozyme and phagocytic activity without any pathological disorder in fish tissues.

In this study, some immune parameters of rainbow trout fed with pellet feeds prepared with whey, which is a valuable by-product due to its nutraceutical and pharmaceutical properties, were determined and the effects of whey on the immunity were investigated.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out in Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Marine Sciences and Technology. The rainbow trout with an average weight of 70.28 ± 1.50 g were stocked in 6 tanks (3 control, 3 experimental groups) each with 140 liters, with a stock density of 10 kg/m^3 . During the adaptation and the experiment, the water temperature was recorded as $15.2 \pm$

0.3°C, pH 7.85 ± 0.08 , and oxygen as 7.56 ± 0.16 mg/L. During the adaptation, there were no signs of disease in the fish and before the experiment, the fish were examined for bacteria and parasites.

The experimental and control groups were carried out triplicates and the experiment was carried out by providing 15% water change daily in a recirculated system with heating and cooling system. In the control group, anchovy fish meal (72% protein / 8% fat) at the rate of 52% was used as a source of protein in feeds. In the experimental group, Hardline Hipro Iso Whey concentrate (96% protein / 0.5% fat), a commercial product, was added to the feeds at the rate of 38%. The ration of the feed used in this study is given in Table 1. Pellet feeds were prepared in La Monferrina - P3 brand feed machine at Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Marine Sciences and Technology and feed analyzes were done according to AOAC (1998).

Table 1. Feed ration used in the experiment (% dry matter).

	Control Diet (%)	Experimental Diet (%)
Fish meal	52	0
WHEY	0	38
Soybean meal	0	0
Wheat flour	29	39
Wheat gluten	0	0
Tryptophan	0	0,2
Arginine	0	0,2
Mineral premix ^a	2	2
Protector	0.001	0.001
Vitamin premix ^a	2	2
Starch	3.499	4.599
Fish oil	11.500	14
Total	100	100
Analyzed proximate diet composition (% DM)		
Crude protein (%)	40.67	41.22
Lipid (%)	16.21	14.93
Ash (%)	6.34	0.52
NFE ^b (%)	27.32	35.60
Gross energy (kJg ⁻¹)	20.65	21.68

^aPremix of vitamins and minerals according to NRC (1993) recommendations for fish.

^bNFE: nitrogen-free extract calculated by difference

Blood samples from the fish in the experimental groups were collected on the 7th, 14th and 21st days. Five fish from each tank (15 fish per group) were used for the sampling. To do this, after the fish were caught randomly from the test tanks, they were treated with 2-Phenoxyethanol at 0.2 ml concentration (Summerfelt and Smith, 1990; Çetinkaya and Şahin, 2005). Blood samples were taken into K₃EDTA and gel serum tubes. From hematological analyzes, hematocrit and hemoglobin values were determined using Mindray / BC 3000 Plus fully automated blood count device, which was calibrated for fish (Yılmaz and Ergün, 2018; Yılmaz, 2018). In addition, erythrocyte and leukocyte counts were made from the blood samples by hemocytometry (Buckley et al., 1976; Hofmann and Lomel, 1984). For serum analysis, the blood taken into gel tubes was centrifuged at 5000 g for 10 minutes and the obtained serum samples were stored at -80°C until the analysis.

Oxidative radical production, nitro blue tetrazolium (NBT) activity was quantitatively determined according to the method reported by Siwicki et al (1996). In the quantitative determination of complement 3 concentration in fish serum, CUSABIO - Fish complement 3 (C3) ELISA Kit (Cat. No: CSB-E09727s) was used according to the manufacturer's instructions. To do this, briefly: 50 µl Standard solutions (in duplicate) and serum samples supplied with the kit were added to each well, then 50 µl HRP-conjugate and then 50 µl antibody were added. After washing and adding Substrate (A and B), the optical densities of the wells treated with stop solution after incubation at 37°C for 15 minutes in a dark environment, were measured at 450nm wavelength with a microplate reader.

One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was applied using the SPSS 21 software (IBM) and evaluated at a statistically significant level.

RESULTS AND DISCUSSION

Whey, which contains high quality proteins, bioactive components, minerals, as well as amino acids and vitamins that play a role in carbohydrate metabolism, constitutes 70-90% of the total milk volume. In cases where whey cannot be utilized, it must be removed from the environment by treatment. Because its high organic load, direct discharging to the nature leads to environmental pollution and the removal from the production facility is very expensive. This reason has led researchers to focus on the utilization of this waste product. The use of this product in human and animal health is rapidly increasing in both European Union and other countries (González-Siso, 1996; De Wit, 1998; Macwan et al., 2016). Although fish meal constitutes the main animal protein of fish food, because of low fish stocks and high cost of fish meal, novel protein sources are needed. In Turkey, there is a study conducted to investigate the effect of whey protein on various biochemical parameters in the tissues of rainbow trout by Özcan et al. (2021). They feed rainbow trout with fed diets containing four doses of whey protein for 42 days and found that the lipid levels of fish fed diets with 1.5% whey protein was essentially higher than that of fish fed the control diet. They suggested that whey could be an alternative protein sources.

In this study, blood and immune parameters between the control group and the experimental group were analyzed statistically with samples taken over a 3-week period. The red blood cell count, leukocyte cell count, NBT activity, hemoglobin value and hematocrit value of the control and experimental groups were statistically similar ($p > 0.05$). The mean values/counts of erythrocyte, leukocyte, NBT activity, hemoglobin, hematocrit, C3 complement and weekly standard deviations are shown in Figure 1.

A statistically significant ($p < 0.05$) increase was observed in the C3 complement concentration, which was measured equally in the control and experimental group at the beginning, compared to the control group in the second week (Figure 2). When the findings obtained in this study

evaluated, it was determined that whey had no effect on blood parameters. This result is opposed to the results of Amer et al. (2019) and Abou-El-Atta et al. (2019), but similar to Rusu et al. (2009) and Wong and Watson (1995).

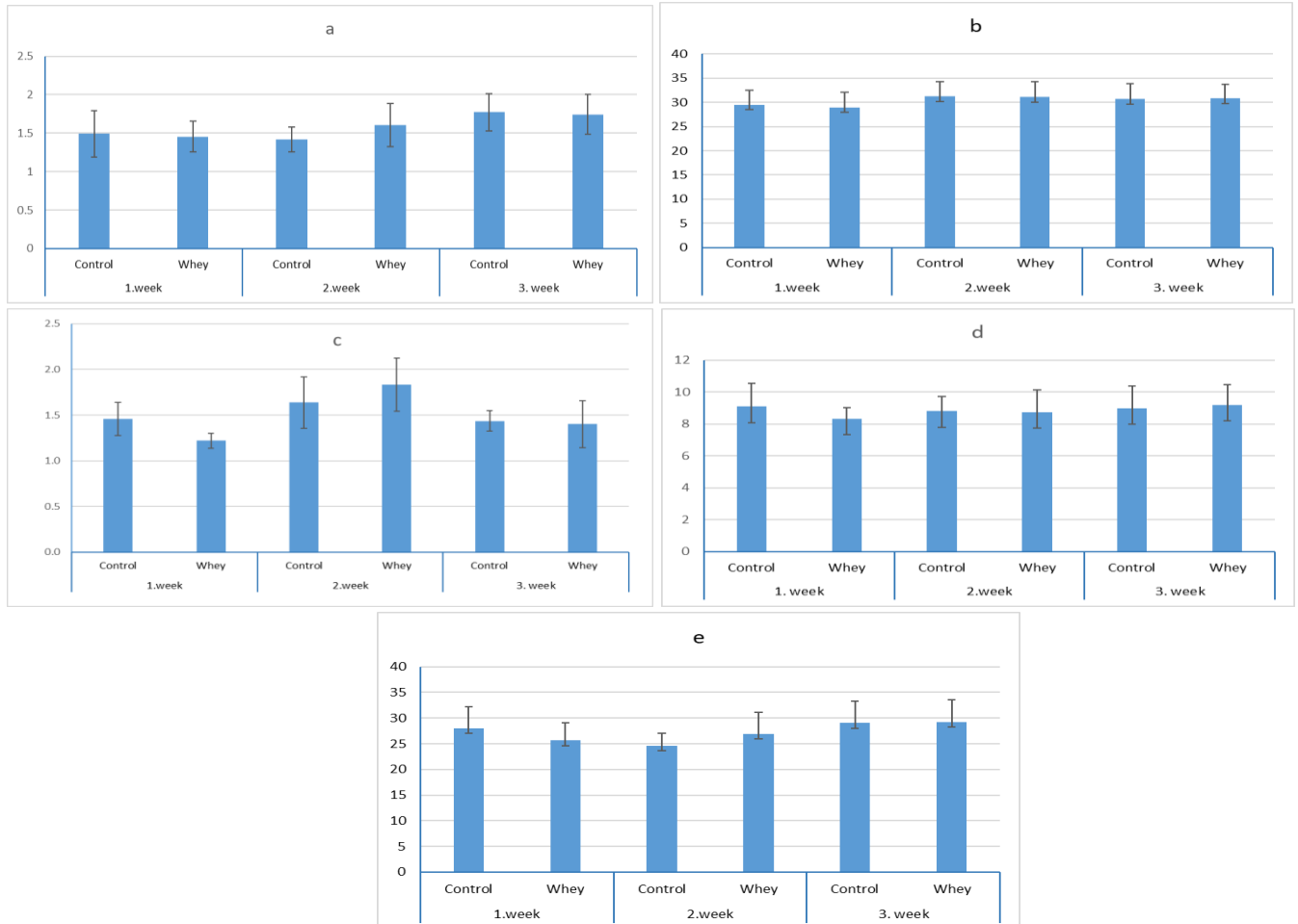


Figure 1. The mean values of (a) erythrocyte count ($10^6/\text{mm}^3$), (b) leukocyte count ($10^3/\text{mm}^3$), (c) NBT activity (mg/ml), (d) hemoglobin (g/100 ml), (e) hematocrit (%) (N = 15).

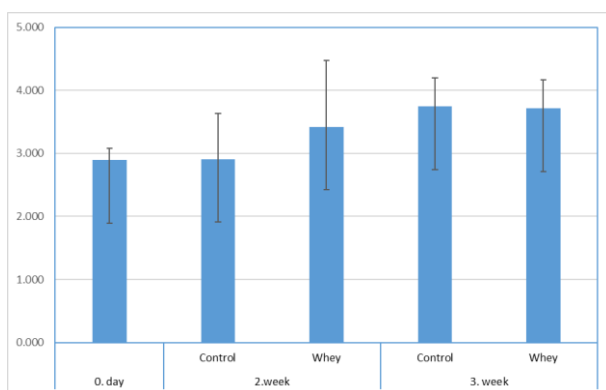


Figure 2. The mean values of C3 complement concentrations ($\mu\text{g/ml}$).

The use of whey which can help reduce the use of feed additives imported from abroad and used extensively in aquaculture, was investigated in this study. As a result, the use of whey in fish did not have any negative effects on

the fish during the research and in terms of the parameters examined. In the future studies, investigating the effects of whey on the immune system by feeding with different ratios and for longer periods of time will provide more accurate results regarding this protein source.

ETHICAL APPROVAL

This study was carried out the approval of Istanbul University Animal Experiments Local Ethics Committee (Decision no: 2015/21).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out with the support of Istanbul University Scientific Research Projects Unit, Project no:55025 (ID:3372).

REFERENCES

- Abou-El-Atta, M.E., Abdel-Tawwab, M., Abdel-Razek, N. & Abdelhakim, T.M.N. (2019). Effects of dietary probiotic *Lactobacillus plantarum* and whey protein concentrate on the productive parameters, immunity response and susceptibility of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), to *Aeromonas sobria* infection. *Aquaculture Nutrition*, **25**, 1367-1377.
- Amer, S.A., Osman, A., Al-Gabri, N.A., Elsayed, S.A.M., Abd El-Rahman, G.I., Elabbasy, M.T., Ahmed, S.A.A. & Ibrahim, R.E. (2019). The effect of dietary replacement of fish meal with Whey protein concentrate on the growth performance, fish health, and immune status of Nile tilapia fingerlings, *Oreochromis niloticus*. *Animals*, **9**, 1003.
- AOAC. (1998). Official methods of analysis (15 ed.). Arlington, VA, AOAC.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jiménez, A. & Peres, H. (2014). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of *Totoaba juveniles (Totoaba macdonaldi)*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, **170**, 18-25.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J. & Sargent, J.R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of Nutrition*, **131**, 1535-1543.
- Buckley, J.A., Whitmore, C.M. & Matsuda, R.I. (1976). Changes in blood chemistry and blood cell morphology in Coho Salmon (*O. kisutch*), following exposure to sublethal levels of total residual chlorine in municipal wastewater. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **33**, 776-782.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. & Izquierdo, M.S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **214**, 253-271.
- Çetinkaya, O. & Şahin, A. (2005). Anaesthesia applications on fish and main anaesthetics. In: M. Karatas (ed.) *Research Techniques in Fish Biology*. Part 9, 237-275p, Nobel Publishing, Ankara.
- Clare, D., Catignani, G. & Swaisgood, H. (2003). Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, **9**, 1239-1255.
- De Wit, J. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, **81**(3), 597-608.
- Eslami, S., Karandish, M., Marandi, M.S. & Zand-Moghaddam, A. (2010). Effects of Whey protein supplementation on hematological parameters in healthy young resistance male athletes. *Journal of Applied Sciences*, **10**, 991-995.
- EWPA. (2020). European Whey Processors Association (EWPA) web sitesi. <http://ewpa.euromilk.org/pub/benefitsofwhey/whey-protein-can-benefit-many-people.html> (Ziyaret tarihi: 19.05.2020)
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R. & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, **38**, 551-579. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x
- Gonzalez-Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, **57**, 1-17.
- Hofmann, R. & Lomel, R. (1984). Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, **24**, 245-251.
- Jobling, M. (2016). Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International*, **24**(3), 767-786.
- Kriton, G., Dimitra, K., Corraze, G., Jaume, P.S., Adorjan, A. & Zsuzsanna, J.S. (2018). Impact of diets containing plant raw materials as fish meal and fish oil replacement on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*) freshness. *Journal of Food Quality*, Volume 2018, Article ID 1717465, 14 pages. DOI: 10.1155/2018/1717465
- Macwan, S.R., Bhumika, K.D., Parmar, S.C. & Aparnathi, K.D. (2016). Whey and its utilization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **5**(8), 134-155. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.508.016
- Özcan, M., İspir, Ü., Şahin, A. (2021). Effects of Whey Protein on Biochemical Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **6**(2), 170-173. DOI: 10.35229/jaes.828969
- Rana, K.R., Siriwardena, S. & Hasan, M.R. (2009). *Impact of Rising Feed Ingredient Prices on Aquafeeds and Aquaculture Production*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rosenlund, G., Obach, A., Sandberg, M.G., Standal, H. & Tveit, K. (2001). Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and

- quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, **32**, 323-328.
- Rusu, D., Drouin, R., Pouliot, Y., Gauthier, S. & Poubelle, P.E. (2009).** A bovine Whey protein extract can enhance innate immunity by priming normal human blood neutrophils. *The Journal of Nutrition*, **139**(2), 386-393.
- Rutherford-Markwick, K.J., Johnson, D., Cross, M.L. & Gill, H.S. (2005).** Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. *Nutrition Research*, **25**, 192-203.
- Siwicki, A.K., Miyazaki, T., Komatsu, I. & Matsusato, T. (1996).** *In vitro* influence of heat extract from firefly squid *Watasenia scintillans* on the phagocyte and lymphocyte activities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, **31**(1), 1-7.
- Summerfelt, R.C. & Smith, L.S. (1990).** Anaesthesia, surgery and related techniques. In: C.B. Schreck and P.B. Moyle (eds.) *Methods for Fish Biology*. 213-272p., American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- Szczurek, W., Szymczyk, B., Arczewska-Wlosek, A., Józefiak, D. & Alloui, M.N. (2013).** The effects of dietary whey protein concentrate level on performance, selected intestinal tract and blood parameters, and thiobarbituric acid reactive substances in the liver and breast meat of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **22**(4), 342-353.
- Tacon, A.G.J. & Metian, M. (2008).** Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**(1-4), 146-158.
- WHO, 2006.** World Health Organization Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance: Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006. ISBN 92 4 159512 4
- Wong, C.W. & Watson, D.L. (1995).** Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *Journal of Dairy Research*, **62**(2), 359-368.
- Wong, C.W., Seow, H., Husband, A., Regester, G. & Watson, D.L. (1997).** Effects of purified bovine whey factors on cellular immune functions in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **56**, 85-96.
- Wong, K., Middleton, N., Montgomery, M., Dey, M. & Carr, R. (1998).** Immunostimulation of murine spleen cells by materials associated with bovine milk protein fractions. *Journal of Dairy Science*, **81**, 1825-1832.
- Yang, Y.H., Wang, Y.Y., Lu, Y. & Li, Q.Z. (2011).** Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, **19**, 405-419.
- Yıldız, M., Eroldoğan, T.O., Ofori-Mensah, S., Engin, K. & Baltacı, M.A. (2018).** The effects of fish oil replacement by vegetable oils on growth performance and fatty acid profile of rainbow trout: re-feeding with fish oil finishing diet improved the fatty acid composition. *Aquaculture*, **488**, 123-133.
- Yılmaz, S. & Ergün, S. (2018).** Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish & Shellfish Immunology*, **78**, 140-157.
- Yılmaz, S. (2018).** *Balık İmmunolojisi Analiz Yöntemleri/Methods of Fish Immunology Analysis*. Paradigma Akademi Kitabevi Yayınları, İSTANBUL, 105 sayfa.



The Determination of Antibiotic Resistance and Biofilm Properties in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Raw Milk Samples

Sadık SAVAŞAN^{1*} Merve Gizem SEZENER²

¹Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Adnan Menderes, Aydın, Turkey

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey

Received: 06.11.2021

Accepted: 05.02.2022

Published: 31.03.2022

How to cite: Savaşan, S. & Sezener, M.G. (2022). The Determination of Antibiotic Resistance and Biofilm Properties in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Raw Milk Samples. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 21-26.

Atıf yapmak için: Savaşan, S. & Sezener, M.G. (2022). Çiğ Süt Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 21-26.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5077-3189>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0487-7515>

*Corresponding author's:

Sadık SAVAŞAN
University of Adnan Menderes, Faculty of
Veterinary Medicine, Department of Food
Hygiene and Technology Aydın, Turkey.
✉: sadiksavasan@hotmail.com

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the antibiotic resistance profiles and biofilm formation properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolates isolated from raw milks. A total number of 300 raw milk samples were collected from several dairy plants and vendors in the provinces of Aydın (n=100), İzmir (n=100) and Muğla (n=100) in Turkey. The conventional methods were used for the isolation of suspected *Pseudomonas* spp. from raw milk samples. A total of 63 suspected *Pseudomonas* spp. were isolated and these isolates were identified as being *P. aeruginosa* by PCR using PA-SS primers targeted to 16SrDNA gene. According to PCR results, 24 isolates were identified as *P. aeruginosa*. The antibiotic resistances of *P. aeruginosa* against 7 antibiotics were determined by Kirby-Bauer Disc Diffusion method. The antibiotic resistance rates of the isolates among enrofloxacin, ceftriaxone, ciprofloxacin, meropenem, colistin, gentamycin, and azithromycin were found as 20.8%, 75.0%, 4.2%, 33.3%, 8.3%, 12.5 % and 91.7%, respectively. When examined according to multidrug resistances, it was determined that 11 isolates (45.8%) were resistant to more than three antibiotic groups and were evaluated as multi-resistant. The biofilm formations of the isolates were investigated *in vitro* with Congo Red Agar (CRA) Method. The biofilm formation was determined at 9 isolates as the ratio of 37.5% with CRA method. The biofilm formation and multidrug resistance rates were found as high in the raw milk isolates of *P. aeruginosa*. In conclusion, the raw milk had considered to be a potential public health problem for *P. aeruginosa* and the widespread studies thought to be performed for the lightening of the biofilm related antibiotic resistances.

Keywords: Antibiotic resistance, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, raw milk.

Çiğ Süt Örneklerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Öz: Bu çalışmada çiğ sütlerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profillerinin ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla Aydın (n=100), İzmir (n=100) ve Muğla (n=100) illerindeki çeşitli süt işletme ve satıcılarından toplam 300 adet çiğ süt örneği toplandı. *Pseudomonas* spp. izolasyonu için geleneksel yöntemler kullanıldı. Çiğ süt örneklerinden toplam 63 şüpheli *Pseudomonas* spp. izole edildi ve bu izolatların *P. aeruginosa* yönünden identifikasyonu PA-SS primerleri kullanılarak 16S rDNA genini hedef alan PCR ile gerçekleştirildi. PCR sonuçlarına göre 24 izolat *P. aeruginosa* olarak tanımlandı. *P. aeruginosa* izolatlarının 7 antibiyotik karşı antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi. İzolatların enrofloksasin, seftriakson, siprofloksasin, meropenem, kolistin, gentamisin ve azitromisin antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla %20,8, %75,0, %4,2, %33,3, %8,3, %12,5 ve %91,7 olarak bulundu. Çoklu antibiyotik dirençlerine göre

[¹] This study was produced from the master thesis.

***Sorumlu yazar:**

Sadık SAVAŞAN
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı Aydın, Türkiye
✉: sadiksavas@hmail.com

incelendiğinde 11 izolatın (%45,8) üç'ten fazla antibiyotik grubuna dirençli olduğu belirlendi ve çoklu dirençli olarak değerlendirildi. İzolatların biyofilm oluşumları *in vitro* olarak Congo Red Agar (CRA) yöntemi ile araştırıldı. Biyofilm oluşum oranları CRA yöntemi ile 9 izolatla % 37,5 (9/24) olarak belirlendi. *P. aeruginosa*'nın çiğ süt izolatlarında biyofilm oluşumu ve çoklu antibiyotik direnç oranları yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak çiğ süt örneklerinin *P. aeruginosa* için potansiyel halk sağlığı sorunu olduğu belirlendi ve bu durum ile biyofilm kaynaklı antibiyotik dirençliliklerinin aydınlatılması için daha geniş çaplı çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, biyofilm, çiğ süt, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCTION

Charles-Emmanuel Sedillot was the first to characterize *Pseudomonas* in 1850. According to their rRNA homology, bacteria in the genus *Pseudomonas* are divided into five primary species clusters. *Pseudomonas aeruginosa* belongs to Group I's fluorescence subgroup (Brooks et al., 2007). In many animal species, *P. aeruginosa* causes opportunistic infections. Due to its opportunistic nature, *P. aeruginosa* thrives in the feces and skin of healthy animals, and any predisposing circumstances that depress the immune system of animals or disrupt the natural flora cause infection. *P. aeruginosa* pathogenicity is influenced by a variety of virulence factors. Flagella, fimbria (pilus), and lipopolysaccharide, polysaccharide capsule are among these virulence factors. The toxin and enzyme virulence factors of bacteria are phospholipase C (hemolysin), alginate-biofilm, siderophores (pyoverdine, pyocyanin, pyochelin), elastase (LasB and LasA), protease, leukocidin, exotoxin A, exotoxins S and T. Many of these virulence factors must coexist for bacteria to cause disease (Moore & Flaws, 2011).

Because of developing resistance to several medications, *P. aeruginosa* infections are extremely difficult to treat. Broad-spectrum penicillins, third-generation cephalosporins, carbapenems, monobactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, and polymyxins are the most often used and therapeutically effective antibiotics for *P. aeruginosa* infections. Combinations of antibiotics are used in the treatment of infections in addition to the early and appropriate use of a single antibiotic. In general, combining aminoglycosides with beta-lactams, third-generation cephalosporins, monobactams, or carbapenems increases the likelihood of a successful treatment (Pitt & Simpson, 2006).

Biofilm generation is one of the most common reasons for *P. aeruginosa* treatment failure. Exopolysaccharide (EPS) in the biofilm structure is thought to have a crucial role in the bacterium's capacity to survive, and when EPS is eliminated from the biofilm under experimental settings, the bacteria become more susceptible to antimicrobial treatments (Watnick & Kolter, 2000). There's evidence that during attachment, the first stage of biofilm development, the levels of several genes rise. The microcolonies develop into biocide-resistant

exopolysaccharide-coated communities after attachment. Many infectious diseases can be treated with effective antibiotic treatments. However, in cases where bacterial biofilms are mostly involved, this approach cannot provide an effective solution. Biofilms are thought to have this resistance through multiple mechanisms. The antimicrobial agent does not pass through all layers of the biofilm. It is known that polymeric substances in the biofilm matrix complicate the diffusion of antibiotics. This means that they never reach a sufficient concentration of antibiotics. At least some of the cells in the biofilm are nutrient deficient and therefore have to enter a slow growth phase. Slow-growing or non-growing cells are not susceptible to many antimicrobial agents and many can survive. There is an exchange of resistance genes between bacteria in the biofilm (Çiftçi et al., 2005).

In a literature, there are few informations about biofilm related antibiotic resistances in raw milk originated *P. aeruginosa*. In this study, it was aimed to determine the presence of biofilms and antibiotic resistances in *P. aeruginosa* isolates from raw milks.

MATERIAL AND METHOD

Sample collection: A total number of 300 raw milk samples were collected from several dairy plants and vendors in the provinces of Aydın (n=100), İzmir (n=100), and Muğla (n=100) in Turkey. The samples were transported to the laboratory in steril bags with cold conditions.

Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa*: 10 mL of raw milk samples were added to 90 mL of 0.1% mL peptone water under aseptic conditions and that were homogenized with stomacher. Then 10⁻² dilutions were prepared and 0.1 mL from this dilution were plated onto *Pseudomonas* Cephaloridine-Fucidin-Cetrimide (CFC) agar (Oxoid, SR103) by spread plate method. The plates were incubated 24-48 h at 30°C. The colonies which grew in *Pseudomonas* CFC agar and oxidase test positivity (oxidase paper, Merck 13300) were determined as suspected to be *P. aeruginosa*. (Mickova et al., 1989; Küplülü et al., 2003).

The suspected isolates were identified as being *P. aeruginosa* by PCR (Table 1). The pair PA-SS-F and PA-SS-R was designed to amplify only *P. aeruginosa*. These primers targeted species-specific signature sequences in 16S

rDNA variable regions 2 and 8 (V2 and V8), respectively (Spilker et al., 2004). Based on the 16S rDNA sequences, PA-SS region was designed simple, rapid, and accurate PCR assays that allow the differentiation of *P. aeruginosa* from other *Pseudomonas* species. Because of this reason, PA-SS oligonucleotide primers were used in PCR. The 956 bp band after PCR was considered positive for *P. aeruginosa*.

Determination of antibiotic resistance profiles:

Kirby-Bauer Disk Diffusion method was used to determine the antibiotic susceptibility of the isolates (CLSI, 2018). For this purpose, antibiotic discs of azithromycin (30 µg), gentamicin (10 µg), colistin (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ceftriaxone (30 µg), enrofloxacin (5 µg) were used. At the end of the incubation, the inhibition zone diameters were measured and the antibiotic susceptibilities of the isolates were evaluated according to the values reported in EUCAST (2018) and CLSI (2018).

Determination of in vitro biofilm production:

Biofilm formation of the isolates was investigated *in vitro* using Congo Red Agar (CRA) method. CRA method was carried out with the method reported (Atshan et al., 2012). For this aim, CRA was prepared with 10 grams of agar, 50 grams of glucose, 37 grams of Brain-Heart Infusion Broth,

and 0.8 grams of Congo red dye in 1000 mL of distilled water. By taking a single colony from the purely breeding colonies in TSA, it was transferred to CRA. The media were incubated at 37°C for 24-48 hours under aerobic conditions. At the end of the incubation period, the color changes in the colonies were evaluated. Isolates with black-gray colony formation on CRA were evaluated as positive for biofilm production, and pink-red colonies were evaluated as negative.

RESULTS

Isolation and identification: The suspected *Pseudomonas* spp. were isolated from 63 (21%) of 300 raw milk samples. Based on the distribution of 63 suspected *Pseudomonas aeruginosa* raw milk samples, 17 (27%) were isolated from Aydın, 21 (33.3%) from İzmir and 25 (39.7%) from Muğla. The twenty-four (38.1%) of 63 suspected isolates were determined as *P. aeruginosa* after PCR. Of the 24 *P. aeruginosa* isolates, 5 (20.8%) isolates were from Aydın, 8 (33.3%) isolates were from İzmir and 11 (45.8%) isolates were from Muğla originated raw milk samples.

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used for identification of *Pseudomonas aeruginosa*.

Primers	Oligonucleotide sequences	Expected amplicon sizes (bp)	Reference
PA-SS	F GGGGGATCTTCGGACCTCA	956	Spilker et al., (2004)
	R TCCTTAGAGTGCCACCCG		

Table 2. Antibiotic resistance profiles of the isolates.

	Antibiotics						
	ATM n (%)	GEN n (%)	C n (%)	MRP n (%)	CIP n (%)	CTX n (%)	ENR n (%)
R	22 (91.7)	3 (12.5)	2 (8.3)	8 (33.3)	1 (4.2)	18 (75.0)	5 (20.8)
I	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
S	2 (8.3)	21 (87.5)	22 (91.7)	16 (66.7)	23 (95.8)	6 (25.0)	19 (79.2)

*S: sensitive, I: intermediate resistant, R: resistant, ATM: azithromycin, GEN: gentamicin, C: colistin, MRP: meropenem, CIP: ciprofloxacin, CTX: ceftriaxone, ENR: enrofloxacin.

Determination of antibiotic resistance profiles:

By Kirby-Bauer Disc Diffusion Method applied to *P. aeruginosa* isolates, resistances of 20.8% for enrofloxacin, 75.0% for ceftriaxone, 4.2% for ciprofloxacin, 33.3% for meropenem, 8.3% for colistin, 12.5% for gentamicin, and 91.7% for azithromycin were determined (Table 2). When examined according to multidrug resistances, it was determined that 11 isolates (45.8%) were resistant to more than three antibiotic groups and were evaluated as multidrug resistant (Table 3).

Table 3. The multidrug resistance profiles of the isolates.

The number of antibiotics (n)	<i>P. aeruginosa</i>	
	n	%
4	3	12.5
3	8	33.3
2	18	75.0

Determination of in vitro biofilm production:

The biofilm formation status of *P. aeruginosa* isolates (n=24) was investigated by CRA method, and it was determined that nine isolates (37.5%) had biofilm activity.

DISCUSSION AND CONCLUSION

P. aeruginosa has been known as a common opportunistic pathogen that reasons cause nosocomial infections in patients with immunocompromise. *P. aeruginosa* infection in many patients is a public health problem. In the study that was aimed to prevalence the exotoxin genes encoded type III secretion system and pattern of antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* isolated from clinical and raw milk specimens, 6 (5%) of 120 raw milk samples were found positive for *P. aeruginosa* (Jarjees, 2020). This isolation prevalence is lower than the isolation prevalence of this study that was

as 24 isolates from total of 300 raw milk samples (8%). A total of 14 raw milk samples were collected from several dairy plants in Ankara, Turkey for the isolation of *Pseudomonas* spp. and a total of 55 isolates were isolated by using Cetrimide Agar. *Pseudomonas* spp. accounted for 85.5% of the total isolates and among these isolates *P. aeruginosa* accounted as 34.6% (Akoğlu et al., 2012), and that is too higher than our isolation prevalence. The 120 retail samples of raw milk, Kareish cheese and butter were carried out to determine the presence of *Pseudomonas* spp. and a total of 25 (83.3%) *P. aeruginosa* strains identified from 30 raw milk samples (Sadek et al., 2006) as nearly 10 times higher than the prevalence of this study. The 50 raw milk samples from various villages in the provinces of Kayseri and Niğde in Turkey were collected and a total of 1 (2%) *P. aeruginosa* strain were isolated (Taş et al., 2013) as 4 times lower than the prevalence of our study. It was aimed to detect the prevalence of *P. aeruginosa* in milk (n=125) samples which were collected from local vendors, private dairy farms in and around Tirupati and *P. aeruginosa* was isolated from total of 19 (15.2%) milk samples (Swetha et al., 2017) and this prevalence is nearly 2 times higher than the prevalence in our study. The collected raw milk samples (n=75) from various local milk collection centers in different parts of Kanchipuram district, South India to enumerate and examined to identify bacteria with proteolytic and lipolytic activity. *P. aeruginosa* was isolated from total of 7 (9.3%) raw milk samples (Parkash et al., 2007) as nearly similar to the prevalence in this study. A total of 100 random samples of raw milk from different markets in Port-Said city were collected for isolation and identification of *Pseudomonas* species. Six isolates of *Pseudomonas* species were isolated from 100 raw milk samples and all the 6 (6%) isolates were identified as *P. aeruginosa* (Mohammed et al., 2015). This prevalence is lower than the prevalence in our study. It was reported that *P. aeruginosa* from 11 (5.5%) raw milk samples was isolated from total of 200 raw milk samples (Uraz and Çıtak, 1998) and this prevalence is lower than the prevalence we found in our study. A total of 200 samples of raw and pasteurized milk (100 of each) were collected from supermarkets in Qaluobia Governorate and examined for prevalence and characterization of *P. aeruginosa*. The incidence of *P. aeruginosa* isolated from raw milk was 40% (El-Roos et al., 2013) and this prevalence is 5 times higher the prevalence of our study.

P. aeruginosa is considered as one of the major pathogens of fleece rot in sheep, mastitis and abortion in cattle, metritis and corneal ulcer in horses, otitis externa in dogs, hemorrhagic pneumonia in mink, embryo death in poultry, necrotic stomatitis in cage snakes, botryomycosis, septicemia, animal urinary system infection, and wound infection. Anti-pseudomonal penicillins, aminoglycosides,

cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem and imipenem are antibiotics of choice for *P. aeruginosa* infections. *P. aeruginosa* infections are very difficult to treat because the bacteria can develop resistance to many antibiotics. Due to the importance of multidrug resistance in *P. aeruginosa* strains, antimicrobial susceptibility tests are considered important. In this study, Kirby-Bauer Disk Diffusion Method and antibiograms were applied on *P. aeruginosa* isolates. Antibiotic resistance rates of enrofloxacin, ceftriaxone, ciprofloxacin, meropenem, colistin, gentamycin and azithromycin isolates were determined as 20.8%, 75.0%, 4.2%, 33.3%, 8.3%, 12.5% and 91.7%, respectively. In a study conducted in 2012 included in the reports of the National Antimicrobial Resistance Surveillance System (UAMDSS), the antibiotic susceptibility status of 1209 *P. aeruginosa* strains was determined.

In this study, it was reported that the highest resistance was against azithromycin (91.7%), the second highest resistance was against ceftriaxone (75.0%) and the lowest resistance was against ciprofloxacin (4.2%). Resistance to meropenem was 33.3%, enrofloxacin resistance rate was 20.8%, gentamicin resistance rate was 12.5% and colistin resistance rate was 8.3%. As a result of the comparison of the 2012 data published by UAMDSS and EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), which includes 30 countries, it was seen that the resistance against piperacillin / tazobactam, ceftazidime and fluoroquinolones in our country was above the European average. According to this report, the rate of antibiotic resistance in strains acquired in Turkey appears to be higher than the European average.

It is known that the vegetative / planktonic forms of microorganisms as well as biofilm structures play an important role in the pathogenesis of many infectious diseases including *P. aeruginosa*. With the increase in the prevalence of biofilm infections, research on the control and prevention of biofilm formation has gained momentum. Today, many different *in vitro* and *in vivo* methods based on biofilm infection in experimental animals are used to detect biofilm formation with the help of developing technology. CRA, Christensen and microplate methods stand out as frequently used methods in detecting biofilm formation. Yassein et al., (1995) detected the presence of biofilm in 40% of 50 *P. aeruginosa* strains isolated from clinical samples. Delissalde and Amabile-Cuevas, (2004) reported biofilm formation in 18% of 162 *P. aeruginosa* isolates, which are hospital infection agents. Moskowitz et al., (2005) reported positive biofilm formation in 73% of 96 strains isolated from various services and clinics. According to Coban et al., (2009) reported that 33.3% of 60 *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis had biofilm

positivity. Biofilm positivity was found by Yıldırım et al., (2008) and Çelik et al., (2007) in 45% and 48% of the isolates, respectively. Milivojevic et al., (2018) reported that 93% of animal and 96% of human isolates formed biofilms *in vitro* in their study on a total of 202 *P. aeruginosa* isolates from 121 animals and 81 human origins. Olejnickova et al., (2014) found that the rate of biofilm production in isolates originating from human catheters varied between 80-88% and reported that studies on animal isolates were very limited. The rate of biofilm formation in *P. aeruginosa* isolates from canine otitis was reported as 40% and these isolates did not respond to treatment (Pye et al., 2013). In our study, biofilm formation status of isolates was investigated by CRA method. It was determined that 9 (37.5%) isolates according to the CRA method. These results indicated that the biofilm formation were high in raw milk isolates of *P. aeruginosa* strains.

In conclusion, biofilm production and multidrugresistance were found to be high in clinical isolate *P. aeruginosa* strains. At the genetic level, it was determined that the examined genes were not solely responsible for biofilm formation and related antibiotic resistance. This suggests that different and more genetic and phenotypic parameters may be responsible for biofilm-induced antibiotic resistance. These results indicated that the raw milk had considered to be a potential public health problem for *P. aeruginosa*. The widespread and advanced studies thought to be performed for the lightening of this situation and determining the relevant parameters and to elucidate the mechanisms of biofilm-associated antibiotic resistance.

REFERENCES

- Akoğlu, A., Altuntaş, E.G. & Yemiş, G.P. (2012). A Modified Selective Medium Containing Benzalkonium Chloride (BKC) for the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Raw Milk. *Food and Nutrition Sciences*, 3(7), 947-950.
- Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad, E. & Pei, C.P. (2012). Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 201, 417-427.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. & Morse, S.A. (2007). *Pseudomonas*, *Acinetobacters*, & uncommon Gram-negative bacteria. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. Eds: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies, p. 263-267.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 17th informational supplement. Approved Standard MS100-S17. Wayne, PA, USA, Vol. 27, No. 1.
- Çelik, İ., Cihangiroğlu, M. & Akbulut, A. (2007). Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz sıklığı. *Fırat Tıp Dergisi*, 12(4), 284-286.
- Çiftçi, İ.H., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F. & Altındiş, M. (2005). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35(2), 98-102.
- Çoban, A.Y., Çiftçi, A., Onuk, E.E., Erturan, Z., Çaycı, T.Y. & Durupınar, B. (2009). Kistik fibrozis hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43, 563-573.
- Delissalde, F. & Amabile Cuevas, C.F. (2004). Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(4), 405-408.
- El-Roos, N.A.A., Mazid, E.M., Zakary, E.M. & El Yazid, K.F.A. (2013). Molecular Characterization of *P. aeruginosa* Isolated From Milk. *Assuit Veterinary Medical Journal*, 59(139), 14-22.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. (2007). EARSS Annual Report 2007. Bilthoven, RIVM; October 2007.
- Jarjees, K.K. (2020). Molecular detection of type III secretory toxins in *P. aeruginosa* isolates. *Cellular and Molecular Biology*, 66(5), 9-14.
- Küplülü, Ö., Sarımehtetoğlu, B. & Oral, N. (2003). The Microbiological Quality of Çiğ Köfte Sold in Ankara. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 325-329.
- Mickova, V., Lukasova, J. & Konencny, S. (1989). *Pseudomonas aeruginosa* in raw and pasteurized milk. *Veterinary Medicine (Praha)*, 34(7), 411-419.
- Milivojevic, D., Šumonja, N., Medic, S., Pavic, A., Moric, I., Vasiljevic, B., Senerovic, L. & Nikodinovic-Runic, J. (2018). Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathogen Diseases*, 76(4), fty041.
- Mohammed, G.M.O., Megahed, A.A. & Nasr, S.S. (2015). Bacteriological and molecular detection of *pseudomonas* species from raw milk sold in Port-Said City markets. Egypt. *Journal of Chemical and Environmental Health*, 1(1), 986-1002.
- Moore, N.M. & Flaws, M.L. (2011). Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Laboratory Science*, 24, 43-46.
- Moskowitz, S.M., Jessica, M.F., Emerson, J.M., Emerson, J.C., Gibson, R.L. & Burns, J.L.

- (2005). Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**, 879-886.
- Olejnickova, K., Hola, V. & Ruzicka, F. (2014).** Catheter-related infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors involved and their relationships. *Pathogen Diseases*, **72**, 87-94.
- Parkash, M., Rajasekar, K. & Karmegam, N. (2007).** Bacterial Population of Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Activities. *Research Journal of Basic and Applied Sciences*, **3**(6), 848-851.
- Pitt, T.L., & Simpson, A.J.H. (2006).** *Pseudomonas* and *Bulkholderia* spp. In: Principles and practice of clinical bacteriology. Eds: Gillespie SH, Hawkey PM, 2th ed. UK: John Wiley and Sons Ltd, p:427-435.
- Pye, C.C., Yu, A.A. & Weese, J.S. (2013).** Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. *Veterinary Dermatology*, **24**(4), 446-449.
- Sadek, Z.I., El-Khalek, B.A. & Ibrahim, G.A.M. (2006).** Contamination and inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in some dairy products. *Annals of Agricultural Sciences Shams University Cairo*, **51**(1), 155-169.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. & Lipuma, J.J. (2004).** PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 2074-2079.
- Swetha, C.S., Babu, A.J., Rao, K.V., Bharathy, S., Supriya, R.A. & Rao, T.M. (2017).** A study on the antimicrobial resistant patterns of *P. aeruginosa* isolated from raw milk samples in and around Tirupati, Andhra Pradesh. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, **36**(2), 100-105.
- Taş, T.Ç., Çelik, G.Y. & Onbaşlı, D. (2013).** Investigation of proteolytic, lipolytic activities and antibiotics susceptibility of some *Pseudomonas* bacteria isolated from raw milk. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **70**(3), 147-152.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2018).** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Erişim adresi: <http://www.eucast.org>, Son Erişim Tarihi: 01.11.2021.
- Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS)** Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/uamdss>, Son Erişim Tarihi: 01.11.2021.
- Uraz, G. & Çıtak, S. (1998).** The isolation of *Pseudomonas* and other Gram(-) psychrotropic bacteria in raw milks. *Journal of Basic Microbiology*, **38**(2), 129-134.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm city of microbes. *Journal of Bacteriology*, **182**(10), 2675-2679.
- Yassein, M., Khardori, N., Ahmedy, A. & Toama, M. (1995).** Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**(10), 2262-2268.
- Yıldırım, N., Sezen, Y., Arduç, N. & İleri, Ç. (2008).** Farklı klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilkokların slime faktör üretimlerinin ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **22**(4), 209-214.



Monthly Average Wind Speed Forecasting in Giresun Province with Fuzzy Regression Functions Approach [*]

Abdullah YILDIRIM Eren BAŞ*

Faculty of Arts and Science, Department of Statistics, Giresun University, Giresun, Turkey

Received: 11.11.2021

Accepted: 13.01.2022

Published: 31.12.2022

How to cite: Yıldırım, A. & Baş, E. (2022). Monthly Average Wind Speed Forecasting in Giresun Province with Fuzzy Regression Functions Approach. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 27-32.

Atf yapmak için: Yıldırım, A. & Baş, E. (2022). Bulanık Regresyon Fonksiyonları Yaklaşımı ile Giresun İli Aylık Ortalama Rüzgâr Hızı Tahmini. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 27-32.

<https://orcid.org/0000-0002-5489-7330>
 <https://orcid.org/0000-0002-0263-8804>

***Corresponding author:**

Eren BAŞ
Faculty of Arts and Science, Department of
Statistics, Giresun University, Giresun, Turkey
 eren.bas@giresun.edu.tr

Abstract: In recent years, fuzzy inference systems have been used as an effective method for forecasting problems instead of classical time series methods. Fuzzy inference systems are based on fuzzy sets and use membership values as well as the original data. The fuzzy regression functions approach, which is one of the popular fuzzy inference systems, has different importance from many fuzzy inference systems with its features that it does not have a rule base and is easier to apply, unlike many fuzzy inference systems in the literature. In this study, both the monthly average wind speed forecasting of Giresun Province is performed for the first time in the literature and the fuzzy regression functions approach method is used for the first time in the literature for wind speed forecasting. To evaluate the performance of the fuzzy regression functions approach used to forecast monthly average wind speed in Giresun Province, the results obtained from many methods suggested in the literature for forecasting problems are compared. As a result of the evaluations, it is concluded that the forecasts obtained by the fuzzy regression functions approach are superior to some other methods in the literature.

Keywords: Fuzzy inference systems, fuzzy regression functions approach, forecasting, Giresun province, wind speed.

Bulanık Regresyon Fonksiyonları Yaklaşımı ile Giresun İli Aylık Ortalama Rüzgâr Hızı Tahmini

Öz: Son yıllarda öngörü problemleri için klasik zaman serisi yöntemleri yerine bulanık çıkarım sistemleri etkin bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bulanık çıkarım sistemleri, bulanık kümelerle dayalıdır ve orijinal verilerin yanı sıra üyelik değerlerini de kullanır. Popüler bulanık çıkarım sistemlerinden biri olan bulanık regresyon fonksiyonları yaklaşımı, literatürdeki birçok bulanık çıkarım sisteminden farklı olarak kural tabanına sahip olmaması ve uygulanmasının daha kolay olması özellikleriyle birçok bulanık çıkarım sisteminden farklı bir öneme sahiptir. Bu çalışmada hem literatürde ilk kez Giresun ilinin aylık ortalama rüzgâr hızı tahmini yapılmakta hem de rüzgâr hızı tahmini için literatürde ilk kez bulanık regresyon fonksiyonları yaklaşımı yöntemi kullanılmaktadır. Giresun ili aylık ortalama rüzgâr hızını tahmin etmek için kullanılan bulanık regresyon fonksiyonları yaklaşımının performansını değerlendirmek için, öngörü problemleri için literatürde önerilen birçok yöntemden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, bulanık regresyon fonksiyonları yaklaşımı ile elde edilen tahminlerin literatürdeki diğer birçok yöntemden daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bulanık çıkarım sistemleri, bulanık regresyon fonksiyonları yaklaşımı, öngörü, Giresun İli, rüzgâr hızı.

***Sorumlu yazar:**

Eren BAŞ
Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi, İstatistik Bölümü, Giresun,
Türkiye
 eren.bas@giresun.edu.tr

[*] This study was produced from the master thesis.

Bu çalışma Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir.

INTRODUCTION

The movement of air mass moving horizontally is called wind. For the wind to occur, there must be a pressure difference in two separate centers. Air currents are always from high pressure to low pressure. If the air temperature rises in one of the two adjacent regions on the earth, the air mass expands and rises. In this case, a low-pressure area is formed. In the region with less temperature, the air is cooled and compressed and collapses downwards by condensing. In this case, a high-pressure area is formed. This air, which is compressed in the high-pressure region, starts to flow towards the low-pressure region, and wind is formed.

Wind speed is the speed of movement of air, wind, and gases in the atmosphere. Factors affecting wind speed; pressure gradient, Rossby waves, jet stream, and local weather conditions. Wind speed is very important for monitoring and forecasting weather patterns and global climate.

Fuzzy inference systems are known as rule-based systems based on fuzzy sets and fuzzy logic. Fuzzy inference systems are based on fuzzy sets and use membership values alongside the original data, so a data augmentation mechanism is used in fuzzy inference systems.

Although the adaptive neuro-fuzzy inference system (ANFIS) proposed by Jang (1993) is the most well-known and frequently used fuzzy inference system in the literature, the fuzzy inference systems proposed by Takagi & Sugeno (1985) and Mamdani & Assilian (1975) are also important in the literature on fuzzy inference systems. The fact that these fuzzy inference systems have a rule base is a problem in the literature.

Turksen (2008) proposed the fuzzy regression functions approach (FRFA) to overcome such a problem. Unlike other fuzzy inference systems, FRFA does not depend on the rule base structure but uses fuzzy functions instead of rule base logic. FRFA, which is not based on a certain rule base, is an important fuzzy inference system method used in time series forecasting in recent years with this feature.

In FRFA, membership values and their nonlinear transformations are used together with the original input variables to improve the forecasting performance. More information is added to the system by using both the membership values and the non-linear transformations of the membership values and the original inputs in a single input set.

Although the FRFA has been used in many forecasting problems in the literature, it has not yet been used for wind speed forecasting. In this study, the monthly average wind speed of Giresun Province is firstly forecasted with fuzzy regression functions approach. The analysis results obtained with the fuzzy regression functions

approach were compared with the forecasting methods based on both classical and artificial intelligence methods, and superior forecasting results were obtained. The rest of the paper is as follows. The literature review of the paper is given in Section 2. The fuzzy c means method and fuzzy regression functions approach are given in Sections 3 and 4 respectively. The application results of the paper are given in Section 5. The final section is for conclusion and discussion.

Literature Review: When the studies on time series forecasting in the literature are examined, it is known that these studies were carried out with classical time series, fuzzy inference systems, shallow and deep artificial neural networks, and many hybrid methods such as the studies of Zhang (2003), Chen & Hsu (2008), Chen & Wang (2010), Khashei & Bijari (2012), Chen et al. (2013), Rezaeianzadeh et al. (2014), Chen & Phuong (2016), Chen & Jian (2017), Jaramillo et al. (2017), Egrioglu et al. (2019), Bisht & Kumar (2019), Gupta & Kumar (2019), Qian et al. (2019) and Pant & Kumar (2021).

The studies in the literature on wind speed forecasting were examined, it is seen that many studies focus on the development of wind speed forecasting models. In this context, the methods used for wind speed forecasting in the literature can be divided into several categories.

These methods are traditional statistical forecasting models using models such as autoregressive model (AR), autoregressive moving average (ARMA) and autoregressive integrated moving average (ARIMA), artificial intelligence forecasting models using artificial neural networks, recurrent neural networks and long short-term memory, statistical machine learning models using models such as support vector machine (SVM) and fuzzy logic-based models using models such as ANFIS, and hybrid models using these models together.

If we refer to the studies made with traditional statistical forecasting models; Ewing et al. (2007) used the vector autoregression model to forecast the wind speed. Cadenas & Rivera (2007) compared ARIMA and artificial neural network (ANN) methods for wind speed forecasting on the South Coast of the Mexican state of Oaxaca. Erdem & Shi (2011) used four different methods based on the ARMA model for wind speed forecasting for the United States. Cadenas et al. (2016) forecasted the wind speed using multivariate nonlinear external input autoregressive network (NARX) and univariate ARIMA model.

If we refer to the studies made with artificial intelligence forecasting models; Alexiadis et al. (1998) used ANN for short-time wind speed forecasting. Sfetsos (2002) proposed an ANN method for forecasting average hourly wind speed data. Akıncı (2011) used ANN for short-time

wind speed forecasting of Batman Province. Selcuk Nogay et al. (2012) used ANN for short-time wind speed forecasting of Mardin Province. Ren et al. (2014) proposed a method in which the parameter selection of the artificial neural network with backpropagation learning algorithm is made by particle swarm optimization (PSO), and the performance of the proposed method was compared to the daily average wind speed data of Jiuquan and the 6-hour wind speed data of Yumen in Gansu, China. Saberivahidaval & Hajjam (2015) evaluated the performance of different artificial neural network models for wind speed forecasting of Payam airport in Iran. Fazelpour et al. (2016) used four different artificial intelligence methods to forecast short-term wind speed for Tehran. Zucattelli et al. (2019) used ANN for short-term wind speed forecasting for Uruguay.

If we refer to the studies made with fuzzy logic-based models; Monfared et al. (2009) proposed a new strategy for wind speed forecasting based on fuzzy logic and artificial neural networks. Minaz (2011) used the ANFIS method for the wind speed estimation of Bilecik Province. Khosravi et al. (2018) forecasted the wind speed with feedforward neural networks, radial basis function, support vector machines, and ANFIS methods optimized with PSO. If we refer to the studies made with hybrid models; Cadenas & Rivera (2010) developed hybrid models consisting of ARIMA and ANN models for wind speed forecasting in three different regions in Mexico. Guo et al. (2011) proposed a hybrid method for wind speed forecasting in which the ANN model based on the backpropagation learning algorithm and the seasonal exponential smoothing method are used together. Shi et al. (2012) proposed hybrid methods using ARIMA, ANN, and SVM for wind speed forecasting. Wang et al. (2014) used a hybrid method in which empirical mode decomposition and Elman artificial neural network are used together for wind speed forecasting. Jiang et al. (2016) forecasted wind speed for China with a hybrid forecasting model based on a simulated annealing algorithm. Jiang et al. (2017) forecasted the wind speed with a hybrid approach in which the cuckoo search algorithm and SVM were used together.

MATERIAL AND METHOD

Fuzzy c Means Method: The fuzzy c-means method proposed by Bezdek (1981) performs clustering based on the minimization of the objective function and constraints given in the Equations (1-2). To apply the fuzzy c-means method, first of all, the number of clusters and the membership degrees of individuals to the cluster should be known. These values can be found randomly or by some developed techniques. The fuzzy c means method works based on iterative minimization of the following objective function and constraints. The objective function and

restrictions used for the fuzzy c means method are given in Equations (1-2).

$$J(X, \mu, V) = \sum_{i=1}^c \sum_{k=1}^n u_{ik}^f d^2(x_i, v_k) \quad (1)$$

$$\begin{aligned} 0 &\leq \mu_{ik} \leq 1 \\ \sum_{i=1}^c \mu_{ik} &= 1 \\ 0 &< \sum_{k=1}^n \mu_{ik} \leq n \end{aligned} \quad (2)$$

While f is the fuzziness index, $d(x_t, v_i)$ is a measure of similarity between the data and the cluster center. c , v_i ($i = 1, 2, \dots, c$) and μ_{ik} ($i = 1, 2, \dots, c$; $k = 1, 2, \dots, n$) show the fuzzy cluster number, cluster centers and membership values, respectively. At each iteration, v_i ($i = 1, 2, \dots, c$) and μ_{ik} ($i = 1, 2, \dots, c$; $k = 1, 2, \dots, n$) are updated with Equations (3-4)

$$v_i = \frac{\sum_{k=1}^n (\mu_{ik})^f x_k}{\sum_{k=1}^n (\mu_{ik})^f}, \quad i = 1, 2, \dots, c \quad (3)$$

$$\mu_{ik} = \left[\sum_{j=1}^c \left(\frac{d(x_k, v_j)}{d(x_k, v_i)} \right)^{\frac{2}{f-1}} \right]^{-1}, \quad i = 1, 2, \dots, c; \quad k = 1, 2, \dots, n \quad (4)$$

Fuzzy Regression Functions Approach: The fuzzy regression functions approach proposed by Turksen (2008) has a system in which membership values obtained from the fuzzy c means method and observation values are used together. Celikyılmaz & Turksen (2009) used mathematical transformations of membership values and showed that exponential and various logarithmic transformations of membership values can increase the performance of the model. Thus, some transformations of membership values were added to the input set with the study of Celikyılmaz & Turksen (2009). Besides, there are some papers to contribute to the fuzzy regression functions approach. Tak et al. (2018) proposed a recurrent type fuzzy regression function. Tak (2018) proposed the meta fuzzy functions method. The algorithm for the fuzzy regression functions approach is given below step by step. Bas et al. (2019) proposed a fuzzy regression function based on ridge regression for forecasting. Tak (2020) proposed a novel forecasting method that combines the type-1 fuzzy functions with the autoregressive moving average model based on a grey wolf optimizer. Tak (2021) proposed a forecast combination with meta-possibilistic fuzzy functions for time series forecasting.

Step 1. First, a matrix of lagged time variables is created for the training set.

Step 2. Membership values are obtained by using the fuzzy c-means method.

Step 3. Create fuzzy regression functions.

The fuzzy regression functions for each fuzzy set can be expressed as given in Equation (5).

$$Y^{(i)} = X^{(i)} \beta^{(i)} + \varepsilon^{(i)}; \quad i = 1, 2, \dots, c \quad (5)$$

The inputs and outputs of the system are given in Equations (6-7), respectively.

$$X^{(i)} = \begin{bmatrix} \mu_{i1} & \mu_{i1}^2 & \exp(\mu_{i1}) & \ln((1-\mu_{i1})/\mu_{i1}) & x_{11} & \dots & x_{p1} \\ \mu_{i2} & \mu_{i2}^2 & \exp(\mu_{i2}) & \ln((1-\mu_{i2})/\mu_{i2}) & x_{12} & \dots & x_{p2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \mu_{in} & \mu_{in}^2 & \exp(\mu_{in}) & \ln((1-\mu_{in})/\mu_{in}) & x_{1n} & \dots & x_{pn} \end{bmatrix} \quad (6)$$

$$Y^{(i)} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix} \quad (7)$$

Step 4. Estimate fuzzy regression functions.

The fuzzy regression functions for each fuzzy set are estimated by Equations (8-9).

$$\hat{\beta}^{(i)} = (X^{(i)'} X^{(i)})^{-1} X^{(i)'} Y^{(i)} \quad (8)$$

$$\hat{Y}^{(i)} = X^{(i)} \hat{\beta}^{(i)} ; i = 1, 2, \dots, c \quad (9)$$

Step 5. Outputs of the system for the training set are obtained

The outputs of the system are obtained using Equation (10) with the help of membership values.

$$\hat{y}_k = \frac{\sum_{i=1}^c \hat{y}_{ik} \mu_{ik}}{\sum_{i=1}^c \mu_{ik}} ; i = 1, 2, \dots, c, k = 1, 2, \dots, n \quad (10)$$

Step 6. To obtain the outputs for the test set, the $X^{(i)}$ and $Y^{(i)}$ matrices are updated with the test set in mind, and Steps 2-5 are repeated to obtain the outputs for the test set.

RESULTS

In this study, the performance of the fuzzy regression functions approach proposed by Turksen (2008) was evaluated by analyzing the monthly average wind speed time series of Giresun province between 2011 and 2018, which was obtained from the Giresun Meteorology Directorate. The graph of the time series consisting of all relevant years of the monthly average wind speed time series of Giresun province (GMAWS) between 2011-2018 is given in Figure 1.

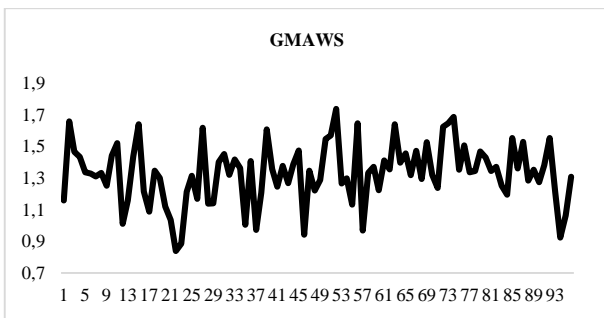


Figure 1. Giresun province monthly average wind speed time series between 2011-2018.

GMAWS time series data was analyzed with the ANFIS method proposed by Jang (1993), Pi-Sigma artificial

neural networks based on artificial bee colony (PS-ANN-ABC), feed-forward artificial neural networks based on PSO (FF-ANN-PSO), linear and nonlinear ANN (L&NL-ANN) proposed by Yolcu et al. (2013), Naive method, Median-Pi ANN (MP-ANN) proposed by Egrioglu et al. (2019) and Chen (1996) methods apart from fuzzy regression functions approach (FRF). In the analysis of the GMAWS time series, the number of inputs of the model was changed between 1 and 12 and the number of fuzzy clusters between 2 and 5. The number of iterations was taken as 100 in all methods.

In the comparison of the related methods, the Root Mean Square Error (RMSE) criteria given by Equation (11) and the mean absolute percent error (MAPE) criteria given by Equation (12) were used. The analysis results obtained are given in Table 1.

$$RMSE = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n \left| \frac{x_t - \hat{x}_t}{x_t} \right| \quad (11)$$

$$MAPE = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n (x_t - \hat{x}_t)^2}{n}} \quad (12)$$

Table 1. Analysis results of GMAWS test data.

Method	RMSE	MAPE
Chen (1996)	0.2521	0.1744
Naive Method	0.1819	0.1128
ANFIS	0.1788	0.2579
PS-ANN-ABC	0.1719	0.1087
L&NL-ANN	0.1711	0.1064
FF-ANN-PSO	0.1670	0.1006
MP-ANN	0.1641	0.1052
FRF	0.1595	0.1046

From Table 1, it is seen that the FRF method has the lowest MAPE among all methods and when compared with other methods, FRF estimates the relevant time series with an error of 10.46%. The graph of the forecasts obtained by the FRF method and the GMAWS test set is given in Figure 2.

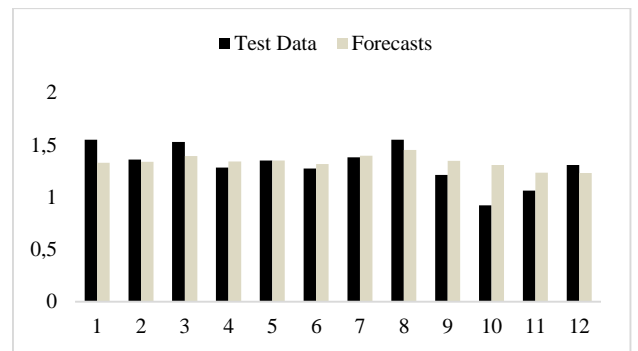


Figure 2. Graph of GMAWS time-series test set with predictions obtained by FRF method.

It is observed from Figure 2 that the predictions obtained by the FRF method and many months of the GMAWS test set are quite compatible with each other. It is seen that the predictions obtained by the FRF method are quite compatible with the test data of February, April, May, June, and July.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, the monthly average wind speed forecasting of Giresun Province was performed for the first time in the literature, and the fuzzy regression functions approach was used for the first time in wind speed forecasting. The forecasting performance of the fuzzy regression functions approach used in this study was compared with many well-known forecasting methods in the literature, and it was concluded that the fuzzy regression functions approach produced better prediction results than other methods.

In future studies, the fuzzy regression functions approach can be used to forecast wind speed in different provinces and different forecasting methods can be used for forecasting monthly average wind speed in Giresun Province.

REFERENCES

- Akncı, T.C. (2011).** Short term wind speed forecasting with ANN in Batman Turkey. *Elektronika Ir Elektrotehnika*, *107*, 41-45.
- Alexiadis, M.C., Dokopoulos, P.S., Sahsamanoglou, H.S. & Manousaridis, I.M. (1998).** Short-term forecasting of wind speed and related electrical power. *Solar Energy*, *63*, 61-68. DOI: [10.1016/S0038-092X\(98\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0038-092X(98)00032-2)
- Bas, E., Egrioglu, E., Yolcu, U. & Grosan, C. (2019).** Type 1 fuzzy function approach based on ridge regression for forecasting. *Granular Computing*, *4*(4), 629-637. DOI: [10.1007/S41066-018-0115-4](https://doi.org/10.1007/S41066-018-0115-4)
- Bezdek, J.C. (1981).** Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms. Plenum Press, NewYork, USA.
- Bisht, K. & Kumar, S. (2019).** Hesitant fuzzy set based computational method for financial time series forecasting. *Granular Computing*, *4*(4), 655-669. DOI: [10.1007/s41066-018-00144-4](https://doi.org/10.1007/s41066-018-00144-4)
- Cadenas, E. & Rivera, W. (2007).** Wind speed forecasting in the south coast of Oaxaca, Mexico. *Renewable Energy*, *32*(12), 2116-2128. DOI: [10.1016/j.renene.2006.10.005](https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.10.005)
- Cadenas, E. & Rivera, W. (2010).** Wind speed forecasting in three different regions of Mexico, using a hybrid ARIMA-ANN model. *Renewable Energy*, *35*(12), 2732-2738. DOI: [10.1016/j.renene.2010.04.022](https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.04.022)
- Cadenas, E., Rivera, W., Campos-Amezcu, R. & Heard, C. (2016).** Wind speed prediction using a univariate ARIMA model and a multivariate NARX model. *Energies*, *9*(2), 109. DOI: [10.3390/en9020109](https://doi.org/10.3390/en9020109)
- Celikyilmaz, A. & Turksen, I.B. (2009).** Modeling uncertainty with Fuzzy Logic, Studies in Fuzziness and Soft Computing, Springer.
- Chen, S.M. (1996).** Forecasting enrollments based on fuzzy time-series. *Fuzzy Sets and Systems*, *81*, 311-319. DOI: [10.1016/0165-0114\(95\)00220-0](https://doi.org/10.1016/0165-0114(95)00220-0)
- Chen, S.M. & Hsu, C.C. (2008).** A new approach for handling forecasting problems using high-order fuzzy time series. *Intelligent Automation & Soft Computing*, *14*(1), 29-43. DOI: [10.1080/10798587.2008.10642980](https://doi.org/10.1080/10798587.2008.10642980)
- Chen, S.M. & Jian, W.S. (2017).** Fuzzy forecasting based on two-factors second-order fuzzy-trend logical relationship groups, similarity measures and PSO techniques. *Information Sciences*, *391*, 65-79. DOI: [10.1016/j.ins.2016.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ins.2016.11.004)
- Chen, S.M., Manalu, G.M.T., Pan, J. & Liu, H. (2013).** Fuzzy forecasting based on two-factors second-order fuzzy-trend logical relationship groups and particle swarm optimization techniques. *IEEE Transactions on Cybernetics*, *43*(3), 1102-1117. DOI: [10.1109/TSMCB.2012.2223815](https://doi.org/10.1109/TSMCB.2012.2223815)
- Chen, S.M. & Phuong, B.D.H. (2016).** Fuzzy time series forecasting based on optimal partitions of intervals and optimal weighting vectors. *Knowledge-Based Systems*, *118*, 204-216. DOI: [10.1016/j.knsys.2016.11.019](https://doi.org/10.1016/j.knsys.2016.11.019)
- Chen, S.M. & Wang, N. (2010).** Fuzzy forecasting based on fuzzy-trend logical relationship groups. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B (Cybernetics)*, *40*(5), 1343-1358. DOI: [10.1109/TSMCB.2009.2038358](https://doi.org/10.1109/TSMCB.2009.2038358)
- Egrioglu, E., Yolcu, U. & Bas, E. (2019).** Intuitionistic high-order fuzzy time series forecasting method based on pi-sigma artificial neural networks trained by artificial bee colony. *Granular Computing*, *4*(4), 639-654. DOI: [10.1007/S41066-018-00143-5](https://doi.org/10.1007/S41066-018-00143-5)
- Egrioglu, E., Yolcu, U., Bas, E. & Dalar, A.Z. (2019).** Median-Pi artificial neural network for forecasting. *Neural Computing and Applications*, *31*(1), 307-316. DOI: [10.1007/s00521-017-3002-z](https://doi.org/10.1007/s00521-017-3002-z)
- Erdem, E. & Shi, J. (2011).** ARMA based approaches for forecasting the tuple of wind speed and direction. *Applied Energy*, *88*(4), 1405-1414. DOI: [10.1016/j.apenergy.2010.10.031](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.10.031)
- Ewing, B.T., Kruse, J.B., Schroeder, J.L., & Smith, D.A. (2007).** Time series analysis of wind speed using VAR and the generalized impulse response technique. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, *95*, 209- 219.
- Fazelpour, F., Tarashkar, N., & Rosen, M. A. (2016).** Short-term wind speed forecasting using artificial neural networks for Tehran, Iran. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, *7*(4), 377-390. DOI: [10.1007/s40095-016-0220-6](https://doi.org/10.1007/s40095-016-0220-6)
- Guo, Z. H, Wu, J, Lu, H. Y., & Wang, J. Z. (2011).** A case study on a hybrid wind speed forecasting method using BP neural network. *Knowledge-Based Systems*, *24*, 1048-1056. DOI: [10.1016/j.knsys.2011.04.019](https://doi.org/10.1016/j.knsys.2011.04.019)
- Gupta, K.K. & Kumar, S. (2019.)** A novel high-order fuzzy time series forecasting method based on

- probabilistic fuzzy sets. *Granular Computing*, 4(4), 699-713.
- Jang, J.S.R. (1993).** ANFIS: Adaptive network based fuzzy inference system. *IEEE Trans. On system, Man and Cybernetics*, 23(3), 665-685. DOI: [10.1109/21.256541](https://doi.org/10.1109/21.256541)
- Jaramillo, J., Velasquez, J.D. & Franco, C.J. (2017).** Research in financial time series forecasting with SVM: Contributions from literature. *IEEE Latin America Transactions*, 15(1), 145-153. <https://doi.org/10.1109/TLA.2017.7827918>
- Jiang, P., Ge, Y. & Wang, C. (2016).** Research and application of a hybrid forecasting model based on simulation annealing algorithm: A Case study of wind speed forecasting. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 8(1), 015501. <https://doi.org/10.1063/1.4940408>
- Jiang, P., Wang, Y. & Wang, J. (2017).** Short-term wind speed forecasting using a hybrid model. *Energy*, 119, 561-577. DOI: [10.1016/j.energy.2016.10.040](https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.10.040)
- Khashei, M., & Bijari, M. (2012).** A new class of hybrid models for time series forecasting. *Expert Systems with Applications*, 39(4), 4344-4357. DOI: [10.1016/j.eswa.2011.09.157](https://doi.org/10.1016/j.eswa.2011.09.157)
- Mamdani, E. H., & Assilian, S. (1975).** An experiment in linguistic synthesis with a fuzzy logic controller. *International Journal of Man-Machine Studies*, 7(1), 1-13. DOI: [10.1016/S0020-7373\(75\)80002-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7373(75)80002-2)
- Pant, M., & Kumar, S. (2021).** Particle swarm optimization and intuitionistic fuzzy set-based novel method for fuzzy time series forecasting. *Granular Computing*, 1-19. DOI: [10.1007/s41066-021-00265-3](https://doi.org/10.1007/s41066-021-00265-3)
- Qian, Z., Pe, Y., Zareipour, H., & Chen, N. (2019).** A review and discussion of decomposition-based hybrid models for wind energy forecasting applications. *Applied Energy*, 235, 939-953. DOI: [10.1016/j.apenergy.2018.10.080](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.10.080)
- Ren, C., An, N., Wan, J., Li, L., Hu, B. & Shang, D. (2014).** Optimal parameters selection for BP neural network based on particle swarm optimization: A case study of wind speed forecasting. *Knowledge-Based Systems*, 56, 226-239. DOI: [10.1016/j.knsys.2013.11.015](https://doi.org/10.1016/j.knsys.2013.11.015)
- Rezaeianzadeh, M., Tabari, H., Yazdi, A.A., Isik, S. & Kalin, L. (2014).** Flood flow forecasting using ANN, ANFIS and regression models. *Neural Computing and Applications*, 25(1), 25-37. DOI: [10.1007/s00521-013-1443-6](https://doi.org/10.1007/s00521-013-1443-6)
- Saberivahidaval, M. & Hajjam, S. (2015).** Comparison between performances of different neural networks for wind speed forecasting in Payam Airport, Iran. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 34(4), 1191-1196. DOI: [10.1002/ep.12081](https://doi.org/10.1002/ep.12081)
- Selcuk Nogay, H., Akinci, T.C. & Eidukeviciute M. (2012).** Application of artificial neural networks for short term wind speed forecasting in Mardin, Turkey. *Journal of Energy in Southern Africa*, 23(4), 2-7.
- Sfetsos, A. (2002).** A novel approach for the forecasting of mean hourly wind speed time series. *Renewable Energy*, 27, 163-174. DOI: [10.1016/S0960-1481\(01\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(01)00193-8)
- Shi, J., Guo, J.M. & Zheng, S.T. (2012).** Evaluation of hybrid forecasting approaches for wind speed and power generation time series. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3471-3480. DOI: [10.1016/j.rser.2012.02.044](https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.044)
- Tak, N. (2018).** Meta fuzzy functions: Application of recurrent type-1 fuzzy functions. *Applied Soft Computing*, 73, 1-13. DOI: [10.1016/j.asoc.2018.08.009](https://doi.org/10.1016/j.asoc.2018.08.009)
- Tak, N. (2020).** Grey wolf optimizer based recurrent fuzzy regression functions for financial datasets. *Öneri Dergisi*, 15(54), 350-366. DOI: [10.14783/maruoneri.771818](https://doi.org/10.14783/maruoneri.771818)
- Tak, N., Evren, A.A., Tez, M. & Egrioglu, E. (2018).** Recurrent type-1 fuzzy functions approach for time series forecasting. *Applied Intelligence*, 48(1), 68-77. DOI: [10.1007/s10489-017-0962-8](https://doi.org/10.1007/s10489-017-0962-8)
- Tak, N. (2021).** Forecast combination with meta possibilistic fuzzy functions. *Information Sciences*, 560, 168-182. DOI: [10.1016/j.ins.2021.01.024](https://doi.org/10.1016/j.ins.2021.01.024)
- Takagi, T. & Sugeno, M. (1985).** Fuzzy identification of systems and its applications to modeling and control. *Man and Cybernetics*, 15, 116-132. DOI: [10.1109/TSMC.1985.6313399](https://doi.org/10.1109/TSMC.1985.6313399)
- Turksen, I.B. (2008).** Fuzzy function with LSE. *Applied Soft Computing*, 8, 1178-1188. DOI: [10.1016/j.asoc.2007.12.004](https://doi.org/10.1016/j.asoc.2007.12.004)
- Wang, J., Zhang, W., Li, Y., Wang, J. & Dang, Z. (2014).** Forecasting wind speed using empirical mode decomposition and Elman neural network. *Applied Soft Computing*, 23, 452-459. DOI: [10.1016/j.asoc.2014.06.027](https://doi.org/10.1016/j.asoc.2014.06.027)
- Yolcu, U., Aladag, C. H. & Egrioglu, E. (2013).** A new linear & nonlinear artificial neural network model for time series forecasting. *Decision Support System Journals*, 54, 1340-1347. DOI: [10.1016/j.dss.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.dss.2012.12.006)
- Zhang, G. P. (2003).** Time series forecasting using a hybrid ARIMA and neural network model. *Neurocomputing*, 50, 159-175. DOI: [10.1016/S0925-2312\(01\)00702-0](https://doi.org/10.1016/S0925-2312(01)00702-0)
- Zucattelli, PJ, et al. (2019).** Short-term wind speed forecasting in Uruguay using computational intelligence. *Heliyon*, 5(5), e01664. DOI: [10.1016/j.heliyon.2019.e01664](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01664)



Oreochromis niloticus'un Kas ve Karaciğer Dokularında Kurşun Toksikitesi Üzerine Nitritotriasetik Asitin Etkisi

Tüzün AYTEKİN

Çukurova Üniversitesi İmamoglu Meslek Yüksekokulu, Adana, Türkiye

Geliş/Received: 19.01.2022

Kabul/Accepted: 08.02.2022

Yayın/Published: 31.12.2022

Atf yapmak için: **Aytekin, T. (2022)**. *Oreochromis niloticus*'un Kas ve Karaciğer Dokularında Kurşun Toksikitesi Üzerine Nitritotriasetik Asitin Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 33-38.

How to cite: **Aytekin, T. (2022)**. Protective Effect of Nitritotriacetic Acid on Lead Toxicity in Muscle and Liver Tissues of *Oreochromis niloticus*. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 33-38.

* <https://orcid.org/0000-0003-2666-0798>

*Corresponding author:
Tüzün AYTEKİN
Çukurova Üniversitesi İmamoglu Meslek
Yüksekokulu, Adana, Türkiye
✉: tuzunay@cu.edu.tr

Öz: Bu çalışmada Kurşun (Pb)'un sublethal derişimlerinin ve Pb + NTA (Nitritotriasetik asit) karışımının, 7 ve 21 gün süreyle, etkisine bırakılan tatlısu balığı *O. niloticus*'un kas ve karaciğer dokularındaki bazı enzim aktiviteleri ve oksidatif stres düzeyi incelenmiştir. Parametreler, otoanalizatör cihazlarla ölçülmüştür. Elde edilen veriler neticesinde; karaciğer dokusunda total oksidan (TOS), oksidatif indeksi (OSİ) düzeyleri ile alanin transaminaz (ALT), γ -glutamyl transferase (GGT), alkalın fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitelerinde artış, total antioksidan (TAS) düzeyinde azalış gözlenmiştir. Kas dokusunda ise TOS, OSİ düzeyleri ile ALT enzim aktivitesinde artış gözlenirken TAS düzeyi ile GGT ve ALP enzim aktivitelerinin kontrol seviyesinde olduğu saptanmıştır. NTA'nın varlığında bazı parametreler görülen azalma veya artmaların daha hafif olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak Pb'nin balığın fizyolojisinde değişikliklere neden olduğu, NTA'nın bu değişiklikleri kısmen de olsa azalttığı söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Biyokimyasal parametreler, lead, nitritotriasetik asit, *Oreochromis niloticus*, total antioksidan, total oksidan.

Protective Effect of Nitritotriacetic Acid on Lead Toxicity in Muscle and Liver Tissues of *Oreochromis niloticus*

*Sorumlu yazar:
Tüzün AYTEKİN
Çukurova University, İmamoglu Vocational
School, Adana, Turkey
✉: tuzunay@cu.edu.tr

Abstract: In this study, some enzyme activities and oxidative stress levels in the muscle and liver tissues of freshwater fish *O. niloticus*, which were exposed to the sublethal concentrations of Lead (Pb) and a mixture of Pb+NTA (Nitritotriacetic acid) for 7 and 21 days were investigated. Parameters were measured with autoanalyzer devices. As a result of the data obtained; increase in total oxidant (TOS), oxidative index (OSI) levels and alanine transaminase (ALT), γ -glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activities in liver tissue, total antioxidant (TAS) level decrease was observed. In muscle tissue, an increase was observed in TOS, OSI levels and ALT enzyme activity, while TAS level and GGT, ALP enzyme activities were found to be at kontrol levels. In the presence of NTA, it was observed that the decreases or increases in some parameters were milder. As a result, we can say that Pb causes changes in the physiology of fish, and NTA partially reduces these changes.

Keywords: Biochemical parameters, lead, nitritotriacetic acid, *Oreochromis niloticus*, total antioxidant, total oxidant.

GİRİŞ

Hızlı nüfus artışı, şehirleşme, endüstrileşme ve tarımsal faaliyetler gibi antropojenik aktivitelerin sonucunda çevre kirliliği kaçınılmaz bir durumdur. Ağır metaller çevre

kirliliğine neden olan en önemli etmenlerdendir. Kurşun (Pb), antik çağlardan beri bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Fizikokimyasal özellikleri, düşük maliyetle elde edilebilmesi ve kolay işlenebilirliği nedeniyle; akümülatör, boya, cam, tarım ilacı, plastik, kozmetik üretimi gibi birçok

alandaki kullanılmaktadır. Pb biyolojik bir aktiviteye katılmadığı gibi ortamda varlığı oksidatif stresi uyaran biyolojik mekanizmaların bütünlüğüne zarar veren önemli bir su kirleticisidir (Dündar & Aslan, 2005). Pb'nin oluşturduğu oksidatif stresin azaltılmasında antioksidanlar tek başlarına ya da şelatör maddelerle birlikte kullanılabilirler (Çaylak, 2010).

Nitriilotriasetik asit (NTA), iki değerlikli ve üç değerlikli metal katyonları ile kompleksler oluşturan bir aminotrikarboksil asittir. Biyolojik olarak parçalanabilen NTA, şelatlama kabiliyetinden dolayı birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Yaygın olarak deterjan üretiminde, mineral tortu birikimini önlemek için kazan suyunun arıtılmasında kullanılmakla birlikte tekstil imalatı, kağıt üretimi, metal kaplama ve temizleme işlerinde de kullanılmaktadır. (Anderson vd, 1985; Zhang et. al., 2017; Hong & Pintauro, 1996)

Sucul besin zincirinin en tepesinde yer alan balıklar, çevre sağlığının izlenmesi için yaygın olarak kullanılan biyoindekslerdir (Firidin, 2019). Balık eti (kas), düşük yağ içeriği ve yüksek protein ve mineral madde içeriğinin yanı sıra kalp koruyucu etkisi ile doymamış yağ asitlerinin optimal oranı nedeniyle insan beslenmesinde çok önemli bir besindir ve bu nedenle birçok izleme ve risk değerlendirme programında yer almaktadır (Yancheva et. al., 2015).

Karaciğer, organizmada metallerin birikiminden, dağılımından, detoksifikasyonundan ve transformasyonundan büyük ölçüde sorumlu olmakla birlikte birçok işlevi vardır. (Aytekin, 2011). Dolayısıyla sudaki kirleticilerden en çok etkilenen organlardan biri olduğu için ksenobiyotiklerin sucul hayvanlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılır. (Ismail et. al., 2017).

Transaminazlar (AST ve ALT), γ -glutamyl transferase (GGT), laktat dehidrojenaz (LDH) ve alkalik fosfatlar (ALP) gibi bazı enzimler, suda yaşayan organizmada kimyasal kirliliğin gözlenmesinde kullanılan biyobelirteçlerdir. Transaminazlar, aminoasitlerle ketoasitlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen ve özellikle karaciğer hasarını belirlemek için sıklıkla kullanılan hücre içi enzimlerdir. GGT, glutatyonun indirgenmesinde katalizör görevi görür. Hemen her hücrede bulunan LDH, laktat ve piruvatın birbirine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Özellikle hücre zarında bulunan ALP, alkali pH'ta transfosforilaz görevi görür. ALT, GGT, LDH, ALP enzimleri doku ve organlarda oluşan hasarları tespit etmek amacıyla kullanılmaktadırlar. (Altunkaş vd., 2014; Fırat vd., 2011; Fırat & Kargın 2010; Tulgar 2014).

Ağır metaller gibi çevresel kirleticilerin etkisiyle hücresel düzeyde ciddi miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı oksidatif hasar, vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle yok edilmeye çalışılır. Oksidatif hasarın en aza inebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Antioksidan

savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, yüksek miktarda yağ asitleri ihtiva ettikleri için balıkların doku ve hücreleri zarar görür (Kovacic vd., 2019; Yagcı vd., 2007;).

Total antioksidan seviyesi (TAS) organizmadaki tüm antioksidanların toplam etkisini gösterir ve total oksidan status (TOS) ise tüm oksidantların toplam etkisini gösterir (Erel, 2004; Erel, 2005). TAS ve TOS, ksenobiyotiklerin moleküler seviyede sucul organizmalar üzerine olumsuz etkilerinin belirlenmesine ve su sistemlerinin izlenmesine yardımcı olan biyobelirteçlerdir (Can vd., 2017). OSİ, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir ve antioksidan ve oksidan redoks dengesini gösterir. (Demirpençe vd., 2014).

Bu çalışmada, dünya çapında en çok yetiştiriciliği yapılan ikinci balık türü olan, tatlı su balığı *O. niloticus*'un karaciğer ve kas dokularında, kurşun toksisitesi üzerine NTA'nın koruyucu rolünün açığa çıkartılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla balık yetiştirme çiftliğinden alınan balıklar laboratuvar koşullarında hem Pb'nin tek başına hem de Pb+NTA karışımlarının etkisine bırakılmış ve bu balıklardan karaciğer ve kas doku örnekleri alınarak, bu dokulardaki çeşitli biyokimyasal toksisite belirteçleri incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Araştırma materyali olarak kullanılacak olan tatlı su balığı *O. niloticus* örnekleri Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü) Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak ve Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Ekofizyolojisi laboratuvarında, 40x120x40 cm. boyutlarındaki akvaryumlarda 25±1 °C'de laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır.

Deneylerde beş akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlardan ilk ikisine 0,1 mg/L Pb ve 1,0 mg/L Pb; üçüncü ve dördüncü akvaryumlara 0,1 mg/L Pb + 0,3 mg/L NTA ve 1,0 mg/L Pb + 3,0 mg/L NTA derişimleri uygulanmış, son akvaryum ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Balıklar kurşun ve Pb+NTA'nın belirlenen bu derişimlerinin etkisine 7 ve 21 gün sürelerle bırakılmıştır. Deney sırasında akvaryumların cam yüzeylerine tutunma, akvaryum suyunun buharlaşması gibi nedenlerle akvaryumlardaki metal derişimleri değişeceğinden akvaryum suları, iki güne bir, taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirilmiş ve kimyasalların balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su derişiminden 1 saat kadar önce yem verilmiştir.

Belirtilen 7 ve 21 günlük süreler sonunda kontrol ve kimyasalların bulunduğu deney akvaryumlardan alınan balıklar MS-222 anestetik maddesi ile bayıldıktan sonra disekte edilerek karaciğer ve kas doku örnekleri alınmıştır. Karaciğer ve kas dokuları % 0,59'luk NaCl damlatıldıktan sonra -80°C'lik derin dondurucuya konulmuştur. Analizleri

yapılmak üzere derin dondurucudan çıkarılan dokular 1/10 oranında 0,25 M sükröz (pH: 7,4) eklenerek buz içerisinde, ultra-turrax homojenizatörde 3 dakika homojenize edildikten sonra +4 °C'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ile ticari kitler kullanılarak, spektrofotometrik yöntemlerle TAS, TOS, ALT, GGT, LDH, ALP ve Total protein ölçümleri yapılmıştır.

Elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 21 bilgisayar paket programı kullanılarak One Way-ANOVA'yu ve Student–Newman Keul's (SNK) Testi uygulanarak yapılmıştır.

Bu çalışmanın Deney Hayvanları Etiği açısından uygun olduğu Ç.Ü.Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (Tarih:04.07.2018; Karar no:16) tarafından onaylanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda deneyler süresince mortalite gözlenmemiştir. Pb ve Pb+NTA karışımlarının, 7 ve 21 gün süreyle, etkisine bırakılan *O. niloticus*'un karaciğer ve kas dokularındaki TAS, TOS ve OSİ seviyeleri Tablo 1 ve Tablo 2 de verilmiştir. Karaciğerde TAS seviyesi, yüksek derişimin etkisinde, azalırken ($P<0,05$), kasta kontrol seviyesinde ($P>0,05$) olduğu saptanmıştır. TOS ve OSİ seviyelerinin ise hem karaciğer hem de kas dokusunda derişime ve süreye bağlı olarak arttığı ancak bu artışların NTA etkisinde daha az olduğu, yani Pb+NTA uygulanan grupların bir kısmında TOS ve OSİ seviyelerinin, kontrol ve Pb grubu arasında olduğu belirlenmiştir.

Yapılan birçok çalışmada, metallere maruz kalmanın oksidatif hasara neden olabilen reaktif oksijen (ROS) oluşumunu artırarak oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir (Franco vd., 2016). Eksojen ve endojen kaynaklı oluşan oksidan molekülleri, antioksidan mekanizmayla vücuttan uzaklaştırılır. Oksidan seviyesi, antioksidan sistemin kapasitesini aşarsa oksidatif stres oluşur. TOS'un TAS'a oranı oksidatif stres indeksi olarak ifade edilmektedir.

Sudaki kurşun düzeyinin artması bazı su canlılarında olumsuz etkilere neden olabilmekte, balıklarda ve diğer hayvanlarda, çeşitli parametrelerde değişikliklere neden olabilmektedir. (Elbesthi vd., 2018).

Capoeta capoeta'nın karaciğer, solungaç, bağırsak ve böbrek dokularında kurşun toksisitesine karşı L-karnitin (LK) koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; TAS seviyesinde değişiklik gözlenmezken, Pb uygulanan grubun TOS düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek, Pb+LK verilen grubun TOS düzeyinin ise kontrol ile Pb verilen grubun arasında olduğu belirlenmiştir. (Yılmaz vd., 2016).

Atatürk baraj gölünde çevre kirliliği parametrelerinin incelendiği bir çalışmada Pb seviyesinin yüksek olduğu bölgeden alınan balık karaciğer TOS ve OSİ

seviyeleri yüksek, TAS düzeyi düşük bulunmuştur (Alkan-Uçkun & Uçkun, 2021).

Tablo 1. Pb ve Pb+NTA karışımının etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda TAS, TOS ve OSİ seviyeleri.

Table 1. TAS, TOS and OSI levels in liver tissue of *O. niloticus* under the influence of Pb and Pb+NTA mixture.

Parametreler	7. gün	21. gün
TAS (mmol/L)		
Kontrol	0,80±0,06 a	0,77±0,03 a
0,1 ppm Pb	0,67±0,03 a	0,73±0,03 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	0,67±0,07 a	0,77±0,03 a
Kontrol	0,80±0,06 a	0,77±0,03 a
1,0 ppm Pb	0,57±0,03 b	0,57±0,03 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	0,50±0,06 b	0,53±0,03 b
TOS (µmol/L)		
Kontrol	23,0±1,9 a	25,1±1,4 a
0,1 ppm Pb	25,6±0,9 a	31,0±0,8 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	23,5±1,6 a	31,9±1,8 b
Kontrol	23,0±1,9 a	25,1±1,4 a
1,0 ppm Pb	28,6±0,7 b	31,3±1,9 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	25,8±0,7 b	30,9±1,1 b
OSİ (AU)		
Kontrol	3,01±0,2 a	3,28±0,1 a
0,1 ppm Pb	3,84±0,1 b	4,26±0,3 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	3,54±0,1 ab	4,17±0,2 b
Kontrol	3,01±0,2 a	3,28±0,1 a
1,0 ppm Pb	5,01±0,2 b	5,60±0,6 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	4,85±0,3 ab	5,85±0,4 b

Değerler aritmetik ortalama±standart hata (N=6) olarak verilmiştir. a ve b harfleri aynı sürede derişimler arasında farklı belirtmek üzere kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler $P<0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

Tablo 2. Pb ve Pb+NTA karışımının etkisinde *O. niloticus*'un kas dokusunda TAS, TOS ve OSİ seviyeleri.

Table 2. TAS, TOS and OSI levels in muscle tissue of *O. niloticus* under the influence of Pb and Pb+NTA mixture.

Parametreler	7. gün	21.gün
TAS (mmol/L)		
Kontrol	0,60±0,06 a	0,53±0,03 a
0,1 ppm Pb	0,50±0,06 a	0,53±0,03 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	0,60±0,06 a	0,50±0,06 a
Kontrol	0,60±0,06 a	0,53±0,03 a
1,0 ppm Pb	0,53±0,03 b	0,57±0,07 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	0,67±0,03 b	0,53±0,03 b
TOS (µmol/L)		
Kontrol	1,03±0,12 a	1,13±0,15 a
0,1 ppm Pb	1,60±0,12 a	1,63±0,09 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	1,00±0,12 a	1,33±0,09 ab
Kontrol	1,03±0,12 a	1,13±0,15 a
1,0 ppm Pb	1,67±0,15 b	2,03±0,12 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	1,47±0,13 ab	1,30±0,12 a
OSİ (AU)		
Kontrol	0,17±0,01 a	0,21±0,02 a
0,1 ppm Pb	0,32±0,01 b	0,31±0,01 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	0,17±0,01 a	0,27±0,03 ab
Kontrol	0,17±0,01 a	0,21±0,02 a
1,0 ppm Pb	0,32±0,02 b	0,36±0,03 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	0,22±0,01 ab	0,24±0,01 a

Değerler aritmetik ortalama±standart hata (N=6) olarak verilmiştir. a ve b harfleri aynı sürede derişimler arasında farklı belirtmek üzere kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler $P<0,05$ düzeyinde anlamlıdır

TOS düzeylerinde meydana gelen artma ve TAS düzeylerinde meydana gelen azalmaların, antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması ve oksidatif strese bağlı

olabileceği anlamına gelebilir (Kaya vd., 2014). Yapılan bu çalışmada, OSİ değerlerindeki artış da bu görüşü destekler niteliktedir. NTA varlığında OSİ değerindeki artışın, Pb'nin tek başına etkisine oranla daha az olması NTA'nın koruyucu etkisinden kaynaklanabilir.

Bu çalışmada, 7 ve 21 gün süreyle, Pb ve Pb+NTA karışımlarının etkisine bırakılan *O. niloticus*'un karaciğer ve kas dokularındaki ALT, GGT, LDH, ALP aktiviteleri ve total protein düzeyleri Tablo 3 ve Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 3. Pb ve Pb+NTA karışımının etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda enzim aktiviteleri ve total protein miktarı.

Table 3. Enzyme activities and total protein levels in liver tissue of *O. niloticus* under the influence of Pb and Pb+NTA mixture.

Parametreler	7.gün	21. gün
ALT (U/L)		
Kontrol	1250,7±75,1 a	1191,7±62,9 a
0,1 ppm Pb	2383,0±117,5 b	2021,3±108,6 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	2596,7±109,5 b	1303,7±129,8 a
Kontrol	1250,7±75,1 a	1191,7±62,9 a
1,0 ppm Pb	2269,7±143,7 b	2286,7±147,2 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	2425,0±131,4 b	1495,0±73,4 a
GGT (U/L)		
Kontrol	9,67±0,88 a	10,33±0,88 a
0,1 ppm Pb	11,33±0,88 a	11,00±1,16 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	12,00±0,57 a	10,67±0,88 a
Kontrol	9,67±0,88 a	10,33±0,88 a
1,0 ppm Pb	14,67±0,67 b	15,33±1,67 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	11,33±0,67 a	11,00±0,58 a
LDH (U/L)		
Kontrol	1487,7±144,6 a	1502,5±103,5 a
0,1 ppm Pb	1584,7±91,5 a	1754,0±74,5 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	1268,3±72,9 a	1844,7±56,6 b
Kontrol	1487,7±144,6 a	1502,5±59,8 a
1,0 ppm Pb	1251,0±20,7 a	1853,3±100,8 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	1275,0±28,8 a	1830,0±59,2 b
ALP (U/L)		
Kontrol	1249,0±86,5 a	1318,3±68,7 a
0,1 ppm Pb	1276,7±64,7 a	1793,0±90,8 b
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	1231,3±54,1 a	1770,7±104,2 b
Kontrol	1249,0±86,5 a	1318,3±68,7 a
1,0 ppm Pb	1288,3±36,6 a	1535,7±66,1 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	1197,3±81,2 a	1614,3±36,3 b
Total Protein (g/dL)		
Kontrol	1,32±0,05 a	1,45±0,11 a
0,1 ppm Pb	1,50±0,04 a	1,76±0,10 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	1,48±0,04 a	1,67±0,09 a
Kontrol	1,32±0,05 a	1,45±0,11 a
1,0 ppm Pb	1,52±0,02 a	1,68±0,11 a
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	1,41±0,07 a	1,69±0,08 a

Değerler aritmetik ortalama±standart hata (N=6) olarak verilmiştir. a ve b harfleri aynı sürede derişimler arasında farklı belirtmek üzere kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler P<0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Karaciğer ALT, GGT, ALP, LDH aktivitelerinde genel olarak artış gözlenmiştir. 7. günde ALT, tüm derişimlerde artış gösterirken 21. günde NTA'nın varlığında kontrol seviyesinde olduğu gözlenmiştir. GGT aktivitesi yüksek derişimlerdeki Pb'nin etkisinde artış gösterirken NTA'nın varlığında kontrol düzeyinde belirlenmiştir. LDH ve ALP enzim aktiviteleri 21. günde tüm derişimlerde artış göstermiştir.

Kas ALT aktivitesi 21. günde 1ppm Pb derişiminin etkisinde artarken, NTA varlığında kontrol seviyesinde bulunmuştur. GGT ve ALP aktiviteleri tüm derişim ve sürelerde kontrol seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. Total protein düzeylerinin ise hem karaciğer hem de kas dokusunda kontrol seviyesinde olduğu saptanmıştır.

Tablo 4. Pb ve Pb+NTA karışımının etkisinde *O. niloticus*'un kas dokusunda enzim aktiviteleri ve total protein miktarı.

Table 4. Enzyme activities and total protein levels in muscle tissue of *O. niloticus* under the influence of Pb and Pb+NTA mixture.

Parametreler	7. gün	21. gün
ALT (U/L)		
Kontrol	154,3±9,6 a	144,0±6,8 a
0,1 ppm Pb	151,3±8,4 a	157,7±10,5 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	149,3±14,3 a	149,3±6,9 a
Kontrol	154,3±9,6 a	144,0±6,8 a
1,0 ppm Pb	145,3±5,5 a	242,0±15,0 b
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	153,0±11,2 a	166,7±15,8 a
GGT (U/L)		
Kontrol	2,00±0,58 a	2,00±0,00 a
0,1 ppm Pb	2,33±0,33 a	1,67±0,33 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	2,00±0,00 a	1,67±0,33 a
Kontrol	2,00±0,58 a	2,00±0,00 a
1,0 ppm Pb	2,67±0,33 a	2,33±0,33 a
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	2,33±0,33 a	1,67±0,33 a
ALP (U/L)		
Kontrol	8,33±0,33 a	7,67±0,33 a
0,1 ppm Pb	8,67±0,88 a	8,67±0,88 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	6,67±0,33 a	7,33±0,33 a
Kontrol	8,33±0,33 a	7,67±0,33 a
1,0 ppm Pb	7,67±0,33 a	8,33±0,88 a
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	6,67±0,33 a	6,67±0,88 a
Total Protein (g/dL)		
Kontrol	0,54±0,03 a	0,52±0,05 a
0,1 ppm Pb	0,64±0,02 a	0,57±0,05 a
0,1+0,3 ppm Pb+NTA	0,50±0,03 a	0,51±0,04 a
Kontrol	0,54±0,03 a	0,52±0,05 a
1,0 ppm Pb	0,59±0,03 a	0,60±0,05 a
1,0+3,0 ppm Pb+NTA	0,56±0,03 a	0,56±0,05 a

Değerler aritmetik ortalama±standart hata (N=6) olarak verilmiştir. a ve b harfleri aynı sürede derişimler arasında farklı belirtmek üzere kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler P<0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Transaminazlar sadece protein ve karbonhidrat metabolizmada görev alan enzimler değil, aynı zamanda stresin balık dokularındaki zararını kanıtlamak için kullanılan indikatörlerdir (Asztalos & Nemcsok, 1985). Pb'nin doku ve organlardaki ALT aktivitesini değiştiren hücreler arası iletişimi de etkilediği gösterilmiştir (Çoğun & Şahin, 2012). GGT, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır (Adeyemi vd., 2014). Önemli bir glikolitik enzim olan LDH, karbonhidrat metabolizmasında yer alır ve kimyasal strese maruz kalmanın belirleyici bir kriteri olarak kullanılır. (Kumari vd., 2011). Hücre zarında aktif taşınma sürecinde görev alan ALP, karbonhidrat metabolizmasında, büyümede, hücre farklılaşmasında, protein sentezinde ve belirli tipteki enzimlerin üretilmesinde ve salınmasında rolü vardır. Balıklar strese veya yaralanmaya maruz kaldıklarında, hücre yenilenmesi ve yara iyileşmesi sürecinde, bu enzimde bir artış gözlenmektedir (Al-Khshali & Al-Hilali, 2019). Kısaca; ALT, GGT, LDH, ALP enzimleri stres indikatörleri olup, sucul organizmalarda metal toksisitesinin değerlendirilmesinde ve doku hasarının

belirlenmesinde kullanılan önemli parametrelerdir (Akbari vd., 2018; Fırat & Şahin-İnandı, 2016; Kim vd., 2021; Rao, 2006).

Kurşun birikiminin karaciğer dokusuna göre kas dokusunda daha az olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. (Çoğun & Şahin, 2012; Li vd., 2021). Bu çalışmada da karaciğer dokusunun Pb toksisitesinden kas dokusuna göre daha fazla etkilendiği gözlenmiştir. Pb ve krom (Cr) etkisinde kalan balıkların karaciğer ALT ve ALP aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Ale vd., 2016). Pb'yi de içeren metal kirliliğinin yoğun olduğu bölgeden alınan balıkların karaciğer ALT, ALP ve LDH aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Fitori vd., 2020). 7 ve 15 gün süreyle metal etkisine bırakılan *O. niloticus*'un ALT, ALP ve LDH aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Tunçsoy & Erdem 2021). *O. mossambicus*'un karaciğer, böbrek, solungaç ve kas dokularında toksisiteye karşı ALT, ALP, LDH aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Kavitha vd., 2011). Helal, (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, Pb'nin yüksek düzeyde olduğu gölden toplanan *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda ALT ve GGT aktivitelerinin yüksek olduğu saptanmıştır. *Cyprinus carpio*'nun bazı dokularında Pb kaynaklı değişiklikler üzerine askorbik asit ve tiamin'in koruyucu etkisinin incelendiği çalışmada, Pb etkisinde karaciğer ALT, LDH ve ALP aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Mirmazloomi vd., 2015) Bu sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, *O. niloticus*'un karaciğer ve kas dokularında incelenen parametrelerde (TAS, TOS, OSİ, ALT, GGT, LDH, ALP) gözlenen değişiklikler kurşunun toksik etkisi sonucu oksidatif stresin ortaya çıktığını ve doku hasarına neden olduğunun göstergesidir. NTA varlığında ise anılan parametrelerin bir kısmında, görülen değişikliklerin ortadan kalktığı veya azaldığı gözlenmiştir. Bu durum kurşunun toksik etkisine karşı NTA'nın şelatlama özelliğinden dolayı balıkları kısmen de olsa toksisiteden koruduğu kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: FBA-2018-10696).

KAYNAKLAR

- Adeyemi, J.A., Adewale, O.O. & Oguma, A.Y. (2014).** Mortality, oxidative stress and hepatotoxicity in juvenile african catfish, clarias *Gariépinus burchell*, exposed to lead and cypermethrin. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **92**, 529-533. DOI: [0.1007/S00128-013-1169-2](https://doi.org/10.1007/S00128-013-1169-2)
- Akbary P., Yarahmadi, S.S. & Jahanbakhshi, A. (2018).** Hematological, hepatic enzymes' activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide.

Environ Sci Pollut Res., **25**, 1800-1808. DOI: [10.1007/S11356-017-0582-1](https://doi.org/10.1007/S11356-017-0582-1)

- Ale, A., Bacchetta, C. & Cazenave, J. (2016).** Responses of multiple biomarkers in the fish *Hoplosternum littorale* after exposure to chromium and lead. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25**(10), 4052-4059.
- Alkan-Uçkun, A. & Uçkun, M. (2021).** Evaluation of some biomarkers in carp (*Cyprinus carpio* linnaeus, 1758) depending on water and sediment pollution of Atatürk dam lake. *Beü Fen Bilimleri Dergisi*, **10** (3), 744-753.
- Al-Khshali, M.S & Al-Hilali, H.A. (2019).** Some physiological changes (ALP, AST and ALT) of common carp (*Cyprinus carpio*) caused by high salinity. *Biochem. Cell. Arch.*, **19**(2), 4605-4610. DOI: [10.35124/Bca.2019.19.2.4605](https://doi.org/10.35124/Bca.2019.19.2.4605)
- Altunkaş, F., Karaman, K., Şahin, Ş., Celik, A. & Koc, F. (2014).** Gamma-glutamyl transferaz aktivitesi ve kardiyovasküler hastalıklar. *Mn Kardiyoloji*, **21**,1, 56-59.
- Anderson, R.L., Bishop, W.E. & Campbell, R.L. (1985).** A review of the environmental and mammalian toxicology of nitrotriacetic acid. *Critical Reviews In Toxicology*, **15**(1), 1-10. DOI: [10.3109/10408448509023766](https://doi.org/10.3109/10408448509023766).
- Asztalos, B. & Nemcsok, J. (1985).** Effect of pesticides on the LDH Activity and isoenzyme pattern of carp, *Cyprinus carpio* (L.), sera. *Comparative Biochemistry And Physiology* **82**(1), 214-219. DOI: [10.1016/0742-8413\(85\)90233-6](https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90233-6)
- Aytekin Yüzereroğlu, T. (2011).** *Oreochromis niloticus*'da bakır, kadmiyum ve bakır-kadmiyum etkileşiminde metallerin doku ve organlarda birikimi, eliminasyonu ve antioksidant enzim aktivitelerine etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, Türkiye, 169s.
- Can, E., Cıkcıoğlu-Yıldırım, N. & Erdogan, D. (2017).** Seasonal changes in antioxidant defence system on brown trout (*salmo* sp.) in Munzur stream. *Fresenius Environmental Bulletin*. **26**(10) 5936-5941.
- Çaylak, E. (2010).** Çocuklarda kurşun zehirlenmesi, oksidatif stres ve tiyol bileşiklerin antioksidan etkisi. *Çocuk Dergisi*, **10**(1),13-23. DOI: [10.5222/J.Child.2010.01](https://doi.org/10.5222/J.Child.2010.01)
- Çoğun H.Y. & Şahin, M.(2012).** Nil Tilapia (*Oreochromis Niloticus* Linnaeus, 1758)'da kurşun toksisitesinin azaltılmasında zeolitin etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **18**(1), 135-140. DOI: [10.9775/Kvfd.2011.5170](https://doi.org/10.9775/Kvfd.2011.5170)
- Demirpençe, Ö., Sevim, B., Yıldırım, M., Ayan Nurlu, N., Mert, D. & Evliyaoğlu, O. (2014).** Serum paraoxonase, Tas, Tos and ceruloplasmin in brucellosis. *Int J Clin Exp Med.*, **7**(6), 1592-1597.
- Dündar, Y. & Aslan, Y. (2005).** Yaşamı kuşatan ağır metal kurşunun etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **6**, 1-5.
- Elbeshtı, R.T.A., Elderwish, N.M., Abdelah, K.M. & Taştan, Y. (2018).** Effects of heavy metals on fish. *Menba Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **4**(1), 36-47.
- Erel, O. (2004).** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clinical Biochemistry*, **37**, 277-285.
- Erel, O. (2005).** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, **38**, 1103-1111.
- Fırat, Ö. & Kargın, F. (2010).** Individual And Combined Effects Of Heavy Metals On Serum Biochemistry Of Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus*. *Arch Environ*

- Contam Toxicol.*, **58**, 151-157. DOI: [10.1007/S00244-009-9344-5](https://doi.org/10.1007/S00244-009-9344-5)
- Fırat Ö. & Şahin-İnandı, A. (2016).** *Oreochromis niloticus*'ta bazı serum biyokimyasal parametreleri kullanılarak civa toksisitesi üzerine zeolitin birlikte etkisinin araştırılması. *Su Ürünleri Dergisi*, **33**(3), 251-257. DOI: [10.12714/egejfas.2016.33.3.09](https://doi.org/10.12714/egejfas.2016.33.3.09)
- Fırat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Fırat, Ö., Kargın, F. & Kötemen, Y. (2011).** A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology And Biochemistry*, **37**, 657-666. DOI: [10.1007/S10695-011-9466-3](https://doi.org/10.1007/S10695-011-9466-3)
- Firidin, G. (2019).** Effects of lead and its selenium mixtures on biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*. *Fresenius Environmental Bulletin*, **28**(1), 383-390.
- Fitori, A., Abdunabi, B.M., Ali, R.A.S. & Ali, S.M. (2020).** Effects of some heavy metal pollutants on liver and kidney performance of mullet captured from Tubruk harbor comparing to Umm Hufayan lagoon. *DYSONA-Life Science*, **1**, 83-90.
- Franco A.L., Romero A.D., Garcia-Navarro, A.J., Teles, B.M. & Tvarijonaviciute, A. (2016).** Esterase activity (ea), total oxidant status (tos) and total antioxidant capacity (tac) in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pollutants: analytical validation and effects evaluation by single and mixed heavy metal exposure. *Marine Pollution Bulletin*, **102**, 30-35.
- Helal, E.G.E., El-Atti, M. S.A. & Ekraim, Y.M (2018).** Harmful effects of water pollution on some physiological responses of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in both Qarun and Burullus lakes. *The Egyptian Journal Of Hospital Medicine*, **72**(2), 4021-4025.
- Hong, J. & Pintauro, P.N. (1996).** Selective removal of heavy metals from contaminated kaolin by chelators. *Water, Air, And Soil Pollution*, **87**, 73-91.
- Ismail, N.M., Ali, S.E & Mohamed, I.K. (2017).** Biochemical and histological biomarker approaches in the assessment of the water pollution in some lined and unlined watercourses of Egypt. *International Journal Of Fisheries And Aquatic Studies*, **5**(3), 288-296.
- Kavitha, P., Ramesh, R., Bupesh, G., Stalin, A., & Subramanian, P. (2011).** Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **47**, 698-706. DOI: [10.1007/S11626-011-9457-9](https://doi.org/10.1007/S11626-011-9457-9)
- Kaya, İ., Yılmaz, M., Koç, E., Devci H.A., Ersan Y. & Karapehlivan, M. (2014).** Tebukonazol (fungisit) uygulanan *Cyprinus carpio* (l. 1758)'da serum total antioksidan, oksidan ve sialik asit düzeylerinin incelenmesi. *Journal of Fisheries sciences*, **8**(3), 214-219.
- Kim, D.W., Ock, J., Moon, K.W. & Choong-Hee Park, C.H. (2021).** Association between Pb, Cd, and Hg exposure and liver injury among Korean adults. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**, 67-83. DOI: [10.3390/Ijerp18136783](https://doi.org/10.3390/Ijerp18136783)
- Kovacic, A., Tvrda, E., Miskeje M., Arvay, J., Tomka, M., Zbýnovska, K., Andreji, J., Hleba, L., Kovacikova, E., Fik, M., Cupka P., Nahacky, J. & Massanyi, P. (2019).** Trace metals in the freshwater fish *Cyprinus carpio*: effect to serum biochemistry and oxidative status markers. *Biological Trace Element Research*, **188**, 494-507 DOI: [10.1007/S12011-018-1415-X](https://doi.org/10.1007/S12011-018-1415-X)
- Kumari, K., Ranjan, N. & Sinha, R.C. (2011).** Multiple Biomarker Response In The Fish, *Labeo Rohita* Due To Hexavalent Chromium. *2nd International Conference On Biotechnology And Food Science*. 155-158.
- Li, M., Kong, Y., Wu, X., Yin, Z., Niu, X. & Wang, G. (2021).** Dietary α -lipoic acid can alleviate the bioaccumulation, oxidative stress, cell apoptosis, and inflammation induced by lead (Pb) in *Channa argus*. *Fish And Shellfish Immunology*, **119**, 249-261.
- Mirmazloomi, S., Shahsavani, D. & Baghshani, H. (2015).** Studies on the protective effects of ascorbic acid and thiamine on lead-induced lipid and protein oxidation as well as enzymatic alterations in some tissues of *Cyprinus carpio*. *Comp Clin Pathol.*, **24**, 1231-1236. DOI: [10.1007/s00580-015-2065-4](https://doi.org/10.1007/s00580-015-2065-4)
- Rao J.V. (2006).** Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, **65**, 1814-1820.
- Tulgar, A. (2014).** *Propargite (Akarisit)'nin Sublethal Dozlarının Sazan Balığı (Cyprinus Carpio, Linnaeus, 1758)'nda Kan Parametrelerine Etkisi Ve Kas Dokusundaki Birikimi*. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Çanakkale, Türkiye 118s.
- Tunçsoy, M. & Erdem, E. (2021).** Comparison to toxic effects of copper oxide nanoparticles and copper sulphate on some serum parameters and enzyme activities of *Oreochromis niloticus*. *Journal Of Anatolian Environmental And Animal Sciences*, **6**(4), 514-521. DOI: [10.35229/Jaes.987548](https://doi.org/10.35229/Jaes.987548)
- Yağcı, R., Özyurt, H., Akbaş, A., Aydın, B., Özlük, E., Ekşiöğlü, M. & Totan, Y. (2007).** Behçet hastalığında toplam antioksidan kapasite, toplam oksidan durum ve dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri. *Ret-Vit.*, **15**, 263-266.
- Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S. & Georgieva, E. (2015).** Fish in ecotoxicological studies. *Ecologia Balkanica*, **7**(1), 149-169.
- Yılmaz, M., Koç, E., Atakışi, O., Harmankaya, A., Ersan, Y., Karaman, M. & Çitil, M. (2016).** The protective effects of L-carnitine against lead (II) acetate toxicity in *Capoeta capoeta* (Guldenstadt 1773). *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **22**(4), 511-518. DOI: [10.9775/Kvfd.2015.14942](https://doi.org/10.9775/Kvfd.2015.14942)
- Zhang, Y., Klammerth, N., Chelme-Ayala, P. & Gamal El-Din, M. (2017).** Comparison of classical fenton, nitritotriacetic acid (nta)-fenton, UV-fenton, UV photolysis of Fe-nta, UV-nta-fenton, and UV-H₂O₂ for the degradation of cyclohexanoic acid. *Chemosphere*, **175**, 178-185.



Karadeniz'de Demersal Balıklara Ait Av Miktarlarının Trend Analizi

İsmet SAYGU*

*Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Adana, Türkiye

Geliş Tarihi: 20.01.2022

Kabul Tarihi: 07.02.2022

Basım Tarihi: 31.03.2022

Atf yapmak için: Saygu, İ. (2022). Karadeniz'de Demersal Balıklara Ait Av Miktarlarının Trend Analizi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 39-44.
How to cite: Saygu, İ. (2022). Trend Analysis of Demersal Fish Landings in the Black Sea. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 39-44.

*ID: <https://orcid.org/0000-0003-1348-2988>

*Sorumlu yazarın:

İsmet SAYGU

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi,
Avlama Teknolojisi Bölümü, Balcalı Kampüs,
01330, Sarıçam, Adana, Türkiye.

✉: isaygu@cu.edu.tr

Öz: Türkiye'de balık avı istatistikleri Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) ve T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı koordinasyonunda periyodik olarak toplanıp Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütüne (FAO) raporlanmaktadır. Av miktarlarının doğruluğu konusunda tartışmalar olsa da trendlerinin güvenilir olabileceği birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Bu yüzden, av istatistikleri, stok değerlendirmeleri ve balıkçılık yönetimi için oldukça değerli bir veri kaynağıdır. Bu çalışma kapsamında, Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde baskın olarak yakalanan demersal balık türlerine (mezgit, barbun, tekir ve kalkan) ait av değerlerinin zamansal değişimleri trend analizleriyle incelenmiştir. Genel olarak zaman serisi av miktarlarına bakıldığında 1980'li yılların sonunda av miktarlarının pik yaptığı ve sonrasında kayda değer bir azalma olduğu ve akabinde 2000'li yıllardan sonra miktarların daha stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Bu süreç Karadeniz ekosistemi için tanımlanmış trofik dönüşüm süreci ile örtüşmektedir. Trend analizi sonuçlarına göre, barbun ($p < 0.001$) ve kalkan ($p < 0.001$) negatif trend gösterirken, tekir ($p < 0.05$) pozitif trend göstermiştir. Mezgit avında ise önemli bir değişim tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Karadeniz'in doğu kısmında kayda değer bir alanın dip trol balıkçılığına kapalı olmasına rağmen, mezgit ve barbun gibi çoğunluğu dip trolü ile yakalandığı bilinen türlerin sırasıyla %75'inin ve %59'unun bu bölgeden rapor edilmesi, Sinop ve Ordu arasındaki trol sahasının önemini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Barbun, kalkan, mezgit, tekir, TÜİK.

Trend Analysis of Demersal Fish Landings in the Black Sea

Abstract: Fishing statistics is periodically collected in Turkey under the coordination of Turkish Statistical Institute (TUIK) and the Ministry of Agriculture and Forestry, and reported to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Although there are debates about the accuracy of catch amounts, it has been demonstrated by many studies that the trends of time series catch amounts are reliable. Therefore, catch statistics constitute an important source of data for stock assessment and fisheries management. Using trend analysis, the aim of this study is to investigate the temporal changes of catch amounts of demersal fish species (whiting, red mullet, surmullet and turbot), which are predominantly caught in the Black Sea region of Turkey. Results showed that the catch amounts peaked at the end of the 1980s, decreased in the following years and then remained more stable after the 2000s. This story coincides with the trophic transformation process defined for the Black Sea ecosystem. According to the trend analysis results, red mullet ($p < 0.001$) and turbot ($p < 0.001$) showed a negative trend, while surmullet ($p < 0.05$) showed a positive trend. The change in whiting catch was not statistically significant ($p > 0.05$). Although a significant part of the eastern side of the Black Sea is prohibited for bottom trawling, this area is responsible for important proportion of the catch of red mullet (75%) and whiting (59%) that remarkably caught by bottom trawlers in the Black Sea. Therefore, results highlighted the importance of trawling area between Sinop and Ordu.

Keywords: Red mullet, surmullet, turbot, whiting, TUIK.

*Corresponding author's:

İsmet SAYGU

Çukurova University, Faculty of Fisheries,
Fishing Technology Department, Balcalı
Campus, 01330, Sarıçam, Adana, Turkey.

✉: ismetsaygu@gmail.com

GİRİŞ

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 1945 yılında kurulmuş ve 1950 yılından itibaren küresel balık avı istatistiklerini rapor etmeye başlamıştır. Bu istatistikler üye ülkeler tarafından rapor edilen miktarlara bağlıdır. Bu sebeple, istatistiklerin güvenilirliği, ülkeler tarafından yapılan eksik raporlama, illegal balıkçılık ya da bölgesel balık isimlerinden kaynaklanan karışıklıklar gibi faktörler tarafından etkilendiği için, bugüne kadar tartışılmalıdır (Ulman vd., 2013; Ulman, 2014; Ulman & Pauly, 2016). Örneğin, Ulman ve Pauly, (2016), Türkiye av istatistiklerini yeniden yapılandırmış ve gerçek av miktarının Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından rapor edilenden %63 daha fazla olduğunu tahmin etmişlerdir.

Ancak tüm bunlara rağmen, FAO tarafından rapor edilen av (karaya çıkarma) istatistikleri, günümüzde rapor edilmesi sürdürülen tek zaman serisi av verisi olma özelliğini taşımaktadır ve stokların değerlendirilmesi ve yönetilmesinde kritik öneme sahiptir (Watson & Pauly, 2001). Bu istatistikler, ekosistem yapı ve fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde işleyip işlemediğinin takibi amacıyla kullanılan birçok indikatörün hesaplanmasında da kullanılmaktadır (Coll vd., 2015; Pauly & Christensen, 1995; Pauly vd., 1998). Üstelik, av istatistikleri temelli metotlar ile stok değerlendirmeleri yapılabilmektedir (Froese vd., 2017). Yapılan çalışmalar açıkça göstermektedir ki, av miktarlarından ziyade trendlerin kullanılması, yapılan değerlendirmelerin belirsizliğini düşürmektedir (Garibaldi, 2012; Mavruk, 2020; Sullivan, 2003). Bu da av istatistiklerinin bu derece kullanılabilir olmasının başlıca nedenidir.

Türkiye’de avcılık yolu ile elde edilen su ürünleri üretiminin çok önemli bir kısmı Karadeniz’den ve küçük pelajik balıklardan sağlanmaktadır (Tokaç vd., 2012). Örneğin, 2020 yılı TÜİK istatistiklerine göre, bu oran %75’tir. Pelajik baskın bir sistem olan Karadeniz’den elde edilen avın ise %95’ini pelajik türler ve bununda %71’ini hamsi tek başına oluşturmaktadır. Benzer şekilde, demersal türlerin toplam Karadeniz avındaki oranı sadece %5 iken, bunun %97 gibi büyük bir kısmı 4 baskın tür tarafından oluşturulmaktadır. Bu türler, mezigit (*Merlangius merlangus*), barbun (*Mullus barbatus*), tekir (*Mullus surmuletus*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*)’dır (TÜİK, 2021). Bu çalışmanın amacı Karadeniz’in bu dört baskın demersal türüne ait av miktarının yıllar arasındaki değişimini trend analizleriyle incelemektir.

MATERYAL VE METOT

Çalışma kapsamında kullanılan av istatistiklerine ait zaman serisi TÜİK ve FAO veri tabanlarından elde edilmiştir. Türkiye’de bu istatistikler 1967 yılından itibaren

periyodik olarak toplanmakta ve FAO’ya rapor edilmektedir. FAO veri tabanından 1970 - 2019 yılları arası veriye ulaşılabılırken, TÜİK 2000 – 2020 yılları arasındaki veriyi internet üzerinden erişime sunmaktadır. Bu iki veri seti bir araya getirilerek 1970 – 2020 yılları arasındaki 50 yıllık süreci kapsayan bir zaman serisi veri seti elde edilmiştir. FAO, av istatistiklerini Türkiye’nin Karadeniz Münhasır Ekonomik Bölgesi için ilan ederken, TÜİK istatistikleri Kastamonu ile batısında yer alan iller “batı Karadeniz” ve Sinop ile doğusunda yer alan iller “doğu Karadeniz” olacak şekilde bölgesel av miktarlarını da rapor etmektedir. Karşılaştırma yapabilmek bakımından bu 20 yıllık veri seti batı Karadeniz, doğu Karadeniz ve bunların toplamı olmak üzere ayrı ayrı analiz edilmiştir. Çalışma kapsamında, Karadeniz’in baskın olarak yakalanan dört ekonomik türü olan mezigit, barbun, tekir ve kalkan değerlendirmeye alınmıştır. Barbun ve tekir av istatistiklerinde muhtemel bir tür karışıklığı literatürde bildirildiğinden dolayı bu iki tür birleştirilerek yeni bir grup elde edilmiştir (Mavruk vd., 2021). Buna ek olarak bu dört tür birleştirilerek toplam bir av değeri de analize dahil edilmiştir.

İstatistiksel Analiz: Çalışma kapsamında sözü edilen dört tür ile bunların toplamına ait av değerlerinin değişimini incelemek amacıyla farklı bölge ve zaman dilimlerini temsil eden veri setleri hazırlanmıştır. Öncelikle 1970 – 2020 yılları arasındaki 50 yıllık süreçte Karadeniz kıyılarımızın tümündeki değişim analiz edilmiş, ardından 2000-2020 yılları arasındaki 20 yıllık süreçte doğu ve batı Karadeniz ile bunların toplamı için rapor edilen av miktarlarının değişimi incelenmiştir. Trend parametrik olmayan Mann-Kendall korelasyonu ile analiz edilmiştir (Hipel & McLeod, 1994). Değişimin şiddetini incelemek amacıyla Theil-Sen regresyon sabitleri hesaplanmıştır (Sen, 1968). Hesaplamalar için R kütüphaneleri “Kendall” (McLeod, 2015) ve “zyp” (Bronaugh & Werner, 2019) kullanılmıştır. Mann-Kendall skoru (S) ve korelasyon katsayısı (τ) aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$S = \sum_{k=1}^{n-1} \sum_{j=k+1}^n \text{sgn}(x_j - x_k),$$

$$\text{sgn}(x) = \begin{cases} +1, & x > 0 \\ 0, & x = 0, \\ -1, & x < 0 \end{cases}$$

$$\tau = \frac{S}{\binom{n}{2}}.$$

Theil-Sen’in eğimi (b_{sen}) ise aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$d_k = \frac{x_j - x_i}{j - i},$$

$$b_{\text{sen}} = \text{median}(d_k)$$

Eşitliklerde, $i < j < n$ ’dir. i ve j zaman serisi X_i ’nin indeksleridir.

BULGULAR

Türkiye'nin Karadeniz kıyılarında baskın olarak yakalanan ekonomik demersal balık türlerinin (mezgit, barbun, tekir ve kalkan) 2020 yılı için toplam av miktarı 246586 ton'dur. TÜİK tarafından rapor edilen 2000 – 2020 yıllarının ortalaması değerlendirildiğinde, bu dört baskın tür arasında mezgit %76,3 ile en çok karaya çıkarılan tür olmuştur. Bu türü sırasıyla, tekir (%14,3), barbun (%5) ve kalkan (%4,4) takip etmektedir. TÜİK karaya çıkarma verileri batı ve doğu Karadeniz için ayrı incelendiğinde, mezgit avının %41'i batı ve %59'u doğudan rapor edilmiştir. Tekir avının %80'i, barbun avının ise %25'inin batıdan rapor edildiği görülmektedir. Ancak, barbun ve tekir birleştirildiğinde avın %66'sı batıdan bildirilmiştir. Kalkan'ın ise %72'sinin batıdan ve %28'inin doğudan yakalandığı bildirilmiştir.

Uygulanan trend analizlerinin sonuçları Şekil 1 ve Tablo 1'de sunulmuştur. Dört önemli demersal tür için de av trendleri 50 yıllık zaman serisi ve 20 yıllık zaman serisi için benzer bulunmuştur (Tablo 1).

Mezgit'in av değeri 1973 yılında en düşük (2476 ton) ve 1988 yılında en yüksek (28263 ton) seviyelerine ulaşmış ardından ciddi bir azalma eğilimine girmiş, 2018 yılında 1073 ton seviyesine kadar düşmüştür (Şekil 1). Bu yüzden, hem 1970 – 2020 hem de 2000- 2020 yılları arasındaki değişim istatistik açıdan önemli bulunmamıştır. Bölgesel olarak incelendiğinde ise, Karadeniz'in batısını temsil eden av değerleri istatistik açıdan önemli pozitif trend gösterirken ($p<0,01$), doğuyu temsil eden değerlerdeki değişim istatistik açıdan önemli bulunmamıştır (Tablo 1).

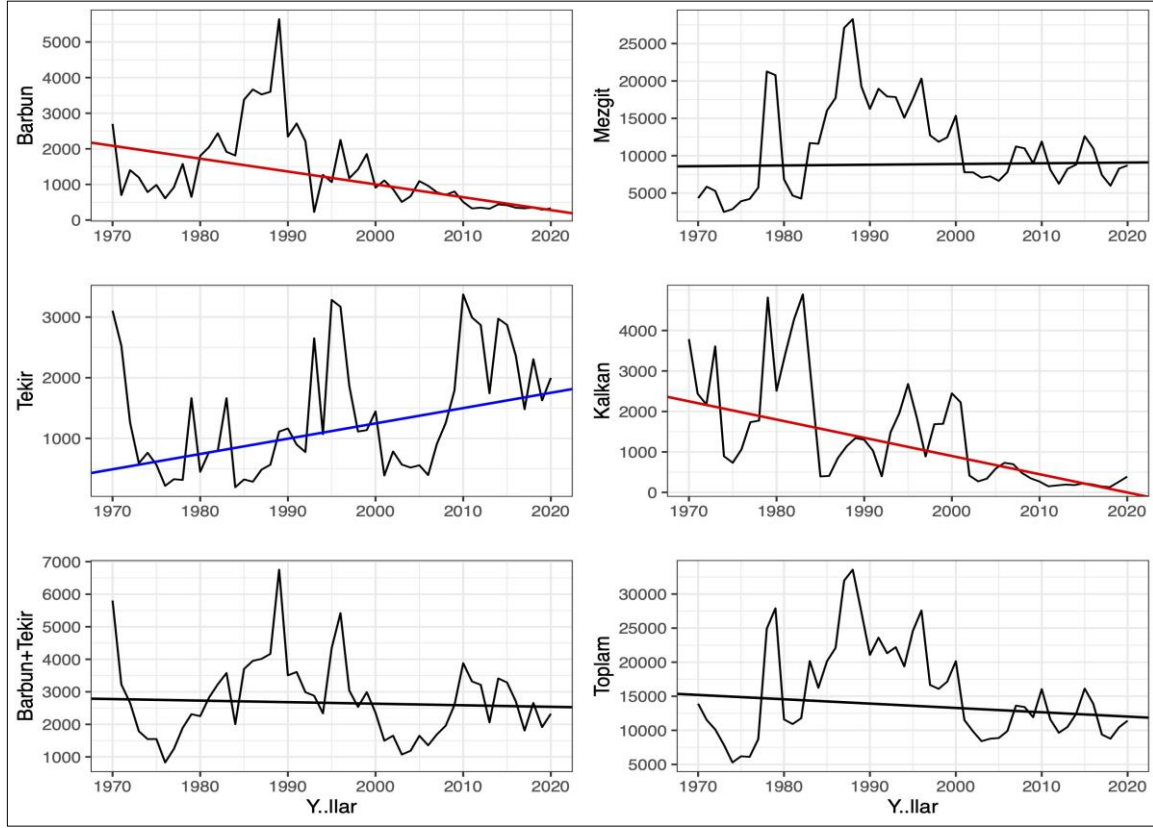
Barbun av değerleri 1989 yılında en yüksek (5641 ton) seviyeye ulaşırken, 1993 yılında 227 tona kadar düşmüştür. Batı ve doğu Karadeniz'den gerçekleştirilen toplam barbun avı önemli ölçüde azalış göstermiştir ($p<0,001$). Tekir ise, 1984 yılında 195 ton ile en düşük ve 1995 (3283 ton) ve 2010 (3373 ton) yıllarında ise en yüksek değerleri almıştır. Barbunun aksine tekir avı artış eğilimindedir ($p<0,05$). Barbun ve tekir türlerinin av verileri birleştirilerek yapılan değerlendirme sonucunda ise, bu grubun 1976 yılında 829 ton ile en düşük av değerini verdiği ve 1989 yılında en yüksek değere (6753 ton) ulaştığı görülmüştür. Batı Karadeniz'den elde edilen toplam barbun ve tekir avı, istatistiksel açıdan önemli ölçüde artış gösterirken ($p<0,05$), doğu Karadeniz için yapılan trend analizinde değişimin istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür. Ayrıca, Karadeniz'in tamamı için, 2000 - 2020 yıllarında önemli bir artış gözlenirken ($p<0,05$), 1970 – 2020 arasındaki sürecin tamamı incelendiğinde av miktarında herhangi bir değişim olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1 ve Tablo 1).

Kalkan balığının av miktarı 1983 yılındaki en yüksek değerden (4891 ton) sonra ciddi bir düşüş göstermiş ve 2018 yılında 128 ton ile en düşük değer kayda geçmiştir (Şekil 1). Doğu ve batı Karadeniz ile Karadeniz'in tamamı için yapılan trend analizlerinde kalkan avındaki düşüş istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Tablo 1).

Toplam avın değişimi her iki zaman serisi için de önemli bulunmamıştır (Tablo 1). Bölgelere göre incelendiğinde ise batı Karadeniz'deki toplam av miktarının artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye'nin Karadeniz kıyılarında baskın olarak av veren demersal balık türlerinden barbun, tekir, mezgit ve kalkan'ın zaman serisi av istatistikleri incelendiğinde, barbun ve kalkan'ın negatif, tekir'in ise pozitif trend gösterdiği belirlenmiştir. Mezgit avı ise zaman içerisinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermemiştir. Genel olarak zaman serisi av miktarlarına bakıldığında 1980'li yılların sonunda av miktarlarının en üst düzeylere ulaştığı, sonrasında av miktarlarında kayda değer bir azalma olduğu ve akabinde 2000'li yıllardan sonra miktarların görece stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Bu süreç Karadeniz ekosistemi için tanımlanmış ve iyi bilinen 1960 – 2000 yılları arasında gerçekleşen trofik dönüşüm süreci ile örtüşmektedir (Akoglu vd., 2014; Oguz, 2017; Oguz & Gilbert, 2007). 1960'lı yıllardaki sağlıklı ekosistem döneminden 1980'lere kadarki süreçte balık stokları aşırı sömürülmeye başlamış ve artan organik yük nedeniyle birincil ve ikincil üretim aşırı miktarda artmıştır (Oguz vd., 2012). Kıyısız ekosistemdeki bentik fauna ve flora hipoksiya nedeniyle kötüye gitmiştir (Friedrich vd., 2014; Mee, 2006). Buna paralel olarak, balıkçı filolarında gerek boyut gerek ise teknolojik cihazlar bakımından hızlı bir ilerleme gerçekleşmiştir (Gücü, 2002). 1980'li yıllarda Karadeniz ekosistemine giriş yapan istilacı deniz anası türü *Mnemiopsis leidyi*, ekosistem kontrol mekanizmaları bakımından kritik öneme sahip ve Karadeniz'in baskın küçük pelajik balığı olan hamsi yumurta ve larvaları ile beslenmesi nedeniyle ekosistemin trofik yapısındaki köklü değişikliklerin nedenlerinden biri olmuştur (Akoglu vd., 2014; Kideys, 2002; Oguz, 2017; Shiganova & Bulgakova, 2000). 1989 yılında bu deniz anası türünün miktarında meydana gelen artış ile Karadeniz toplam av miktarındaki hızlı düşüş paralellik göstermektedir (Oguz, 2007). Devam eden yıllarda bir başka egzotik deniz anası türü olan *Beroe ovata* Karadeniz ekosistemine giriş yapmış ve *M. leidyi*'nin avcısı olması nedeniyle hamsi – *M. leidyi* arasındaki etkileşimin dengeye oturmasında önemli rol oynamıştır (Oguz, 2017). Karadeniz ekosistemi 2000'li yılların hemen başından itibaren av miktarları, birincil ve ikincil üretim bakımından daha ortalama değerlere ulaşmıştır (Oguz vd., 2012).



Şekil 1. Karadeniz'in baskın demersal türlerinin 1970–2020 yılları arası av miktarlarının (ton) zaman serisi. Düz çizgiler doğrusal trendleri göstermektedir. Kırmızı, mavi ve siyah renkler ise sırasıyla; istatistiki açıdan önemli negatif trend, istatistiki açıdan önemli pozitif trend ve istatistiki açıdan önemli olmayan trendi temsil etmektedir.

Figure 1. Time series of fisheries catches (tonnes) for dominant demersal species in the Black Sea between 1970 and 2020. Solid lines indicate linear trends. Red and blue lines represent negative and positive trends, respectively.

Tablo 1. Mann-Kendall korelasyon ve Theil Sen regresyon analizlerinin sonuçları.

Table 1. Results of Mann-Kendall correlation and Theil-Sen's regression analyses.

Tür/Grup	Eğim (bsen)	Sabit (a)	Kendalls' tau
1970 - 2020 Tüm Karadeniz			
Mezgit	0,03	8599,0	0,02
Barbun	-0,10	2085,7	-0,44***
Tekir	0,07	490,3	0,29**
Barbun+Tekir	-0,01	2778,0	-0,03
Kalkan	-0,12	2252,1	-0,54***
Toplam	-0,17	15203,6	-0,11
2000 - 2020 Tüm Karadeniz			
Mezgit	0,24	-2003,4	0,03
Barbun	-0,10	1988,8	-0,64***
Tekir	0,24	-2003,4	0,39*
Barbun+Tekir	0,15	-59,5	0,34*
Kalkan	-0,10	1988,8	-0,51**
Toplam	0,06	10400,0	0,04
2000 - 2020 Batı Karadeniz			
Mezgit	0,28	-1044,8	0,43**
Barbun	-0,02	474,7	-0,54***
Tekir	0,20	-1736,2	0,39*
Barbun+Tekir	0,17	-1184,6	0,34*
Kalkan	-0,02	530,6	-0,41*
Toplam	0,40	-798,3	0,36*
2000 - 2020 Doğu Karadeniz			
Mezgit	-0,25	8613,6	-0,27
Barbun	-0,07	1456,5	-0,56***
Tekir	0,04	-358,4	0,35*
Barbun+Tekir	-0,02	945,5	-0,12
Kalkan	-0,02	391,6	-0,49**
Toplam	-0,30	10035,8	-0,28

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

Ancak, tekir av miktarlarının zaman serisine bakıldığında, Karadeniz ekosistemi için tanımlanan bu süreç ile uyum göstermeyip, beklenenden farklı bir durum gözlenmiştir. Bunun nedeninin barbun ve tekir istatistiklerinin toplanması sırasında meydana gelen isim karışıklığı olması kuvvetle muhtemeldir ve tekir olarak verilen avın önemli bir kısmı yine barbun avı olabilir (Çelik Mavruk vd., 2021). Buradaki belirsizliği ortadan kaldırmak için her iki tür birleştirilerek de analiz edilmiştir. Bu yeni grubun zaman serisi, beklenen artış ve azalışlar ile uyum göstermektedir.

Karadeniz'de barbun avının %88'i dip trol balıkçılığında gelmektedir (Çelik Mavruk vd., 2021). Barbun stoklarındaki azalmanın dip trol balıkçılık baskısındaki artış ile uyumlu olduğu bilinmektedir (Salihoglu vd., 2017). 2020-2024 yılları arasında yürürlükte olan 5/1 numaralı Ticari Amaçlı Su Ürünleri Avcılığını Düzenleyen Tebliğ (Tebliğ No: 2020/20)'e göre, "Ordu İli, Ünye İlçesinde; Taşkana Burnundan Gürcistan sınırına kadar olan karasularımızda, her türlü trol ile su ürünleri avcılığı yasaktır" (Resmi Gazete, 2020). Buna rağmen, TÜİK tarafından rapor edilen barbun avının %75'i ve toplam barbun ve tekir avının %34'ü Karadeniz'in doğu bölgesinden rapor edilmektedir. Bunun

sebebi, Sinop ile Ordu illeri arasında kalan ve doğu bölgesindeki dip trolüne izin verilen bu sınırlı alanın dip trolüne uygun ve demersal türler açısından verimli olması olabilir (Knudsen vd., 2010). TÜİK mikro veri setinin incelendiği bir çalışma, Karadeniz’de barbun ve tekir’in dip trolü ile en çok Sinop ile Ordu arasında kalan Samsun ilinde yakalandığını göstermiştir (Çelik Mavruk vd., 2021). Benzer durum mezgit için de tanımlanabilir (Knudsen vd., 2010). Mezgit çoğunlukla dip trolü ile yakalanan bir türdür (Anonim, 1986; Knudsen vd., 2010) ve avının %59’u doğu Karadeniz’den rapor edilmiştir. Bu durumda, Karadeniz’de dip trol balıkçılığı ile ilgili değerlendirmeler yapılırken, Karadeniz’in en baskın demersal balık türlerinin barbun, tekir ve mezgit olduğu düşünüldüğünde, Sinop – Ordu arasında trol çekilebilir sahasının doğu Karadeniz olarak tanımlanan alanı neredeyse tek başına temsil ettiği dikkate alınmalı ve demersal türler konusundaki değerlendirmeler bu çerçevede yapılmalıdır. Ayrıca, TÜİK’in büyük göçler yapmayan demersal türler için av miktarlarını en azından batı, orta ve doğu Karadeniz olarak ilan etmesi faydalı olabilir. Her ne kadar bu detaylar TÜİK mikro veri setinde mevcut olsa da, ilgili veri seti kolaylıkla ulaşılabilir olmayıp bir takım başvuru süreci gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

- Akoglu, E., Salihoglu, B., Libralato, S., Oguz, T. & Solidoro, C. (2014).** An indicator-based evaluation of Black Sea food web dynamics during 1960-2000. *Journal of Marine Systems*, *134*, 113-125. DOI: [10.1016/j.jmarsys.2014.02.010](https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.02.010)
- Anonim. (1986).** *Orta Karadeniz (Sinop-Ünye) Trol Sahalarının Hidrografisi ve Verimliliği.*
- Bronaugh, D. & Werner, A. (2019).** *Zhang + Yue-Pilon Trends Package.*
- Coll, M., Shannon, L.J., Kleisner, K.M., Juan-jordá, M.J., Bundy, A., Akoglu, A.G., Banaru, D., Boldt, J.L., Borges, M.F., Cook, A., Diallo, I., Fu, C., Fox, C., Gascuel, D., Gurney, L.J., Hattab, T., Heymans, J.J., Jouffre, D., Knight, B.R., Kucukavsar, S., Large, S.I., Lynam, C., Machias, A., Marshall, K.N., Masski, H., Ojaveer, H., Piroddi, C., Tam, J., Thiao, D., Thiaw, M., Torres, M.A., Travers-Trolet, M., Tsagarakis, K., Tuck, I., van der Meeren, G.I., Yemane, D., Zador, S.G. & Shin, Y. (2015).** Ecological indicators to capture the effects of fishing on biodiversity and conservation status of marine ecosystems. *Ecological Indicators*, *60*, 947-962. DOI: [10.1016/j.ecolind.2015.08.048](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.08.048)
- Çelik Mavruk, N., Mavruk, S. & Avşar, D. (2021).** Assessment of goatfish fisheries in Turkey based on the microdata set of official landing statistics. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *38*(3), 303-309. DOI: [0.12714/egejfas.38.3.06](https://doi.org/10.12714/egejfas.38.3.06)
- Demirel, N., Zengin, M. & Ulman, A. (2020).** First Large-Scale Eastern Mediterranean and Black Sea Stock Assessment Reveals a Dramatic Decline. *Frontiers in Marine Science*, *7*, 1-13. DOI: [10.3389/fmars.2020.00103](https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00103)
- Friedrich, J., Janssen, F., Aleynik, D., Bange, H.W., Boltacheva, N., Çagatay, M.N., Dale, A.W., Etiopie, G., Erdem, Z., Geraga, M., Gilli, A., Gomoiu, M.T., Hall, P.O.J., Hansson, D., He, Y., Holtappels, M., Kirf, M.K., Kononets, M., Konovalov, S., Lichtschlag, A., Livingstone, D.M., Marinaro, G., Mazlumyan, S., Naeher, S., North, R.P., Papatheodorou, G., Pfannkuche, O., Prien, R., Rehder, G., Schubert, C.J., Soltwedel, T., Sommer, S., Stahl, H., Stanev, E.V., Teaca, A., Tengberg, A., Waldmann, C., Wehrli, B. & Wenzhöfer, F. (2014).** Investigating hypoxia in aquatic environments: Diverse approaches to addressing a complex phenomenon. *Biogeosciences*, *11*(4), 1215-1259. DOI: [10.5194/bg-11-1215-2014](https://doi.org/10.5194/bg-11-1215-2014)
- Froese, R., Demirel, N., Coro, G., Kleisner, K.M. & Winker, H. (2017).** Estimating fisheries reference points from catch and resilience. *Fish and Fisheries*, *18*(3), 506-526. DOI: [10.1111/faf.12190](https://doi.org/10.1111/faf.12190)
- Garibaldi, L. (2012).** The FAO global capture production database: A six-decade effort to catch the trend. *Marine Policy*, *36*(3), 760-768. DOI: [10.1016/j.marpol.2011.10.024](https://doi.org/10.1016/j.marpol.2011.10.024)
- Gücü, A.C. (2002).** Can Overfishing be Responsible for the Successful Establishment of *Mnemiopsis leidyi* in the Black Sea? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *54*(3), 439-451. DOI: [10.1006/ecss.2000.0657](https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0657)
- Hipel, K.W. & McLeod, A.I. (1994).** *Time Series Modelling of Water Resources and Environmental Systems.* Amsterdam: Elsevier.
- Kideys, A.E. (2002).** Fall and rise of the Black Sea ecosystem. *Science*, *297*, 1482-1484. DOI: [10.1126/science.1073002](https://doi.org/10.1126/science.1073002)
- Knudsen, S., Zengin, M. & Koçak, M.H. (2010).** Identifying drivers for fishing pressure. A multidisciplinary study of trawl and sea snail fisheries in Samsun, Black Sea coast of Turkey. *Ocean and Coastal Management*, *53*(5-6), 252-269. DOI: [10.1016/j.ocecoaman.2010.04.008](https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2010.04.008)
- Mavruk, S. (2020).** Trends of white grouper landings in the Northeastern Mediterranean: Reliability and potential use for monitoring. *Mediterranean*

- Marine Science*, **21**(1), 183-190. DOI: [10.12681/MMS.18986](https://doi.org/10.12681/MMS.18986)
- McLeod, A.I. (2015)**. Kendall rank correlation and Mann-Kendall trend test.
- Mee, L. (2006)**. Reviving dead zones. *Scientific American*, **295**(5), 78-85.
- Oguz, T. (2007)**. Nonlinear response of Black Sea pelagic fish stocks to over-exploitation. *Marine Ecology Progress Series*, **345**, 211-228.
- Oguz, T. (2017)**. Controls of multiple stressors on the Black Sea fishery. *Frontiers in Marine Science*, **4**, 1–12. DOI: [10.3389/fmars.2017.00110](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00110)
- Oguz, T., Akoglu, E. & Salihoglu, B. (2012)**. Current state of overfishing and its regional differences in the Black Sea. *Ocean and Coastal Management*, **58**, 47-56. DOI: [10.1016/j.ocecoaman.2011.12.013](https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2011.12.013)
- Oguz, T. & Gilbert, D. (2007)**. Abrupt transitions of the top-down controlled Black Sea pelagic ecosystem during 1960-2000: Evidence for regime-shifts under strong fishery exploitation and nutrient enrichment modulated by climate-induced variations. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **54**(2), 220-242. DOI: [10.1016/j.dsr.2006.09.010](https://doi.org/10.1016/j.dsr.2006.09.010)
- Pauly, D. & Christensen, V. (1995)**. Primary production required to sustain global fisheries. *Nature*, **374**, 255-257.
- Pauly, D., Christensen, V., Dalsgaard, J., Froese, R. & Torres, J.F. (1998)**. Fishing down marine food webs. *Science*, **279**(5352), 860-863. DOI: [10.1126/science.279.5352.860](https://doi.org/10.1126/science.279.5352.860)
- Resmi Gazete. (2020)**. 5/1 Commercial Fishery Regulation Rescripts of Republic of Turkey (No: 2020/20).
- Salihoglu, B., Arkin, S.S., Akoglu, E. & Fach, B.A. (2017)**. Evolution of Future Black Sea Fish Stocks under Changing Environmental and Climatic Conditions. *Frontiers in Marine Science*, **4**, 1-19. DOI: [10.3389/fmars.2017.00339](https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00339)
- Sen, P.K. (1968)**. Estimates of the Regression Coefficient Based on Kendall's Tau. *Journal of the American Statistical Association*, **63**(324), 1379-1389.
- Shiganova, T.A. & Bulgakova, Y.V. (2000)**. Effects of gelatinous plankton on Black Sea and Sea of Azov fish and their food resources. *ICES Journal of Marine Science*, **57**, 641-648. DOI: [10.1006/jmsc.2000.0736](https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0736)
- Sullivan, M.G. (2003)**. Exaggeration of Walleye Catches by Alberta Anglers. *North American Journal of Fisheries Management*, **23**(2), 573-580.
- Tokaç, A., Gücü, A. C. & Öztürk, B. (Eds.). (2012)**. *The state of the Turkish fisheries*. Publication Number: 34, Türk Deniz Araştırmaları Vakfı (TÜDAV), İstanbul, Türkiye, 516s.
- TÜİK. (2021)**. <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim tarihi: 04.02.2022.
- Ulman, A. (2014)**. *Actual and perceived decline of fishery resources in Turkey and Cyprus: a history with emphasis on shifting baselines*. The University of British Columbia. 189s. Vancouver, Canada.
- Ulman, A., Bekişoğlu, Ş., Zengin, M., Knudsen, S., Ünal, V., Mathews, C., Harper, S., Zeller, D. & Pauly, D. (2013)**. From bonito to anchovy: A reconstruction of Turkey's marine fisheries catches (1950-2010). *Mediterranean Marine Science*, **14**(2), 309-342. DOI: [10.12681/mms.414](https://doi.org/10.12681/mms.414)
- Ulman, A. & Pauly, D. (2016)**. Making history count: The shifting baselines of Turkish fisheries. *Fisheries Research*, **183**, 74-79. DOI: [10.1016/j.fishres.2016.05.013](https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.05.013)
- Watson, R., & Pauly, D. (2001)**. Systematic distortions in world fisheries catch trends. *Nature*, **414**(6863), 534–536. DOI: [10.1038/35107050](https://doi.org/10.1038/35107050)



The Difference Between The Response To Glutamate Excitotoxicity and The Role Of Ca²⁺ Channel Blockers in Cortical Neuron and SH-SY5Y Cells Cultures

Betul CICEK¹ Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGH^{2,3*} Ahmet HACIMUFTUOGLU² Aysegul YILMAZ²

¹Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, 24100 Erzincan, Turkey

²Ataturk University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, 25240 Erzurum, Turkey

³Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 25240 Erzurum, Turkey

Received: 03.10.2021

Accepted: 23.02.2022

Published: 31.03.2022

How to cite: YAZAR. & YAZAR. (2022). The Difference Between The Response To Glutamate Excitotoxicity and The Role Of Ca²⁺ Channel Blockers in Cortical Neuron and SH-SY5Y Cells Cultures. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 45-52.

Atıf yapmak için: YAZAR. & YAZAR. (2022). Kortikal Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürlerinde Glutamat Eksitotoksitesine Yanıt ile Ca²⁺ Kanal Blokerlerinin Rolü Arasındaki Fark. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 45-52.

* <https://orcid.org/0000-0002-3506-0324>
<https://orcid.org/0000-0003-1395-1326>
<https://orcid.org/0000-0002-9658-3313>
<https://orcid.org/0000-0001-5843-1661>

*Corresponding author's:
Ali TAGHIZADEHGHALEHJOUGH
Faculty of Veterinary Medicine, Department of
Pharmacology and Toxicology, Ataturk
University, 25240 Erzurum, Turkey,
✉: ali.tgzd@atauni.edu.tr

Abstract: Cortical neuron and SH-SY5Y cells are widely used in glutamate excitotoxicity studies, but it is unclear which one better reflects this model. Generally, glutamate induces toxicity conditions by leading to L and L/N-Ca²⁺ channels activation and cell death via lethal Ca²⁺ influx. To evaluate this hypothesis, the effects of L and L/N-Ca²⁺ channel blockers, lacidipine, and amlodipine under excitotoxic conditions were evaluated. At the same time, in this study, we aimed to determine that these two cell lines better reflect this model. To induce excitotoxicity, cortical neuron and SH-SY5Y cells were incubated with glutamate 10⁻⁵ mM. After 30 min incubation with glutamate, agents of different concentrations (1, 2, and 4 µg lacidipine and 20, 50, and 100 µM amlodipine) were applied to these cells. Possible neuroprotective roles of lacidipine and amlodipine were investigated through cell viability, oxidative stress, and apoptotic alterations. Our results showed that SH-SY5Y cells are the more ideal cell line for oxidative stress-mediated glutamate toxicity. Although 4 µg lacidipine and 100 µM amlodipine have important neuroprotective roles in these cells, the most protective effect was also detected in SH-SY5Y cells at 100 µM amlodipine concentration. The highest viability rate on cell lines was found at 88.8 % in SH-SY5Y cells treated with 100 µM amlodipine. Results from the TAC, TOS, LDH assays, and flow cytometry analysis were correlated to our MTT results. Taken together, our results indicate that SH-SY5Y cells are more effective at reflecting glutamate-induced excitotoxicity and 100µM amlodipine has a more protective effect in treating this toxicity.

Keywords: Amlodipine, calcium, lacidipine, neurotoxicity.

Kortikal Nöron ve SH-SY5Y Hücre Kültürlerinde Glutamat Eksitotoksitesine Yanıt ile Ca²⁺ Kanal Blokerlerinin Rolü Arasındaki Fark

Öz: Kortikal nöron ve SH-SY5Y hücreleri glutamat eksitotoksitesine çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak hangisinin bu modeli daha iyi yansıttığı belirsizdir. Genel olarak glutamat, L ve L/N-Ca²⁺ kanallarının aktivasyonuna ve öldürücü Ca²⁺ akışı yoluyla hücre ölümüne yol açarak toksisite koşullarını indükler. Bu hipotezi değerlendirmek için eksitotoksik koşullar altında L ve L/N-Ca²⁺ kanal blokerleri, lasidipin ve amlodipinin etkileri değerlendirildi. Aynı zamanda bu çalışmada bu iki hücre hattının bu modeli daha iyi yansıttığını belirlemeyi amaçladık. Eksitotoksitesini indüklemek için kortikal nöron ve SH-SY5Y hücreleri 10⁻⁵ mM glutamat ile inkübe edildi. Glutamat ile 30 dakikalık inkübasyondan sonra, bu hücelere farklı konsantrasyonlarda (1, 2 ve 4 µg lasidipin ve 20, 50 ve 100 uM amlodipin) ajanlar uygulandı. Lasidipin ve amlodipinin olası nöroprotektif rolleri, hücre canlılığı, oksidatif stres ve apoptotik değişiklikler yoluyla araştırıldı. Sonuçlarımız SH-SY5Y hücrelerinin oksidatif stres aracılı glutamat toksisitesini daha iyi yansıttığını gösterdi. 4 µg lasidipin ve 100 µM amlodipin bu hücrelerde önemli nöroprotektif rollere sahip olmasına rağmen en yüksek koruyucu etki SH-

***Sorumlu yazar:**

Ali TAGHIZADEHGHAEHJOUGH
 Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve
 Toksikoloji Anabilim Dalı, Atatürk
 Üniversitesi, 25240 Erzurum, Türkiye.
 ✉: ali.tgzd@atauni.edu.tr

SY5Y hücrelerinde 100 µM amlodipin konsantrasyonunda de belirlendi. En yüksek canlılık oranı, 100 µM amlodipin ile tedavi edilen SH-SY5Y hücrelerinde %88,8 olarak bulundu. TAC, TOS, LDH ve flow sitometrik analizinden elde edilen sonuçlar MTT sonuçlarımızla benzerdi. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde SH-SY5Y hücrelerinin glutamat kaynaklı eksitotoksisiteyi yansıtmada daha etkili hücre hattı olduğunu ve 100 µM amlodipinin bu toksisitenin tedavisinde daha koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Amlodipin, kalsiyum, lasidipin, nörotoksiste.

INTRODUCTION

Glutamate excitotoxicity is one of the most extensively researched processes of neuronal cell death, and it is involved in the pathophysiological mechanism of many brain related diseases such as Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's disease (Binvignat & Olloquequi, 2020). In physiological conditions, glutamate has a function in neuronal communication such as synaptic plasticity and learning (Valtcheva & Venance, 2019). However, excessive glutamate give rise to neuronal injury and death through overstimulation of glutamate receptors, particularly the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype which can trigger influx of Ca²⁺ ions (Carvajal et al., 2016). Also, excessive Ca²⁺ flux through voltage-gated calcium channels (VGCC) such as L-, N- and P/Q-type amplify and propagate the phenomenon of glutamate excitotoxicity (Higley & Sabatini, 2012).

Ca²⁺ homeostasis is essential for the survival of neurons, on the other hand increased intracellular Ca²⁺ concentration disrupts calcium homeostasis, and free oxygen radicals formation which could degenerate neurons and synaptic loss (Godoy et al., 2021) (5). For this reason, blocking excitotoxicity through inhibition of VGCC activity in neurons are an especially appealing point for neuroprotection (Godoy et al., 2021; Higley & Sabatini, 2012; Kim et al., 2016). By contrast to neuroprotective effects of P/Q-type and N-type calcium channel blockers, there is a gap for L-type calcium channels blockers in relation to glutamate excitotoxicity (Vallazza-Deschamps et al., 2005; Wheeler et al., 1996). Although there are studies demonstrating the neuroprotective effects of lacidipine and amlodipine which are dihydropyridine calcium channel blockers, evidence supporting their roles as a neuroprotectant factor in glutamate excitotoxicity is almost not available (Choi et al., 2014; Khurana et al., 2021). Both lacidipine and amlodipine block L-channels, but their selectivity is different. Lacidipine is the more selective for L-channels, however, amlodipine blocks similar levels both N-type and L- type VGCC (Godfraind, 2017). Therefore, more research is needed to evaluate and define the mechanism by which types of Ca²⁺ channel blockers act more protectively against glutamate excitotoxicity.

Various cell lines are widely used to research in vitro excitotoxicity. However, the methodological employed

for signaling pathways activated in cell lines generally differ (Kritis et al., 2015). The rat cortical neuronal and human undifferentiated SH-SY5Y cells line is widely preferred in vitro toxicity researches. These cell lines are similar in their responses when exposed to glutamate, but it is questionable which one better reflects the this model (Barbosa et al., 2015; Krasil'Nikova et al., 2019; Kritis et al., 2015). L-type and N-type VGCC from these cells have been functionally characterized and identified

(Choi et al., 2014; Kritis et al., 2015; Wheeler et al., 1996). On the other hand, while cortical neuronal cells express NMDA receptors whether native/undifferentiated SHSY5Y cells express NMDA receptors is controversial (Sun et al., 2010; Yang et al., 2012).

Hence, cortical neuron and SH-SY57 (Human neuroblastoma) cells constitute an adequate model to research the problem posed here (i) to know whether L-type (lacidipine) and/or dual L/N-type (amlodipine) calcium channel blockers have neuroprotective effects in glutamate excitotoxicity; and (ii) to define which of the cortical neuron and SH-SY57 cells more efficacious to reflects the glutamate induced injury.

MATERIAL AND METHOD

Cell culture: Cortical neurons and human neuroblastoma SH-SY5Y cells were prepared and cultured as previously reported (Hu et al., 2012; Taghizadehghalehjoughi & Naldan, 2018). Frozen rat cortical neuronal cells obtained from the Pharmacology and Toxicology Department of Veterinary Medicine Faculty of Ataturk University (Erzurum, Turkey). Neuronal cells were resuspended in neurobasal medium contain B27, 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.1% antibiotic (penicillin–streptomycin–amphotericin B) (Taghizadehghalehjoughi & Naldan, 2018). The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL-2266™). SH-SYSY cells were grown DMEM media containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Hu et al., 2012). The cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂. The experiment was started when the cells reached 70-80% confluency.

Glutamate excitotoxicity model: Glutamate (Sigma®, USA) at 10^{-5} mM concentration was applied to the cell culture induce excitotoxic injury (Taghizadehghalehjoughi & Naldan, 2018). 30 minutes after glutamate administration, commercially obtained amlodipine and lacidipine (Sigma®, USA) were applied at different concentration (1, 2 and 4 μ g lacidipine and 20, 50 and 100 μ M amlodipine) to analyze ameliorating effects against glutamate excitotoxicity after 24h incubation. Each sample was prepared as triplicates and 10^{-5} mM glutamate was used as a positive control.

Lacidipine and amlodipine treatment: Cells were divided into sixteen groups at randomly: For cortical neuron and SHSY5Y cells; Control group, positive control group (only 10^{-5} mM glutamate) and different concentrations of lacidipine+glutamate groups (final concentration; 1, 2 and 4 μ g) and different concentrations of amlodipine + glutamate groups (final concentration; 20, 50 and 100 μ M). Cells were cultured in the plates for 24 hours and treated with lacidipine and amlodipine for another 24 hours. Glutamate was added 30 min prior to different concentration of lacidipine and amlodipine exposure to induce excitotoxicity.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) analysis: The susceptibility of the cells to amlodipine and lacidipine was determined in vitro by MTT (Sigma®, USA)-based colorimetric assay (Taghizadehghalehjoughi & Naldan, 2018). The MTT assay depends on evaluating the reduction, by dehydrogenases of metabolically active cells, of the reduction of yellow-colored MTT tetrazolium to purple-colored formazan. The intracellular formazan is soluble and can be measured by spectrophotometry. Briefly, neuronal and SH SY5Y cells were seeded in triplicate wells in a flat-bottomed 96-well plate at a density of 2×10^5 and 5×10^3 cells/cm² respectively and then administered with agents as previously described. MTT reagent (0.5 mg/ml final concentration) was added to the cells and the plates were incubated to a humidified chamber kept in a 37°C-5% CO₂ incubator for 4 h. Then the medium removed, and the 100 μ L DMSO (Sigma®, USA) was added to each well for dissolving crystals. Absorbance at 570 nm was determined using Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer reader (Thermo Scientific, Canada, USA). The cell viability (%) was calculated by the formula below;

Viability % ratio= (Sample absorbance value/ Control group absorbance value)X100 (18).

Determination of membrane integrity using an LDH Release assay: Lactate dehydrogenase (LDH) is a decisive enzyme found in all cell types that are speedily spread into the cell culture medium upon injury to the plasma membrane. LDH is the most commonly used marker for conducting a cytotoxicity test. The LDH assay protocol

depends on an enzymatic coupling reaction: LDH released from the cell oxidizes lactate to produce NADH, which then reacts with WST to form a yellow color. The intensity of the generated color associated directly with the number of lysed cells. The cells were seeded to 96-well plates and then the agents were applied as previously described. After that 100 μ L supernatant was transferred to a fresh 24-well plate and 100 μ L of the reaction mixture was added to the samples and incubated for 30 min at room temperature. Finally, a microplate reader (Thermo Scientific, Canada, USA) was used to measure the wavelength of 490 nm.

Determination of oxidative stress markers: TAC (Total antioxidant capacity) and TOS (Total Oxidant Status) kits were obtained commercially (manufactured by Rel Assay Diagnostics® Company, Gaziantep, Turkey). TAC TOS were determined using the the Erel method that is a novel automated colorimetric measurement (Erel, 2004; Erel, 2005). The measurement of TAC levels was depends on the ability of antioxidants to inhibit the formation of 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS)+ from the oxidation of ABTS at wavelength 660 nm by spectrophotometrically. TOS levels are based on the measurement of color intensity at 530 nm by oxidation of ferrous ioneo-dianisidine complex to ferric ion in the presence of various oxidative species under acidic condition. TAC results was shown as mM Trolox equivalent per liter (Trolox Equiv/mmol L⁻¹) whereas TOS results was shown in terms of micromolar hydrogen peroxide equivalent per liter (mmol H₂O₂ Equiv/mmol L⁻¹). Spectrophotometric measurements were done using Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer reader (Thermo Scientific, Canada, USA).

Annexin V-FITC (Fluorescein Isothiocyanate) and propidium iodide (PI) staining assay: The cortical neuron and SH-SY5Y cells were centrifuged to remove the medium, washed with PBS, and stained with 5 μ l Annexin V-FITC and 10 μ l of 20 μ g/ml PI in the binding buffer after treatment with different concentrations of lacidipine and amlodipine after 24 hours. Stained cells were determined using a flow cytometer (Beckman, S. Kraemer Boulevard Brea, CA,USA). Viable cells were negative for both Annexin V and PI ; apoptotic cells were negative for PI and positive for Annexin V, and late-apoptotic dead cells demonstrated both Annexin V and PI positivity Non-viable cells, which suffer from necrosis, were positive for PI and negative for Annexin V.

Statistical analysis: The significance of the mean difference between groups was investigated by the one-way ANOVA with the Tukey HSD multiple comparison. Descriptive statistics for continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation. *P*-value <0.05 was considered statistically.

RESULTS

MTT assay results: The cytotoxic effect of lacidipine and amlodipine was determined glutamate-induced excitotoxicity in neuron and neuroblastoma cells using MTT assay. As seen in Figure 1. Glutamate (10^{-5} mM) treatment at 24 hours reduced the number of neuron and SH-SY5Y neuroblastoma cells by 37% and 41% compared to controls, respectively. When the neuron cells were treated with lacidipine after applying with glutamate, cell viability statistically remarkably increased in dose-dependently. 2 μ g and 4 μ g lacidipine increased cell viability to 71% and 79%, respectively, relative to glutamate control cells ($P < 0.05$). However, only the highest dose of lacidipine (4 μ g) had a statistically protective effect in glutamate-induced excitotoxicity of SH-SY5Y cells, with 24 % increases in cell viability. 50 μ M and 100 μ M amlodipine showed 9% ($P < 0.05$) and 19% ($P < 0.05$) rate increased cell viability on neuronal cells compared to glutamate control group, respectively. On the other hand, 100 μ M amlodipine exhibited approximately a 30% increasing in cell viability as opposed to the glutamate control group in SH-SY5Y cells ($P < 0.001$). But the 20 μ M and 50 μ M amlodipine did not show a significant effect on cell viability in SH-SY5Y cells (Figure 1). The highest viability rate on cell lines was found 88.8 % in SH-SY5Y cells applied with 100 μ M amlodipine.

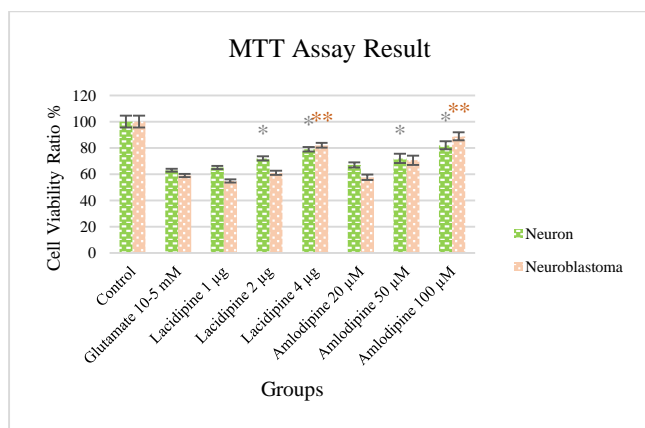


Figure 1. Effects of lacidipine and amlodipine on cell viability on glutamate- excitotoxicity in cortical neuron and SH-SY5Y cells. Indicated cells were treated with the 10^{-5} mM concentration of glutamate for 24 h. * and ** indicate $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively, compared to glutamate control cells.

LDH assay results: We compared the sensitivity of our MTT assay to the LDH release assay (Figure 2). 10^{-5} mM glutamate increased LDH release in both cortical neuron and SH-SY5Y cells compared to untreated controls. As shown in Figure 2, lacidipine treatment of 1 μ g and 2 μ g different doses did not protect cells from glutamate-induced excitotoxicity, but 4 μ g lacidipine exhibit protective effect in neuronal cells with glutamate excitotoxicity. Also, different concentrations of lacidipine did not demonstrated a

remarkable protective effect on LDH release except for 4 μ g lacidipine in SH-SY5Y cells. Both the neuron and neuroblastoma cells were detected 1 μ g and 2 μ g lacidipine had no protective effects compared to control, while 4 μ g lacidipine showed significantly a protective effect ($P < 0.05$). The highest dose of amlodipine only was determined to significantly decrease LDH release in neuron ($P < 0.05$) and SH-SY57 ($P < 0.001$) cells, however at 20 μ M and 50 μ M amlodipine concentration did not observe a significant change in both cell lines compared to glutamate control. The lowest LDH release on cell lines was found in SH-SY57 cells applied with 100 μ M amlodipine. The MTT test was much more sensitive than the LDH test. Significant differences in cell death were measured at lower concentrations of amlodipine and lacidipine by MTT assay.

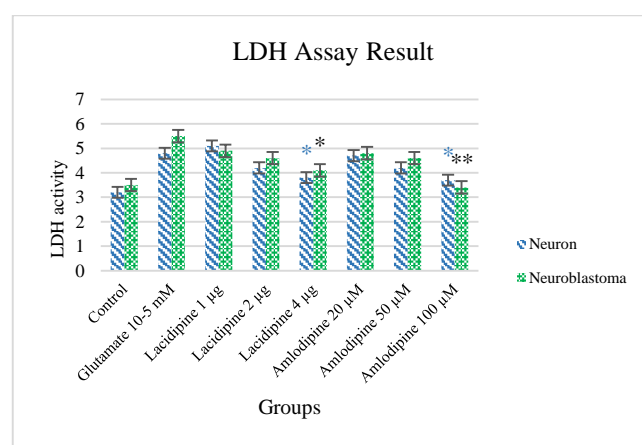


Figure 2. Effects of lacidipine and amlodipine on LDH release on glutamate excitotoxicity in cortical neuron and SH-SY5Y cells. Indicated cells were treated with the 10^{-5} concentration of glutamate for 24 h. * and ** indicate $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively, compared to glutamate control cells.

TAC and TOS results: In this study, the effects of lacidipine and amlodipine on oxidative changes caused by toxicity in neuronal and SH-SY5Y cultures were determined by TAC-TOS measurement (Figure 3a and 3b). In the control groups, TAC levels were determined 6.5 and 6.3 Trolox Equiv/mmol L^{-1} in neuron and SH-SY5Y cells, respectively. Applying of 10^{-5} mM glutamate reduced TAC levels in neuron and neuroblastoma cells to 2.8 and 2.4 Trolox Equiv/mmol L^{-1} respectively. 1 μ g and 2 μ g lacidipine did not show significant effect of TAC levels these cell cultures (2.9, 3.4; neuron, 2.6, 3.1; SH-SY5Y; respectively), however 4 μ g lacidipine lead to significantly increases TAC levels in neuron ($P < 0.05$) and SH-SY5Y ($P < 0.001$) cell 4,8 and 5,4 Trolox Equiv/mmol L^{-1} , respectively. In both cell cultures applying of 50 μ M and 100 μ M amlodipine significantly increased TAC levels (neuron 4.8 ($P < 0.05$) and 5.1 ($P < 0.001$); SH-SY5Y 4.5 ($P < 0.001$) and 5.8 ($P < 0.001$), respectively). 20 μ M amlodipine increased TAC level compared to the glutamate control in both cell culture, however this increasing was not statistically significant. The

findings showed that TOS levels decreased in parallel with the increase in TAC. And, applications with glutamate led to increasing of TOS levels in neuronal and SH-SY5Y cells (4.8 and 5.8 H₂O₂ Equiv/mmol L⁻¹, respectively). Exposure of 1 and 2 µg lacidipine, and 20 µM amlodipine in both cell cultures did not reduce a statistically significant in TOS

level. On the contrary, at 4 µg lacidipine, and 50 and 100 µM amlodipine concentrations were determined TOS levels decreased compared to control. This decrease was statistically $P < 0.001$ at 4 µg lacidipine and 100 µM amlodipine, but at 50 µM amlodipine $P < 0.05$.

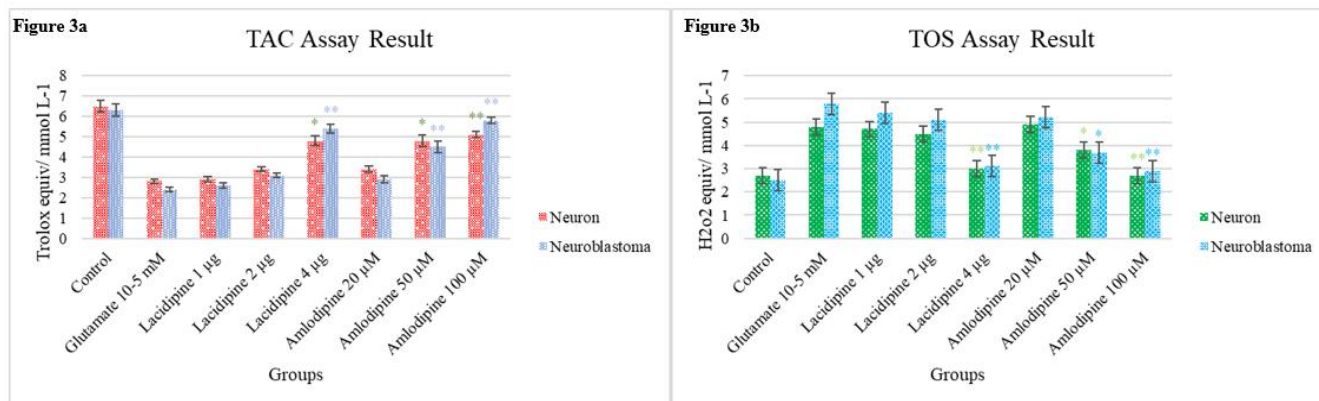


Figure 3a-b. Effects of lacidipine and amlodipine on TAC-TOS capacity on glutamate- excitotoxicity in cortical neuron and SH-SY5Y cells. Indicated cells were treated with the 10⁻⁵ concentration of glutamate for 24 h. * and ** indicate $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively, compared to glutamate control cells.

Annexin V-FITC (Fluorescein Isothiocyanate) and propidium iodide (PI) staining assay results: Annexin v-FITC and PI were used for evaluation apoptosis. We examined the development of apoptosis at the early apoptosis level or late apoptosis stage. The early apoptosis stage is a reversible process and cells can come back to normal. However, late apoptosis is an irreversible process for cells and is referred to by some researchers as the early stage of necrosis. Results are shown in Figure 4a and 4b.

According the neuron culture results (Figure 4a); the cell viability of control group was %96.43 and glutamate control group 50.49%. 10⁻⁵mM glutamate

increased the necrosis, early and late apoptosis (respectively 29.6%8, 9.39% and 10.44%) more than negative group (respectively 3.57%, 0.00% and 0.00%). In lacidipine treatment groups; The highest cell viability and the lowest necrosis, early and late apoptosis ratio were found 4 µg lacidipine group (respectively 67.06 %, 0.24 %, 32.15% and 0.55%). Among the amlodipine groups, the maximum viability (79.07%) was found in 100 µM amlodipine group. Minimum early (2.43%) and late apoptosis (0.56%) rate were seen in the 20 µM amlodipine group, however the necrosis rate (0.26%) in 50 µM amlodipine group.

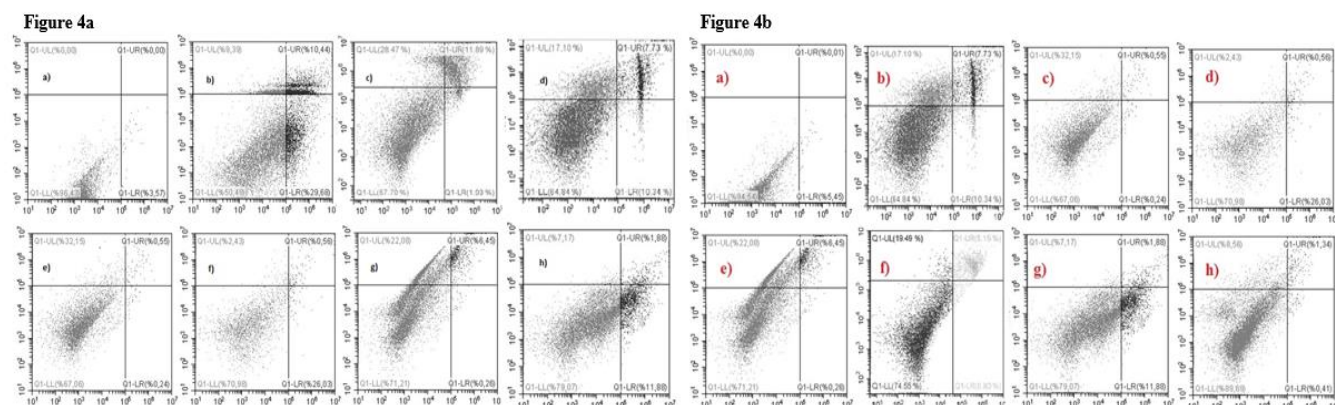


Figure 4a-b. Flow cytometry results for cortical neuron and SH-SY5Y cells, respectively. a) control group; b) glutamate control 10⁻⁵ mM; c) 1 µg lacidipine; d) 2 µg lacidipine; e) 4 µg lacidipine; f) 20 µM amlodipine; g) 50 µM amlodipine; h) 100 µM amlodipine.

According the SH-SY57 neuroblastoma cell culture results (Figure 4b); the cell viability of control group was 94.54% and glutamate control group was 64.84%. 10⁻⁵mM glutamate increased the necrosis, early

and late apoptosis (respectively 10.24%, 17.10% and 7.73%) more than negative group (respectively 5.45%, 0.00% and 0.01%). In lacidipine treatment groups; the highest viability rate and the lowest necrosis rate were

found in the 4 µg lacidipine group (respectively 74.55% and 0.26%). The highest early apoptosis rate (32.15%), and the lowest late apoptosis (0.55%) were seen in 2 µg lacidipine group. Among the amlodipine groups, the highest viability rate and the lowest necrosis and late apoptosis rate were found in the 100µM amlodipine group (respectively 89.69%, 0.41%, and 1.34%). However the highest early apoptosis rate was seen in 20µM amlodipine group (19.49%).

According to our findings, the highest viability rate among the treatment groups was found in the at 100 µM amlodipine in SH-SY5Y cell line. Our findings demonstrate a correlation with the MTT and LDH assay results.

DISCUSSION

The main finding of this study was to evaluate the protective roles of L-type (lacidipine) and/or dual L/N-type (amlodipine) calcium channel blockers in glutamate-induced excitotoxicity and to determine which of the cortical neuron and SH-SY57 cells reflects glutamate injury. MTT, LDH, TAC-TOS analysis and flow cytometry were performed sequentially. Herein, firstly we found that SH-SY5Y cells were more sensitive to oxidative stress damage and cell viability reduction caused by glutamate than cortical neuron cell culture. Secondly, amlodipine, a dual inhibitor L/N VGCCs blocker, had more protective effects against glutamate toxicity than lacidipine, which is only L-type VGCCs blocker and this effects were dose dependent manner.

The molecular pathways of excitotoxicity following glutamate receptor activation are still unclear. Increased intracellular concentrations of Ca^{2+} are classically thought to be a supreme event in inducing cell death (3, 5). Even though Ca^{2+} can pass into via NMDA glutamate receptors, glutamate can alternatively depolarize neurons, giving a start to the opening of VGCC (Chávez-Castillo et al., 2017; Higley & Sabatini, 2012). This hypothesis is supported by the neuroprotective effect of Ca^{2+} channel blockers against glutamate induced excitotoxic injury. Although it is well established that N-type VGCCs participate in glutamate release, recently. It demonstrated that increased expression of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels at presynaptic terminals irregularly induced glutamate release (Giansante et al., 2020). Therefore, we used cortical neuron cells and SH-SY5Y cell lines, which are two dissimilar cell lines expressing L and N-type calcium channels in our study. Applying glutamate decreased cell viability more in SH-SY57 cells than in neuron cells (58.9 % vs. 63%). Also, such results from the MTT analysis have been supported by the evaluation of LDH findings. Although in two cultures treated glutamate,

the activity of LDH was remarkably higher in SH-SY5Y cells when compared to cortical neuron cells. Additionally, our TAC-TOS and flow cytometric results were also in parallel with MTT and LDH assay. As a result of our literature search, we could not find any study showing which one better reflects glutamate damage in neuronal cells and SH-SY5Y cell lines. Therefore, we did not compare to our results with other studies. However, it is known that alteration of intracellular Ca^{2+} concentrations induces numerous intracellular situations, inclusive of oxidative stress, necrosis, and apoptosis. Ca^{2+} influx via L- and N- type channels is an crucial event during the initial phases of cell death (Dong et al., 2009). Therefore, we think that Ca^{2+} loading is variable in neurons and SH-SY5Y cells due to depolarization caused by toxicity. SH-SY5Y cells appear to be more susceptible to Ca^{2+} overload and subsequent oxidative stress and apoptotic cell death due to L and N-type Ca^{2+} channels.

Numerous studies highlight the important role of VGCC blockers to treat glutamate excitotoxicity (Godoy et al., 2021; Higley & Sabatini, 2012; Kim et al., 2016; Zysk et al., 2018). In the light of the results summarized in the literature, N-type blockers are known to have protective effects toxicity of NMDAR-mediated Ca^{2+} entry (Kimura et al., 1999; Vallazza-Deschamps et al., 2005). However, there are inconsistent results regarding the role of L-type calcium channel blockers in glutamate excitotoxicity. Some findings reported that L-type calcium channels are not liable for glutamate excitotoxicity so antagonists of this channel have no protection from glutamate-induced neuronal damage (Stuiver et al., 1996; Kimura et al., 1999). On the other hand, Giansante et al., (2020) demonstrated that L-type VGCC channels abnormally contribute to evoked glutamate release and Vallazza-Deschamps et al., (2005) found that diltiazem, a blocker of L-type Ca^{2+} channels, limit the cell death triggered by glutamate. Sanchez et al., (2016) demonstrated that inhibition of L-type Ca^{2+} channels with nimodipine protect cerebrocortical cells under presence of neurotoxicity. In light of the results just summarized, it is time to reconsider the relationship between L and dual L/N VGCC antagonists and glutamate excitotoxicity. Although there are no finding the effects of lacidipine on glutamate toxicity, it is available data showing lacidipine its role as a neuroprotectant in neurodegenerative diseases by reducing oxidative stress (Khurana & Bansal, 2019; Manev et al., 1997). At the same time, Manev et al., (1997) found that amlodipine ameliorated both mitochondrial injury and cell death in zinc neurotoxicity in rat cerebellar granule cells. It is declared that Zn^{2+} induce neuronal death by enhancing glutamate excitotoxicity (Kim et al., 2020). Specifically, our results show that similar to previous reports lacidipine and amlodipine alleviated glutamate-induced

excitotoxicity in neuron and SH-SY5Y cells in a concentration-dependent. However, the most protective impact was determined 100 μ M amlodipine concentration on SH-SY5Y cells. Compared with glutamate-damaged cultures, we found that the percentage of cell viability was significantly the highest (58.9 % vs. 88.8 %), and LDH release into the culture medium was statistically the lowest in 100 μ M amlodipine-treated SH-SY5Y cells. On the other hand TAC-TOS results, oxidative stress parameters, parallel with the MTT and LDH analysis, respectively. Therefore, amlodipine that decreases oxidative stress parameters may also be neuroprotective. Consistent with our findings, Mahajan et al., (2007) reported that amlodipine improved vascular damage by reducing oxidative stress and improving antioxidant status, thanks to its antioxidant properties.

Oxidative stress often involves induction of apoptotic cell death (Lee et al., 2021). In our study, the used concentration of glutamate lead to the apoptotic pathway of cellular death in mostly the cortical neurons neurons but early apoptosis in SH-SY5Y cells. The highest viability and lowest necrosis rate among all treatment groups were determined in the 100 μ M amlodipine in SH-SY5Y cells group. In 100 μ M amlodipine- applied cultures, the number of viable cells was remarkably higher than in the cultures applied with glutamate alone (89.69% vs. 64.84 %) although the percentage of necrotic cells was remarkably lower (10.24% vs. 0.41%).

CONCLUSION

These results show that SH-SY5Y cells are more effective at reflecting glutamate-induced excitotoxicity, including oxidative stress and apoptotic cell death more than cortical neuron cells. Although lacidipine, an L-type calcium channel blocker, had protective effects in the treatment of glutamate-induced injury, these effects were more effective than 100 μ M amlodipine, an L/N-type calcium channel blocker. However, this hypothetical explanation requires further investigation.

REFERENCES

- Barbosa, D.J., Capela, J.P., de Lourdes Bastos, M. & Carvalho, F. (2015). In vitro models for neurotoxicology research. *Toxicology Research*, 4(4), 801-842.
- Binvignat, O. & Olloquequi, J. (2020). Excitotoxicity as a target against neurodegenerative processes. *Current Pharmaceutical Design*, 26(12), 1251-1262.
- Carvajal, F.J., Mattison, H.A. & Cerpa, W. (2016). Role of NMDA receptor-mediated glutamatergic signaling in chronic and acute neuropathologies. *Neural Plasticity*, 1-21.
- Chávez-Castillo, M., Rojas, M. & Bautista, J. (2017). Excitotoxicity: an organized crime at the cellular level. *Archivos de Medicina*, 8(3), 198-203.
- Choi, N.Y., Choi, H., Park, H.H., Lee, E.H., Yu, H.J., Lee, K.Y. & Koh, S.H. (2014). Neuroprotective effects of amlodipine besylate and benidipine hydrochloride on oxidative stress-injured neural stem cells. *Brain Research*, 1551, 1-12.
- Dong, X.X., Wang, Y. & Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379-387.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103-1111.
- Giansante, G., Marte, A., Romei, A., Prestigio, C., Onofri, F., Benfenati, F. & Valente, P. (2020). Presynaptic L-type Ca²⁺ channels increase glutamate release probability and excitatory strength in the hippocampus during chronic neuroinflammation. *Journal of Neuroscience*, 40 (36), 6825-6841.
- Godfraind, T. (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 286-301.
- Godoy, J.A., Rios, J.A., Picón-Pagès, P., Herrera-Fernández, V., Swaby, B., Crepin, G. & Muñoz, F.J. (2021). Mitostasis, Calcium and Free Radicals in Health, Aging and Neurodegeneration. *Biomolecules*, 11(7), 1012-1022.
- Higley, M.J. & Sabatini, B.L. (2012). Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4), a005686.
- Hu, Y., Li, J., Liu, P., Chen, X., Guo, D.H., Li, Q.S. & Rahman, K. (2012). Protection of SH-SY5Y neuronal cells from glutamate-induced apoptosis by 3, 6'-disinapoyl sucrose, a bioactive compound isolated from Radix Polygala. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 38, 1-5.
- Khurana, K. & Bansal, N. (2019). Lacidipine attenuates reserpine-induced depression-like behavior and oxido-nitrosative stress in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(10), 1265-1275.
- Khurana, K., Kumar, M. & Bansal, N. (2021). Lacidipine Prevents Scopolamine-Induced Memory Impairment by Reducing Brain Oxidative Stress in Mice. *Neurotoxicity Research*, 39, 1-16.
- Kim, T.Y., Niimi, K. & Takahashi, E. (2016). Role of Cav2.1 Channel Signaling in Glutamate-Related Brain Injury. *Brain Disorder Therapy*, 5(226), 2-22.

- Kim, Y.H., Eom, J.W. & Koh, J.Y. (2020).** Mechanism of zinc excitotoxicity: a focus on AMPK. *Frontiers in Neuroscience*, **14**, 958-966.
- Kimura, M., Katayama, K. & Nishizawa, Y. (1999).** Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels in glutamate toxicity in energy-compromised cortical neurons. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **80**(4), 351-358.
- Krasil’Nikova, I., Surin, A., Sorokina, E., Fisenko, A., Boyarkin, D., Balyasin, M. & Pinelis, V. (2019).** Insulin protects cortical neurons against glutamate excitotoxicity. *Frontiers in Neuroscience*, **13**, 1027-1035.
- Kritis, A.A., Stamoula, E.G., Paniskaki, K.A. & Vavilis, T.D. (2015).** Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **9**, 91-103.
- Lee, Y.M., He, W. & Liou, Y.C. (2021).** The redox language in neurodegenerative diseases: oxidative post-translational modifications by hydrogen peroxide. *Cell Death & Disease*, **12**(1), 1-13.
- Mahajan, A.S., Babbar, R., Kansal, N., Agarwal, S.K. & Ray, P.C. (2007).** Antihypertensive and antioxidant action of amlodipine and vitamin C in patients of essential hypertension. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **40**(2), 141-147.
- Manev, H., Kharlamov, E., Uz, T., Mason, R.P. & Cagnoli, C.M. (1997).** Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Experimental Neurology*, **146**(1), 171-178.
- Sanchez, A.B., Medders, K.E., Maung, R., Sánchez-Pavón, P., Ojeda-Juárez, D. & Kaul, M. (2016).** CXCL12-induced neurotoxicity critically depends on NMDA receptor-gated and l-type Ca²⁺ channels upstream of p38 MAPK. *Journal of Neuroinflammation*, **13**(1), 1-12.
- Stuiver, B.T., Douma, B.R.K., Bakker, R., Nyakas, C. & Luiten, P.G.M. (1996).** In vivo protection against NMDA-induced neurodegeneration by MK-801 and nimodipine: combined therapy and temporal course of protection. *Neurodegeneration*, **5**(2), 153-159.
- Sun, Z.W., Zhang, L., Zhu, S.J., Chen, W C. & Mei, B. (2010).** Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neuroscience Bulletin*, **26**(1), 8-16.
- Taghizadehghalehjoughi, A. & Naldan, M.E. (2018).** The study of diazepam, pregabalin and glucose effect on glutamate toxicity: In vitro study. *Medicine*, **7**(4), 797-801.
- Vallazza-Deschamps, G., Fuchs, C., Cia, D., Tessier, L.H., Sahel, J.A., Dreyfus, H. & Picaud, S. (2005).** Diltiazem-induced neuroprotection in glutamate excitotoxicity and ischemic insult of retinal neurons. *Documenta Ophthalmologica*, **110**(1), 25-35.
- Valtcheva, S. & Venance, L. (2019).** Control of long-term plasticity by glutamate transporters. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, **11**, 10-22.
- Wheeler, D.B., Randall, A. & Tsien, R.W. (1996).** Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca²⁺ channels in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, **16**(7), 2226-2237.
- Yang, X.R., Sun, P., Qin, H.P., Si, P.P., Sun, X.F. & Zhang, C. (2012).** Involvement of MAPK pathways in NMDA-induced apoptosis of rat cortical neurons. *Acta physiologica Sinica*, **64**(6), 609-616.
- Zyśk, M., Gapys, B., Ronowska, A., Gul-Hinc, S., Erlandsson, A., Iwanicki, A. & Bielarczyk, H. (2018).** Protective effects of voltage-gated calcium channel antagonists against zinc toxicity in SN56 neuroblastoma cholinergic cells. *PLoS One*, **13**(12), e0209363.



Olası Bir Gemi Kazası Ardından Oluşacak Petrol Kirliliğinin Sektör Kadıköy Kıyısı Alanındaki Toksik Etkisinin Belirlenmesi

Nüket SİVRİ¹ Serdar YILDIZ², V. Zülal SÖNMEZ^{1*} Özkan UĞURLU³

¹ Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye

² Dünya Denizcilik Üniversitesi, SE 201-24, Malmö, İsveç

³ Deniz Ulaştırma İşletme Mühendisliği Bölümü, Ordu Üniversitesi, Ordu, Türkiye

Geliş Tarihi: 13.10.2021

Kabul Tarihi: 18.02.2022

Basım Tarihi: 31.03.2022

Atıf yapmak için: Sivri, N., Yıldız, S., Sönmez V.Z. & Uğurlu, Ö. (2022). Olası Bir Gemi Kazası Ardından Oluşacak Petrol Kirliliğinin Sektör Kadıköy Kıyısı Alanındaki Toksik Etkisinin Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 53-61.

How to cite: Sivri, N., Yıldız, S., Sönmez V.Z. & Uğurlu, Ö. (2022). Determination of the Toxic Effect of That Will Occur Oil Pollution in the Sector Kadıköy Coastal Area After a Possible Ship Accident. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 53-61.

<https://orcid.org/0000-0002-4269-5950>
<https://orcid.org/0000-0002-3340-5819>
<https://orcid.org/0000-0002-7488-2996>
<https://orcid.org/0000-0002-3788-1759>

*Sorumlu yazarın:
V. Zülal SÖNMEZ
Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul
Üniversitesi-Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye
✉: zulal.sonmez@iuc.edu.tr

Öz: Dünyadaki en önemli geçit yollarından birisi olan İstanbul Boğazı, doğu ve batının birleşmesinde jeopolitik önemi yüksek olan özel bir alandır. Karadeniz'e kıyısı olan ülkeler, İstanbul Boğazı sayesinde sürdürülebilir deniz ticaretlerini yapabilmekte ve petrol ürünlerinin önemli bir bölümünü, Türk Boğazları üzerinden dünyaya ihraç edebilmektedirler. İstanbul Boğazı'nda Sektör Kadıköy içerisinde yer alan demirleme yerleri (A, B, C demir sahaları) Türk Boğazları'nda gemi trafiğinin en yoğun ve en karmaşık yapıya sahip olduğu deniz alanlarıdır. Bu nedenle Sektör Kadıköy içerisinde yer alan demirleme yerleri ve yakın çevresi Türk Boğazları'nda gemi kazalarının en sık yaşandığı deniz alanlarıdır. Bu çalışmada, İstanbul Boğazı'nda gemi trafiğinin en yoğun olduğu Sektör Kadıköy içerisinde yer alan tanker demirleme sahasında olası bir ham petrol gemisi kazası sonucunda oluşabilecek petrol kirliliğinin, akut toksik etkisi modellenmiştir. Çalışmada olası petrol kaynaklı kirlenmenin denizel ekosistemde oluşturabileceği etkinin tespiti için, laboratuvar ortamında *Bacterial Bioluminescence Bioassay* testiyle, ham petrolün deniz ortamında akut toksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada kirliliğin modellenmesi için GNOME Simülasyon Modellemesi yazılımı kullanılmıştır. Modellemede meteorolojik ve oşinografik veriler göz önünde bulundurularak, petrol kirliliğinin etkileyeceği deniz ve kıyı alanları tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda, kaza ile oluşacak petrol kirliliği ardından, ekosistem biyoçeşitliliğinin etkilenmesi olası sektöre ait riskli alanlar model sonuçlarından edinilen bilgilerle belirlenmiştir. Sektör Kadıköy olarak seçilen alanda, ham petrolün ulaşabileceği en son noktada bile petrolün toksik etkisinin devam edebileceği görülmüş ve bu noktadan itibaren gereken seyreltme değerleri hesaplanmıştır. Petrol kaynaklı kirlenmenin tespiti için, akut toksisite test ölçüm periyotları olan 5 dk – 15 dk ve 30 dk arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. En hızlı müdahale gerektiren petrol kaynaklı kirlenmelerde, akut toksisite testinin 5 dakikalık maruziyet süresi sonuçlarından yararlanılabileceği belirlenmiştir. Bu çalışma ile hem bu özel alanın korunması ve hem de biyoçeşitliliğin etkilenmemesi için petrol kirliliği özelinde çalışmalar, senaryolar ve kıyısı alan koruma planları ile bütünlük izlemelerin yapılmasının önemi vurgulanabilir.

Anahtar kelimeler: Petrol kirliliği, akut toksisite, sektör Kadıköy, İstanbul, deniz kazası.

Determination of the Toxic Effect of That Will Occur Oil Pollution in the Sector Kadıköy Coastal Area After a Possible Ship Accident

Abstract: The Bosphorus, one of the most important passageways in the world, is a special area with high geopolitical importance at the junction of east and west. Countries with a coast to the Black Sea can carry out sustainable maritime trade thanks to the Bosphorus and export a significant part of their petroleum products to the world through the Turkish Straits. Anchorage areas (A, B, C anchor areas) located in Sector Kadıköy in the Bosphorus are the sea areas where the heaviest and most complex structure of ship traffic occur in the Turkish Straits. For this reason, the anchorage areas within Sector Kadıköy and its immediate surroundings are the sea areas where ship accidents occur most frequently in the Turkish Straits. This study models the acute toxic effect of oil pollution that might result from a possible crude oil ship accident at the tanker anchorage area located in Sector Kadıköy, where ship traffic is the most intense in the Bosphorus. In the study, the acute toxicity of crude oil in the marine environment was investigated with the *Bacterial Bioluminescence Bioassay* test in a laboratory environment to determine the effect of possible oil-related pollution on the marine ecosystem. GNOME Simulation Modeling software was used to model pollution in the study. In the modelling, the meteorological and oceanographic data were considered and the sea and coastal areas affected by oil pollution were determined.

*Corresponding author's:
V. Zülal SÖNMEZ
Environmental Engineering Department,
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, İstanbul,
Turkey.
✉: zual.sonmez@iuc.edu.tr

With the information obtained from the modelling results, this study determined the risky areas of the sector that may affect the ecosystem biodiversity after the accidental oil pollution. In the area chosen as Sector Kadıköy, it was observed that the toxic effect of oil could continue even at the last point where crude oil could reach, and the required dilution values were calculated from this point onwards. There was no statistically significant difference between the acute toxicity test measurement periods of 5 minutes, 15 minutes and 30 minutes to detect oil-based pollution. It was determined that the 5-minute exposure time results of the acute toxicity test could be used in petroleum-based contaminations that require the fastest response. With this study, the importance of conducting integrated monitoring with oil pollution specific studies, scenarios, and coastal protection plans is emphasised to protect this special area and not affect biodiversity.

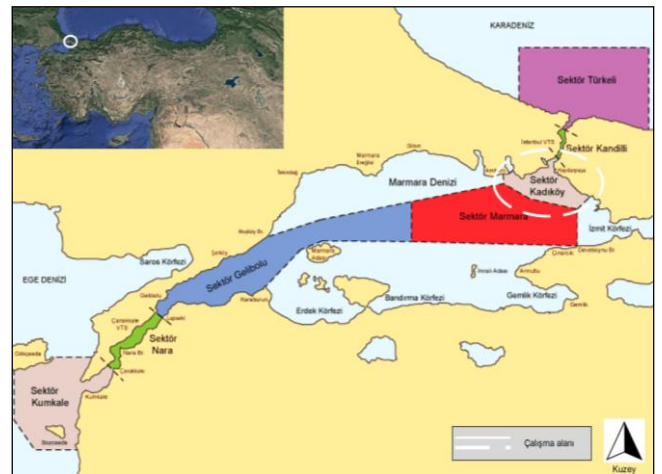
Keywords: Oil pollution, acute toxicity, sector Kadıköy, İstanbul, marine accident.

GİRİŞ

Teknolojinin yenilikçi uygulamaları ile ülkelerin hammaddeye olan ihtiyacı, taşımacılık sektörünün en önemli ayağı olan gemi hareketlerini ön plana çıkarmıştır. Bu durum, son 10 yılda, gemilerin hem daha hızlı ve modern hale gelmesine hem de taşıma kapasitelerinin artmasına neden olmuştur (Kaptan vd., 2020; Yıldız vd. 2021). Artan ham madde ve petrol ihtiyacı, deniz yolu ile taşınan yükü dolaylı olarak da olası kaza riskini ve denize dökülebilecek petrol kirliliğinin miktarını artırmıştır. Gemilerin zorunlu geçiş güzergâhındaki boğaz ve kanallar ise, bu kazaların çok sık yaşandığı deniz alanlarıdır (Uğurlu vd., 2016). Bu durum boğazlara yönelik askeri, siyasi ve ticari kaygılara ek, çevre kirliliği baskısı açısından dikkat edilmesi gereken özel alanlar konusunu gündeme getirmiştir. Çünkü telafisi maddi olarak karşılanamayan, ekosistem hasarlarının uzun yıllar devam ettiği ekolojik felaketsel kazalar, o ülke sınırları için değil, dünya ekosistemleri adına da kötü sonuçlar doğurmaktadır (Doğan ve Burak, 2007; Başar, 2010; Basar vd., 2018). Bu tip olumsuz sonuçlara neden olan ekolojik hasarlı kazalar sonrasında en önemli adım, karar vericiler tarafından akut önlemlerin hayata geçirilmesi ve böylece kronik etkilerin kalıcı olmadan ya da kısmi kayıplarla atlatılmasının sağlanmasıdır. Özel ekosistemlere sahip alanlarda ise, var olan hassas alanların etkilenmemesi adına, önceden yapılacak modelleme ve senaryo çalışmaları ile acil müdahale eylem olasılıkları değerlendirilmeli, hatta alanlar için gereken ekipman ve destekleyici üniteler uygun şartlarda konumlandırılmalıdır.

Özel bir ekosisteme sahip olan Marmara Denizi, Türkiye'nin bir iç denizi olma özelliği yanı sıra, yoğun kirlilik baskısını hisseden ve hissettiren özelliği ile son 20 yıldır ülkenin gündemindedir. Antropojenik kirliliğin etkisi ve baskısının yanı sıra, farklı denizlere ulaşmak için, Marmara Denizi'nden geçiş yapan yılda 45 bine yakın geminin baskısı da gün geçtikçe hissedilmektedir (UDHB, 2016; Kaptan vd., 2020; Yıldız vd., 2021). Türk Boğazları Gemi Trafik Hizmet (TBGTH-2021) alanı; İstanbul Gemi Trafik Hizmetleri ve Çanakkale Gemi Trafik Hizmetleri alanları olarak 2 GTH alt bölgesine ayrılmaktadır (Şekil 1). Yerel deniz trafiği kapsamındaki gemiler hariç olmak üzere, her ne maksatla olursa olsun TBGTH alanında

bulunan tehlikeli yük taşıyan tüm gemiler ile tam boyu 20 metre ve daha büyük gemilerin, yani "Aktif Katılımcı" olarak tanımlanan gemilerin, IMO A.851(20) no'lu karara uygun olarak hazırlanmış olan Türk Boğazları Raporlama (TÜBRAP) sistemine uymaları gerekmektedir. Ancak riski yüksek geçiş rotalarına sahip İstanbul Boğazı'nda, 1999 yılından itibaren yaşanan kazalardan sonra, deniz yaşamının %90'ını zarar görmüş ve uzun yıllar kalıcı hasar olarak kronik etkisini sürdürmüştür (Öztürk vb., 2001). Sadece İstanbul Boğazı'nı değil, Marmara Denizi'nin gemilerden kaynaklı kirliliğini önlemek üzere denetim tekneleri, helikopter ve insansız hava aracı (drone) ile sürekli denetleme çalışmalarını yürüten İstanbul Büyükşehir Belediyesi aynı zamanda, deniz denetim teknelerini Tuzla, Yenikapı ve acil müdahale için Unkapanı'nda konuşlandırılmaktadır. Yine de tarihi yarımada, özel lagün ekosistemlerini içine alan Sektör Kadıköy; kıyasal alanlarında yerleşimlerin yoğun olduğu özel bölgelerinde kazalar ile karşılaşmış, olumsuz etkiler yaşamış ve sadece denizel ekosistemde değil uzun süreli maruziyet nedeniyle insan sağlığını da olumsuz etkilemiş bir denizel alanıdır (Yıldız vd, 2021). Bu alanda yaşanacak olası petrol kazasının, o günkü meteorolojik ve oşinografik veriler göz önünde bulundurularak, petrol kirliliğinin etkileyeceği deniz ve kıyı alanları tespit edilmesi senaryosu bu çalışmanın ana konusunu oluşturmaktadır.



Şekil 1. Türk Boğazları Gemi Trafik Hizmetleri Alanı (Kıyı Emniyeti, 2021)
Figure 1. Turkish Straits Vessel Traffic Service Area (Coastal Safety, 2021)

Bibliyometrik analiz, akademik yayınların çeşitli unsurlarının sayısal analizler ve istatistikler yardımıyla incelenmesi ile ilgilenen bir araştırma yöntemidir (Ellegaard ve Wallin, 2015; Sahin vd., 2020). Değerlendirme yöntemi olarak kullanıldığında, teknolojinin etkisi veya bir yazarın, organizasyonun araştırmanın etkinliğini belirlemeye yardımcı olmaktadır (Van Raan, 2014; Akduman vd., 2020). Bu çalışmaya konu olan İstanbul Boğazı (=Strait) detayı dikkate alınarak, [oil AND spill AND toxicity AND strait] anahtar kelimeleri ile ilgili çalışmaların ise oldukça sınırlı kaldığı görülmüştür. Bu konuda yapılan sadece 10 adet makale tespit edilmiş, bu makalelerin 6 tanesinde, petrol ve türevlerinin sızıntı ve/veya dökülmelerinden kaynaklanabilecek olası toksisitenin farklı organizmalar (*Paracentrotus lividu*, *Hydra viridissima*, *Macquaria novemaculeata*, *Melanotaenia fluviatilis*, *Octopus pallidus*, *Paphia undulata*) üzerine etkileri araştırılmıştır. (Uysal vd., 1997; Mitchell ve Holdway, 2000; Cohen ve Nugegoda, 2000; Pollino ve Holdway, 2002; Long ve Holdway, 2002; Keshavarzifard vd., 2017). Yapılan bibliyometrik analizde sadece iki çalışmada, simülasyon ve modellemeden yararlanıldığı belirlenmiştir (Gin vd., 2001; Wu vd., 2016). Bunlardan biri, “*modelling study of influences of wave-induced stokes drift on trajectories of oil spills in storm conditions in Hecate Strait*” çalışmasıdır ve özellikle fırtına koşullarında inceleme yapılmıştır (Wu vd., 2016). Gin vd. (2001) tarafından yapılan diğer çalışmada ise, çok aşamalı bir petrol sızıntısı modeli ile bir besin zinciri modelinden oluşan bir petrol sızıntısı etkileşim modeli, petrol sızıntı ve dökülmelerden kaynaklı denizel organizmalar üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek için geliştirilmiştir. Geniş kapsamlı içeriğe sahip, bilimsel yayınları kolaylıkla tarayabilen bu arama motorunda; yapılan bu çalışmaya konu olan İstanbul’un tarihi, ekolojik ve ekonomik öneme sahip kıyısız alanındaki, olası petrol içerikli toksik etkilerin karşılaştırılacağı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Petrol; denizel ekosistemlerin ekolojik işlevlerini sürdürülebilir kılmasını sınırlandıran yapıya sahip bir kimyasaldır. Bu kimyasala ait etkinin ortaya çıkmasında; kimyasal madde ve aralarındaki etkileşim, kimyasal maddeye maruz kalan organizma ve maruziyet ile ilgili özellikler rol oynamaktadır. Bu amaçla yapılan akut toksisite testleri; kimyasal maddenin biyolojik sistemlerde meydana getirdiği zararlı etkileri saptamayı, toksik etkinin niteliğini ve niceliğini tanımlamayı, doz-cevap ilişkisini ve toksisitenin meydana geldiği koşulları belirlemeyi sağlar (Sönmez, Sivri ve Dokmeci, 2016). Ancak, genellikle çevresel değerlendirme için büyüme, çoğalma, larval veya embriyonik gelişim bozukluğu ve davranışsal sapmalar gibi altta kalma etkileri tespit etmek ve ekolojik sonuçlar açısından analiz etmek daha zordur. Bu nedenle, ortamdaki

ksenobiyotik bileşiklere hızlı veya neredeyse anlık bir yanıt verecek teste ihtiyaç duyulmaktadır (Sönmez ve Sivri, 2016). Günümüz şartlarında ise, akut toksisite testleri arasında yer alan en hızlı test biyoluminesans bakterisi ile yapılan akut toksisite testi olarak kabul görmüştür (Sönmez ve Sivri 2020a; Sönmez ve Sivri 2020b).

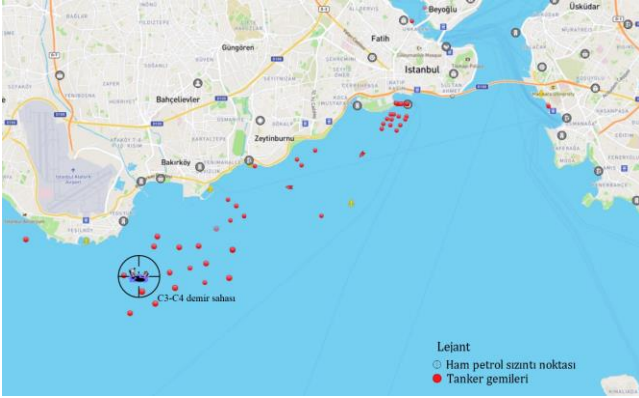
Bu çalışmada, Sektör Kadıköy olarak seçilen alanda, olası gemi kazası ile oluşacak petrol kirliliği ardından, kıyısız ekosisteme etkilerinin GNOME simülasyon modeli sonuçlarından edinilen bilgilerle belirlenmesi hedeflenmiştir. Ham petrolün ulaşabileceği alanlarda toksik etkinin varlığı araştırılmış ve gereken seyreltme değerleri hesaplanmıştır. Petrol kaynaklı kirlenmenin tespiti ve acil müdahalesi için, akut toksisite testinin en kısa maruziyet süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar görselleştirilmiş ve alana ait alınması gereken tedbirler model sonuçları ile yorumlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

İstanbul Boğazı’nda demir yerlerinin, boğaza giriş yapan ve boğazdan çıkış yapan gemilerin en yoğun olduğu alan Sektör Kadıköy’dür. Bu nedenle bu sektörün İstanbul Boğazı’ndaki en riskli sektörlerden biri olduğu literatürdeki birçok çalışmada (Aydogdu vd., 2012; Aydogdu, 2014; Uğurlu vd., 2016) vurgulanmıştır. Bu çalışmada, Sektör Kadıköy içerisinde meydana gelebilecek olası bir tanker kazasının, petrol türevli toksik kirlitici unsurlar nedeniyle kıyısız alanda oluşturacağı yıkıcı etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Sektör içerisinde tanker tipi gemilerin yanı sıra; konteyner, kuru yük, dökme yük ve RoRo tipi gemilerin yoğunluğu, bu bölgede seyir yapacak ya da demirleyecek büyük tonajlı tankerler için risk oluşturmaktadır. Özellikle hava şartlarının olumsuz olduğu kış aylarında, kıyıya ve seperasyon hattına yakın demir bölgelerinde kaza riski de artmaktadır. Bu çalışmada büyük tonajlı petrol tankerlerinin demirlediği C3-C4 bölgelerinde, olası petrol tanker kazası sonrası oluşabilecek ham petrol kirliliğinin kıyısız alanda yayılımı modellenmiştir.

Çalışmanın iş akışı 3 başlıkta tamamlanmıştır. İlk aşamada; İstanbul Boğazı’ndan geçen, ham petrol taşımacılığında kullanılan gemilerden kaynaklanabilecek olası kazalar için, en riskli olabilecek bölge belirlenmiştir. İkinci aşamada, ham petrol sızıntısı senaryosu oluşturulurken, öncelikle yüksek riskli kaza noktası olarak Şekil 2’de verilen 40° 56,9’K-028° 50,5’D koordinatlı nokta tercih edilmiştir. Bu noktadan petrol dağılımı simüle edilmiştir. Üçüncü aşamada, ham petrolün akut toksisite etkisi için, laboratuvar ortamında *Bacterial Bioluminescence Bioassay* testiyle, ham petrolden kaynaklı kirlenmenin denizel ekosistemde sebep olabileceği toksik etkinin seviyesi ve en zararsız oranı

seyreltme belirlenmiştir. Çalışmanın adımları başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.



Şekil 2. Tanker gemileri için İstanbul Boğazı canlı deniz trafiği haritası.

Figure 2. Istanbul Strait live maritime traffic map for tanker ships.

(<https://www.marinetraffic.com/en/ais/home/centerx:28.940/centerx:40.966/zoom:12>)

Döküntü alanının belirlenmesi: Çalışmada döküntü olası bir kaza senaryosu temel alınarak modellenmiştir. Bunun için öncelikle İstanbul Boğazı'nda döküntü riskinin ve miktarının en yüksek olabileceği deniz alanı belirlenmiştir. Bu alanın belirlenmesinde İstanbul Boğazı'ndaki deniz trafiğinin yoğunluğu (Şekil 2), demir yerleri, demirleyen gemi tipleri ve gemi büyüklükleri göz önünde bulundurulmuştur.

Sektör Kadıköy içerisinde yer alan demir yerleri İstanbul Boğazı'nın en karmaşık ve en yoğun trafik akışına sahip deniz alanlarıdır. Bu alanlar içerisinde demire ilerleyen, demirden kalkan, boğaz girişi yapan, boğaz çıkışı sonrası teması olan gemilerin yanı sıra bölgedeki demir yerlerinin yetersizliğinden dolayı oluşan yoğun gemi trafiği kaza riskini arttırmaktadır. Gemi tipi tanker olunca, özellikle ham petrol tankerleri için kazanın yıkıcı etkisi ve kalıcı hasarları daha da önemli görülmektedir. Bu nedenle çalışmada döküntü modellemesi için büyük petrol tankerlerinin demirleme için tercih ettikleri C3-C4 demir sahası arasındaki alan seçilmiştir.

Petrol Dağılımı Simülasyonu Modellemesi: Bu aşamada, bir önceki adımda belirlenen olası döküntü alanında meydana gelebilecek ham petrol tanker kazası sonrası ortaya çıkacak sızıntının dağılımı modellenmiştir. Dağılımın modellemesi için, General NOAA Operational Modeling Environment (GNOME) yazılımı kullanılmıştır (GNOME, 2017). GNOME kirlilik haritası oluşturmak ve acil durum müdahale alanlarını tespit etmek için sıklıkla kullanılan bir yazılımdır (Basar vd., 2018; Dong vd., 2019). Bölgedeki coğrafi verileri elde etmek için küresel bir harita oluşturucu (Coğrafi Bilgi Sistemleri) kullanılırken, oşinografik verileri ve kıyı şeridi verilerini elde etmek için sırasıyla Hibrit Koordinat Okyanus Modeli (HYCOM) veri tabanları ve NOAA küresel kıyı şeridi veri

tabanı kullanılmıştır (GOODS, 2021; SWAN, 2021). Bu veri tabanlarındaki bilgiler NOAA tarafından yönetilmektedir. Uluslararası kuruluşlar tarafından sağlanan, kaydı tutulan ve hava tahminlemesinde kullanılan resmi verileri, istenilen coğrafi bölge için belli zaman aralığında indirmeye ve GNOME modelinde kullanmaya olanak sağlamaktadır. Bu araştırma için gerekli olan coğrafi ve oşinografik haritalar, bu veri tabanlarından Sektör Kadıköy demir sahasını kapsayan bölge için ayrı katmanlar (kıyı çizgisi harita katmanı, yüzey ve derin akıntı katmanı ve rüzgâr katmanı) olarak elde edilmiştir. Akıntı ve rüzgâr verileri değişken ve senaryo süresince dinamiktir. Haritalar daha sonra GNOME teşhis aracı kullanılarak birleştirilmiştir ve simülasyon alt yapısı tamamlanmıştır. Simülasyon modellemesinde mevsimsel akıntılar ve hâkim rüzgâr yönü bu yolla gerçeğe yakın olacak şekilde uygulanmıştır (GOODS, 2021; SWAN, 2021). Kaza sonrası oluşabilecek sızıntı GNOME programında 5000 (üst limit) metrik ton (mt) ham petrol ile sınırlı tutulmuştur. Döküntü İstanbul Boğazı'nda hava ve deniz koşullarının en çetin olduğu aylardan, Şubat ayında modellenmiştir. Modelleme 72 saatlik zaman zarfındaki petrolün yayılımını göstermektedir. Nokta kütle dengesi: Şekillerde nokta/kütle oranı 1/3'tür (simülasyonda 3000 metrik ton döküntü, 1000 adet nokta ile temsil edilmiş ve gösterilmiştir). Minimum pişmanlık senaryosu için (kırmızı noktalar); rüzgâr ve akıntı koşullarında %1 belirsizlik olması durumu simüle edilmiştir.

Akut Toksikite Deneyi: Deniz kazalarının yoğun olarak yaşandığı bölgelerde, taşınan petrolün kaza sonrasında deniz ekosistemindeki akut ve/veya kronik toksik etkilerinin belirlenmesi için farklı testlerin uygulanması mümkündür. Ancak bu testlerden alınacak sonuçlara bağlı müdahalelerdeki gecikmeler, ekosistemlerde kalıcı hasarlara neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda sıklıkla vurgulanan akut toksisite testinin en kısa maruziyet süresinin belirlenmesi esasına uygun olarak bu çalışmada "*Bacterial Bioluminescence Bioassay (Vibrio fischeri- Microtox®)*" testinin kullanılması tercih edilmiştir. Seçilen metot; IMO tarafından yapılan, 27. Bilimsel Grup toplantısında önemli vurgularla tanımlanan, 29. Bilimsel Grup toplantısında, "Atık Değerlendirme Rehberi: Biyolojik Değerlendirme Tekniklerinin Uygulanması" başlığında Microtox testi ile gündeme gelmiştir (IMO, 2006; IMO, 2008). Ancak bu tip çalışmalarda dikkat edilmesi gereken temel nokta, petrol ve türevlerinin düşük çözünürlüklerinden dolayı biyodenyelerde tek başına test edilememesidir. Bu nedenle, solvent (DMSO) yardımıyla, petrol ve türevleri sıvı faza transfer edilmelidir. Fakat normal şartlar altında doğada bu kadar kuvvetli herhangi bir ekstra çözücü bulunmadığından, bu çalışma için alınan ham petrol

numunesi solvent kullanılmadan çalışılmıştır. Böylece ham petrolün yüzeysel sulardaki toksik etkisinin belirlenmesinde, doğal şartların oluşturulmasına özen gösterilmiştir.

Bu testte, test organizması olarak, rehidrasyon yöntemi kullanılarak dondurularak kurutulmuş 10^8 bakteri/vial kültürü içeren *Vibrio fischeri* kullanılmıştır. Microtox Akut Toksikite prosedürüne göre (Microtox Manual, 1992), numunelerin %2'lik NaCl içermesi koşuluyla, 10 µl bakteri kültürü 500 µl numuneye maruz bırakılmıştır. Şahit olarak %2'lik NaCl kullanılmıştır. Test 3 seri halde yürütülmüştür. Bakteri numuneye maruz kaldıktan sonra, test usulüne uygun ölçüm aralıkları olan 5, 15 ve 30 dakikada ışık ölçümü yapılmıştır. Microtox Omni yazılımı sayesinde kaydedilen değerler, yine bu yazılım sayesinde EC_{50} değeri olarak verilmiştir.

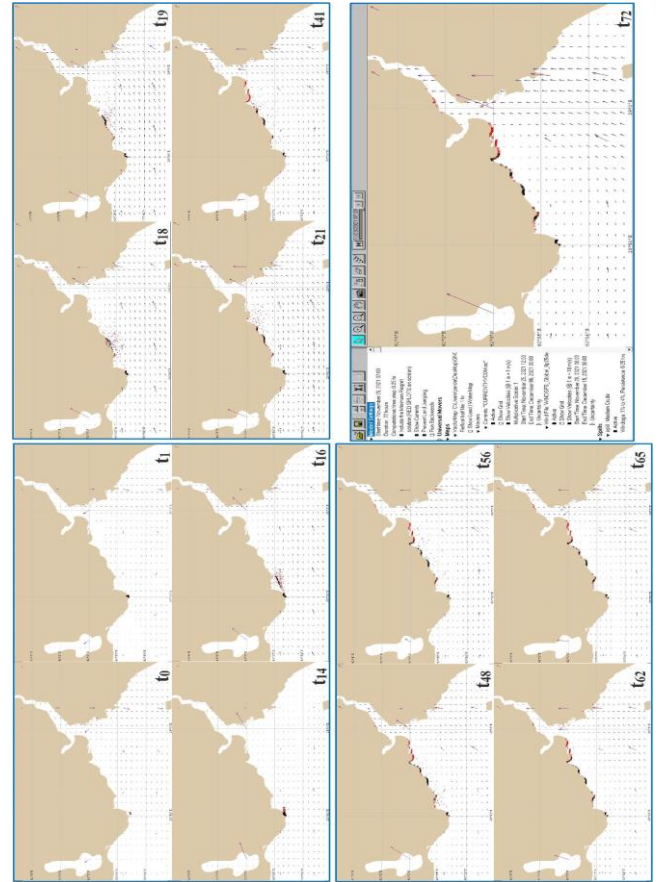
BULGULAR

Bu çalışma için seçilen alan Sektör Kadıköy'de, olası bir kaza ardından oluşacak petrol sızıntısında hem İstanbul Boğazi'nde petrol kirliliğinin dağılım haritası oluşturulmuş hem de kirlilikten etkilenebilecek kıyı alanları belirlenmiştir. GNOME yazılımı kullanılarak yapılan ham petrol sızıntısının yayılımı, t_0-t_{72} aralığındaki dağılımlar işaretlenerek Şekil 3'de sunulmuştur. Sızıntı ilk 30 saat boyunca akıntı ve rüzgârın etkisiyle ilk döküntü noktası olan Bakırköy açıklarından doğuya doğru, Ahırkapı açıklarına kadar deniz yüzeyinde yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Döküntü kıyıya 32 saat sonunda Ahırkapı bölgesinden ulaşmıştır. Otuz dördüncü saatin sonunda Sultan Ahmet sahilinde 2 km'lik şerit kirlilikten etkilenmiştir. Kırkıncı saatten itibaren akıntı ve rüzgârın yön değiştirmesiyle ham petrol önce güney, daha sonra güney batı yönünde yayılım göstermiştir. Müdahale edilmediği takdirde 72 saatin sonunda ham petrol Yedikule kıyıları boyunca tekrar karaya ulaşmıştır. Üç km'lik sahil şeridi kirlilikten etkilenmiştir. Senaryo sonunda toplamda 2215 mt ham petrol 5 km'lik sahil şeridine (Ahırkapı, Yedikule) ulaşmış ve 591 mt ham petrol yüzer halde deniz yüzeyinde kalmıştır (Şekil 3). Önceki çalışmalar (Basar vd., 2006; Basar ve Kose, 2005; Basar, 2008; Basar, 2010) boğazın güney girişinde yaşanan herhangi bir kaza durumunda yapılan simülasyon sonucu döküntünün akıntı etkisiyle güneye doğru yöneldiğini göstermektedir. Çalışmamızda ise kirlilik kuzey doğuya doğru yönelerek tüm kıyı şeridi boyunca yayılmıştır. Bunun muhtemel sebebinin Şekil.3'de de görüldüğü gibi şubat ayında bölgede etkili olan kuvvetli güney-güney batılı rüzgârlar olduğu düşünülmektedir.

Model sonuçları ardından sızıntı boyutu, akut toksik etkinin her seviyesinin görülebileceği düzeyde ele alınmıştır. Çünkü petrolün denize girmesinden sonra

kimyasal ve biyokimyasal dönüşüm ürünlerinin analizleri (örn. metabolitler ve foto-kimyasal oksidasyon ürünleri) oldukça zahmetli ve maliyetli iken, canlılar üzerindeki tahribatının belirlenmesine yönelik toksisite testleri hızlı ve kesin sonuca ulaştıracak analizlerdir. Bu aşamada hem etkilenen sahil kesimi ve hem de deniz yüzeyinde yüzer halde kalan ham petrol ile ilgili akut toksisite etkilerini belirlemeye yönelik analiz sonuçları verilmiştir. Simülasyon sonuçları dikkate alınarak hem saf haldeki ham petrolün, hem de deniz suyu numunesine farklı konsantrasyonlarda eklenen ham petrolün akut toksisite testleri yorumlanmıştır.

Bu amaçla, ham petrolün toksik seviyesinin belirlenmesine yönelik çalışma aralığı belirlenmiş ve akut toksisite testi metodolojisi gereği sınırlı konsantrasyon aralıklarında çalışılması tercih edilmiştir. Eisman vd., (1991), Aruldoss ve Viraraghavan (1998) ve Saeed ve Beg (2007) tarafından ham petrolle ilgili yapılan çalışmalarda, biyoluminesans bakteri ile (*Vibrio fischeri*) akut toksisite testinde analizör olarak Microtox® tercih edilmiş ve petrolün aşırı toksik olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların sınıflandırmasında EC_{50} değerlerinin %20 aralıklarla tanımlaması yapılmıştır (Ahmed, 2015).

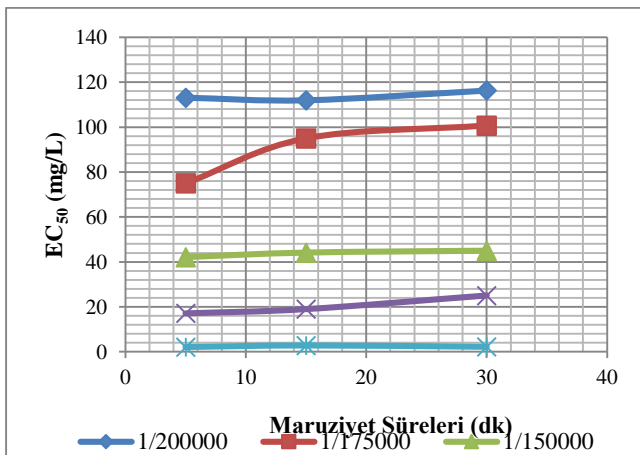


Şekil 3. Sektör Kadıköy kıyısız alanında GNOME simülasyon modeli ile petrol yayılımı.

Figure 3. Oil spill with GNOME simulation model in the coastal area of Sector Kadıköy

Buna göre, EC_{50} (% veya mg/L olarak) değerleri; <20 son derecede toksik; 20–40 şiddetli toksik; 40-60 orta seviyede toksik; 60–80 az toksik; 80-99 pratik olarak toksik değil; >100 non-toksik veya rölatif olarak zararsız olarak toksisite derecelerine sahiptir (Hodge ve Sterner, 2005; Yıldız vd., 2021). Bu çalışmadaki konsantrasyon ve EC_{50} değerleri incelendiğinde; toksisite değerlerinin son derece toksik (EC_{50} =17,11 mg/L) ve şiddetli toksik (EC_{50} =22,21 mg/L) sınıflandırmasına uygun olduğu bulunmuştur. Yıldız vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada da, çalışılan ham petrol şiddetli toksik (24,41 mg/L) bulunmuştur.

Çalışmanın bir sonraki evresinde, kıyısız alan sularından alınan örneklerin, toksisitesi tespit edilen ham petrole ait farklı konsantrasyonlarının uyumlamalı denemeleri yürütülmüştür. Özellikle simülasyon sonuçlarındaki alanlara ait deniz yüzey suyu örnekleri ile çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4'te sunulmuştur. Bu şekilde, ham petrol örneğine ait farklı seyreltmeler (1/125.000-1/200.000) ve tüm maruziyet süreleri için (sırasıyla 5, 15, 30 dk.) değerler hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 1/125.000 sonuçlarının toksik özellik taşıdığı belirlenmiştir. Aynı yöntem ile ancak 200.000 kat seyreltmede, tüm maruziyet süreleri 5, 15 ve 30 dk.lar için non-toksik özellik göstermiştir. Bu sonuçla, ham petrolün ulaşabileceği en son noktada bile petrolün toksik etkisinin olabileceği, bu noktadan itibaren ancak 200.000 kat seyreltmeye maruz kalırsa toksik özelliğini kaybedebileceği bulunmuştur. Yıldız vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, çalışılan ham petrolün toksisite seviyeleri birbirine yakın olup, toksisite sınıfları aynıdır. Bu nedenle, Yıldız vd. (2021) tarafından ham petrol denize döküldüğünde, deniz suyuyla sadece 1:200.000 seyreltme petrol kirliliği toksik olmayan hale getirecektir bulgusu ile çalışmanın sonucu örtüşmektedir.



Şekil 4. Maruziyet sürelerine göre EC_{50} (mg/L) değerleri.

Figure 4. EC_{50} (mg/L) values according to exposure times.

* Tüm sonuçlar pozitif kontrol olarak formaldehit ile karşılaştırılmıştır (Sönmez ve Sivri, 2016).

* All results were compared with formaldehyde as a positive control (Sönmez and Sivri, 2016).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Petrolün biyolojik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, deneysel çalışma tasarımındaki gelişmelerden, bilgisayar teknolojisi ile sağlanan modelleme uygulamasından ve özel deneysel ekipmanların geliştirilmesinden büyük ölçüde yararlanmıştır. Bu teknolojik adımlar sayesinde, modellemelerle eş zamanlı petrol konsantrasyonu ve toksisite analizleri kullanılarak, ölümcül sonuçlardan ve kalıcı tahribatlardan başarılı müdahalelere geçiş olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ile İstanbul Boğazı'nda değişken akıntı ve rüzgar rejiminin petrol türevli deniz kirliliğinin sahilde ulaşacağı alanları önemli ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir. Edinilen sonuçlara göre, Yeşilköy kıyı şeridinden yaklaşık 1300 metre uzaklıkta meydana gelen petrol içerikli döküntünün yıkıcı etkilerinden, Yeşilköy sahilinin çok az miktarda etkilenmesi ilginç bir çalışma çıktısı olarak görülmektedir. Yeşilköy'de meydana gelen döküntünün Ahırkapı ve Yedikule kıyılarında yoğunlaşması İstanbul Boğazı'ndaki akıntı ve rüzgar rejiminin önemini açıkça ortaya koymaktadır. Bu nedenle literatürdeki çalışmalarda (Başar, 2010; Aydoğdu vd., 2012; Uğurlu vd., 2015a; Uğurlu vd., 2015b; Yıldız vd., 2021) belirtildiği üzere, İstanbul Boğazı'ndaki deniz kazaları açısından riskli bölgelerde, acil müdahale istasyonları kurulması yararlı olacaktır. Bunun yanı sıra gelişen teknolojiyle riskli bölgelerin takibi uzaktan izleme sistemleri (İnsansız Hava Araçları) ile desteklenmeli ve böylece olası acil durumlarda erken uyarı sistemi olarak bu sistemler kullanılabilir. Çünkü kaza sonrası bölge dinamiklerinden dolayı kirlilikten etkilenebilecek alanları tahminleyebilmek gerçekten çok zordur.

Kıyısız alanlar, haliçler ve iç sular; gemi kaynaklı atıklardan yoğun etkilenen en hassas ekosistemleri barındıran kısımlardır. Hatta "sıcak nokta" olarak tanımlanan alanlar, barındırdıkları türler ile korunması gereken özel noktalar. Bu alanlarda yer alan türler, farklı trofik seviyelerdeki canlılara besin kaynağı oluşturan zengin biyoçeşitliliğe sahiptir. Ancak Marmara Denizi kıyısız alanındaki bu özel noktalar henüz izleme programlarına dahil edilememiştir. Belirli dönemlerde bazı fizikokimyasal ve biyolojik parametrelerle takip edilen alanlar olsa da Marmara Denizi'nde izlenen biyolojik parametreler arasında akut toksisitenin yer almadığı bilinmektedir. Her ne kadar akut toksisite testi ile kirliliğin türü ve kaynağı hakkında net bilgi edinilirse de alanda var olan türlerin etkilendiği maddenin toksik bir etken kaynaklı olup olmadığı hakkında çok kısa sürede karar verilebilir. Böylece sucul ekosistemdeki ani değişimleri 5-30 dakika arasındaki sürede hızlıca tespit etmek mümkün olabilir. Akut toksisite testleri sayesinde, karar vericilerin acil durum tespiti ve müdahalesi daha hızlı

ve etkin olabilir. Daha öncesinde alana ait simülasyonlar yapılmışsa, müdahale yöntemi ve müdahale edilmesi gereken bölgeler kalıcı hasar görmeden kurtarılabilir. Ancak elde edilen verilere göre, sucül organizmalara olası akut veya kronik etkilerinin belirlenmesi için; sadece ham petrolü tanımlayan fiziksel/kimyasal özelliklerin yetersiz kalacağı, akut toksisite seviyelerinin de dikkate alınması gerektiği söylenebilir. Çünkü yumurta ve larva ile planktonik formların, sedimentte ve kıyısız alanda yaşayan yengeç, istakoz ve karides gibi kabukluların diğer canlılara oranla daha duyarlı oldukları, 1-10 ppm oranında petrol konsantrasyonundan dahi etkilendikleri bilinmektedir (Yönsel, 2004; Demiray, 2006). Birçok canlı türünün etkilendiği petrol kaynaklı kirlenmenin çok hızlı tespit edilebilirliği ve müdahalesinde, akut toksisite testinin 5 dakikalık maruziyet süresinin dahi fikir verebileceği bu çalışmanın en önemli bulgularından biri olarak belirtilebilir.

Bu çalışma sonuçlarında da belirlendiği üzere, denizel alanlarda mikroorganizmalardan makro organizmalara kadar her trofik seviyede gözlenebilecek hasarların önlenmesi adına özellikle petrol türevli kazalarda, hızlı ve etkin önlemlerin alınması için sucül alanların izlenmesi, modellenmesi ve farklı senaryo çalışmalarının yürütülmesi gerekmektedir. Yetkili karar vericiler kaza anında hem bilimsel hem de teknolojik sonuçları dikkate almalı ve stratejik etkileri planlayarak etkin acil müdahale kararı vermelidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, simülasyon modellemesi konusunda destek veren Fırat SİVRİ'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M. (2015).** Acute Toxicity (Lethal Dose 50 Calculation) of Herbal Drug Somina in Rats and Mice. *Pharmacology & Pharmacy*, **6**, 185-189.
- Akduman, S., Demirbağ, M.A. & Sivri, N. (2020).** Bibliometric Profile of Scientific Research on Bacteriological Water Quality Studies in Turkey (1999-2019). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, **5**(3), 425-432.
- Aruldoss, J. & Viraraghavan, T. (1998).** Toxicity Testing of Refinery Wastewater Using Microtox. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**, 456-463.
- Aydogdu, Y.V., Yurtoren, C., Park, J.S. & Park, Y.S. (2012).** A study on local traffic management to improve marine traffic safety in the Istanbul Strait. *The Journal of Navigation*, **65**(1), 99-112.
- Aydogdu, Y.V. (2014).** A comparison of maritime risk perception and accident statistics in the Istanbul Strait. *The Journal of Navigation*, **67**(1), 129-144.
- Basar, E. & Kose, E. (2005).** Due To The Heavy Marine Traffic And Associated Risk The Oil Spill Scenarios At Kandilli Which Is The Narrowest Point In Istanbul Strait. *In International Oil Spill Conference* (Vol. 2005, No. 1, pp. 167-169). American Petroleum Institute.
- Basar, E., Kose, E. & Guneroglu, A. (2006).** Finding risky areas for oil spillage after tanker accidents at Istanbul strait. *International Journal of Environment and Pollution*, **27**(4), 388-400.
- Basar, E. (2008).** Oil spill simulations in the aftermath of tanker accident at the tanker routes in the Marmara Sea. *In International Oil Spill Conference* (Vol. 2008, No. 1, pp. 1215-1217). American Petroleum Institute.
- Başar, E. (2010).** Weathering and oil spill simulations in the aftermath of tanker accidents at the junction points in the Marmara Sea. *Fresenius Environmental Bulletin*, **19**(2), 260-265.
- Basar, E., Sivri, N., Uğurlu, Ö. & Sönmez, V.Z. (2018).** Potential impacts of oil spill damage around the planned oil rigs at the Black Sea. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, **47**(11), 2198-2206.
- Cohen, A.M. & Nugegoda, D. (2000).** Toxicity of three oil spill remediation techniques to the Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**(2), 178-185.
- Demiray, N. (2006).** *Sintine sularından kaynaklanabilecek deniz kirliliğinin değerlendirilmesi*. Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, 79 s.
- Dong, C.D., Thi-Hong-Hanh Nguyen, T.H., Hou, C.C.T. & Tsai, C.C. (2019).** Integrated numerical model for the simulation of the ts taipei oil spill. *Journal of Marine Science and Technology*, **27**(4), 359-368.
- Doğan, E. & Burak, S. (2007).** Ship-originated pollution in the Istanbul strait (Bosphorus) and Marmara Sea. *Journal of Coastal Research*, **23**(2(232)), 388-394.
- Eisman, M.P., Landon-Arnold, S. & Swindoll, C. (1991).** Determination of petroleumhydrocarbon toxicity with Microtox reg sign. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**(6), 811-816.
- Ellegaard, O. & Wallin, J.A. (2015).** The bibliometric analysis of scholarly production: How great is the impact?. *Scientometrics*, **105**(3), 1809-1831.
- Gin, K.Y.H., Huda, M.K., Lim, W.K. & Tklich, P. (2001).** An oil spill-food chain interaction model for coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(7), 590-597.

- GNOME. (2017).** GNOME 1.3.11, NOAA Office of Response Restoration, US. <https://response.restoration.noaa.gov/oil-and-chemical-spills/oil-spills/responsetools/gnome.html>
- GOODS. (2021).** GOODS, NOAA Office of Response Restoration, US, <https://gnome.orr.noaa.gov/goods>.
- Hodge, A. & Sterner, B. (2005).** Toxicity Classes. In: Canadian Center for Occupational Health and Safety. <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html> Erişim tarihi:25.08.2021
- IMO. (2006).** LC/SG 29/2, International Maritime Organization, 29th Meeting, United Kingdom.
- IMO. (2008).** Casualty Investigation Code: Code of the International Standards and Recommended Practices for a Safety Investigation into a Marine Casualty or Marine Incident. International Maritime Organization Publishing.
- Kaptan, M., Sivri, N., Blettler, M.C. & Uğurlu, Ö. (2020).** Potential threat of plastic waste during the navigation of ships through the Turkish straits. *Environmental Monitoring and Assessment*, **192**(8), 1-7.
- Keshavarzifard, M., Zakaria, M.P. & Sharifi, R. (2017).** Ecotoxicological and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in short-neck clam (*Paphia undulata*) and contaminated sediments in Malacca Strait, Malaysia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **73**(3), 474-487.
- Kıyı Emniyeti (2021).** Türk Boğazları Gemi Trafik Hizmetleri (TBGTH) Kullanıcı Rehberi, Erişim tarihi: 10.08.2021, <https://kiyiemniyeti.gov.tr/Data/1/Files/Documents/Documents/kb/OM/TM/OR/TBGTH%20Kullan%C4%B1c%C4%B1%20Rehberi.pdf>
- Long, S. M. & Holdway, D. A. (2002).** Acute toxicity of crude and dispersed oil to *Octopus pallidus* (Hoyle, 1885) hatchlings. *Water Research*, **36**(11), 2769-2776.
- Microtox. (1992).** Microtox® Manual. Microbics Corporation.
- Mitchell, F. M. & Holdway, D. A. (2000).** The acute and chronic toxicity of the dispersants Corexit 9527 and 9500, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (green hydra). *Water Research*, **34**(1), 343-348.
- Öztürk, B., Öztürk, A.A. & Algan, N. (2001).** Ship originated pollution in the Turkish Straits System. *In Proc. Int. Symp. on Regional Seas*, Tudav Publication, İstanbul, 86-94.
- Pollino, C.A. & Holdway, D.A. (2002).** Reproductive potential of crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following short-term exposure to bass strait crude oil and dispersed crude oil. *Environmental Toxicology: An International Journal*, **17**(2), 138-145.
- Saeed, T. & Beg, M. (2007).** Relative toxicity of seawater-soluble fractions of Kuwait crude oil and different petroleum products. *Science International-Lahore*, **19**(4), 277.
- Sahin, S., Akpınar, I. & Sivri, N. (2020).** An alternative material for an effective treatment technique proposal in the light of bibliometric profile of global scientific research on antibiotic resistance and *Escherichia coli*. *Environ Monit Assess.*, **192**, 714.
- Sonmez V.Z, Sivri N. & Dokmeci A.H. (2016).** Determination of The Toxicity of Different Discharge Waters using Acute Toxicity Tests Approved for National Pollutant Discharge Permit in Turkey. *Biosci Biotech Res Asia*, **13**, 2.
- Sönmez, V.Z. & Sivri, N. (2016).** Interlaboratory precision of acute toxicity tests using reference toxicant formaldehyde, *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **1**(3), 96-99.
- Sönmez, V.Z., & Sivri, N. (2020a).** The Toxic Effects of Commonly Used Antibiotics in Turkey on Aquatic Organisms. *J. Anatolian Env. And Anim. Sciences*, **5**(2), 154-160.
- Sönmez, V.Z., & Sivri, N. (2020b).** Change of Acute Toxicity of Dyestuff Wastewaters. *Pol. J. Environ. Stud.*, **29**(1), 1-8.
- SWAN. (2020).** Istanbul Strait Wind and Speed Direction, Turkish State Meteorological Service, Web, <https://www.mgm.gov.tr/deniz/swan.aspx?b=06&t=rz&s=00&g=p#sfB>
- Ulaştırma, Denizcilik ve Haberleşme Bakanlığı (UDHB) (2016).** Gemi trafik kayıtları. <https://www.gemitrafik.com/tag/udhb/> erişim tarihi: 25.08.2021
- Uğurlu, Ö., Köse, E., Yıldırım, U., & Yüksekıldız, E. (2015a).** Marine accident analysis for collision and grounding in oil tanker using FTA method. *Maritime Policy & Management*, **42**(2), 163-185.
- Uğurlu, Ö., Nişancı, R., Köse, E., Yıldırım, U. & Yüksekıldız, E. (2015b).** Investigation of oil tanker accidents by using GIS. *International Journal of Maritime Engineering*, **157**(2), 113-124.
- Uğurlu, Ö., Erol, S. & Başar, E. (2016).** The analysis of life safety and economic loss in marine accidents occurring in the Turkish Straits. *Maritime Policy & Management*, **43**(3), 356-370.

-
- Uysal, Z., Saydam, C. & Yilmaz, K. (1997).** Impact of the recent oil spill (Nassia) in bosphorus (Turkey) on developmental stages of sea urchin *Paracentrotus lividus* Lam. eggs. *Fresenius Environmental Bulletin*, **6**, 584-588.
- Van Raan, T. (2014).** Advances in bibliometric analysis: Research performance assessment and science mapping. *Bibliometrics: Use and Abuse in the Review of Research Performance*, **87**, 17-28.
- Wu, Y., Hannah, C.G., Lau, H., O'Flaherty-Sproul, M. & Wang, X. (2016).** A Modelling Study of Influences of Wave-induced Stokes Drift on Trajectories of Oil Spills in Storm Conditions in Hecate Strait. In *Proceedings of the 39th AMOP Technical Seminar on Environmental Contamination and Response* (pp. 331-347). Environment Canada Ottawa, ON.
- Yildiz, S., Sönmez, V.Z., Uğurlu, Ö., Sivri, N., Loughney, S. & Wang, J. (2021).** Modelling of possible tanker accident oil spills in the Istanbul Strait in order to demonstrate the dispersion and toxic effects of oil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, **193** (158) 1-19.
- Yönsel, F. (2004).** *Deniz Ulaşımı ve Deniz Kirliliği*, Doctoral Dissertation, Faculty of Naval Architecture and Ocean Engineering, İ.T.U., İstanbul, Turkey.



Güney Doğu Karadeniz’de Beam Trol ile Avlanan *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda)’ün Boya Dayalı Büyümesi [*]

Hatice ONAY^{1*} Sabri BİLGİN²

^{1*} Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama Teknolojisi, Rize, Türkiye

² Sinop Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama Teknolojisi, Sinop, Türkiye

Geliş/Received: 02.09.2021

Kabul/Accepted: 01.12.2021

Yayın/Published: 31.03.2022

Atıf yapmak için: Onay, H. & Bilgin, S. (2022). Güney Doğu Karadeniz’de Beam Trol ile Avlanan *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda)’ün Boya Dayalı Büyümesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 62-71.

How to cite: Onay, H. & Bilgin, S. (2022). Length based growth of *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) caught by beam trawl in the south-east Black Sea. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 62-71.

*ID: <https://orcid.org/0000-0003-3463-7360>

ID: <https://orcid.org/0000-0003-2321-547X>

***Corresponding author:**

Hatice ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama Teknolojisi, Rize, Türkiye

✉: hatice.bal@erdogan.edu.tr

Öz: Bu çalışma Aralık 2012- Kasım 2013 ayları arasında Güney Doğu Karadeniz’de kırıli trol (beam trol) ile avlanan *Liocarcinus depurator* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) türünün büyüme özelliklerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. İyidere, Merkez ve Çayeli istasyonlarından 2 m genişliğinde kırıli trol kullanılarak 0-30⁺ derinliklerde örnekleme yapılmıştır. *L. depurator* türünün mevsimsel büyüme modelinde hesaplanan Rn değeri dişi için 0,766, erkek için ise 0,676 olarak, mevsimsel olmayan büyüme modeline göre hesaplanan Rn değeri de dişi için 0,434, erkek için ise 0,597 olarak hesaplanmıştır. Büyümedeki mevsimsel salınım (C) dişiler için 0,703 erkekler için 0,990 olarak hesaplanmıştır. Mevsimsel von Bertalanffy büyüme sabitleri erkek için $K=1,739 \text{ yıl}^{-1}$, $L_{\infty} = 36,4 \text{ mm}$ $WP=0$, $t_0=-0,600$, $\Phi'=3,363$ olarak, dişiler için ise $K=1,692 \text{ yıl}^{-1}$, $L_{\infty}=35,0 \text{ mm}$, $WP=4,73$, $t_0=-0,550$, $\Phi'=3,317 \text{ mm}$ olarak belirlenmiştir. WP değerlerine göre erkek bireyler için büyümenin en yavaş olduğu zaman, kış ortası dişi bireyler için ise ilkbahar sonu olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *L. depurator* türünün Karadeniz’de mevsimsel büyüme özelliği gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Kabuk değiştirme, liman yengeci, LFDA, mevsimsel büyüme.

Length based growth of *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) caught by beam trawl in the south-east Black Sea [*]

Abstract: This study was carried out to determine the seasonal and non-seasonal growth characteristics of *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) species caught by beam trawl in the Southeastern Black Sea between December 2012 and November 2013. The samples were taken depth of 0-30⁺ m by using 2 meters width beam trawl in İyidere, Çayeli and the Merkez Station. The Rn value calculated in the seasonal growth model of *L. depurator* species was calculated as 0.766 for the female and 0.676 for the male, whereas the Rn value, according to the non-seasonal growth model was calculated as 0.434 for the female and 0.597 for the male. The seasonal fluctuation in growth (C) was calculated as 0.703 for females and 0.990 for males. Seasonal von Bertalanffy growth constants were determined as follows: for males, $K=1.739 \text{ year}^{-1}$, $L_{\infty}=36,4 \text{ mm}$ $WP=0$, $t_0=-0,600$, $\Phi'=3.363$, for females, $K=1.692 \text{ year}^{-1}$, $L_{\infty}=35.0 \text{ mm}$ $WP=4.73$, $t_0=-0,550$, $\Phi'=3.317 \text{ mm}$. According to WP values, it was determined that the slowest time for male individuals to grow was mid-winter, whereas it was late spring for female individuals. These results revealed that the *L. depurator* species showed seasonal growth characteristics in the Black Sea.

Keywords: Harbor crab, LFDA, molting, seasonal growth.

[*] Bu çalışma, Hatice ONAY’in yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis prepared by Hatice ONAY.

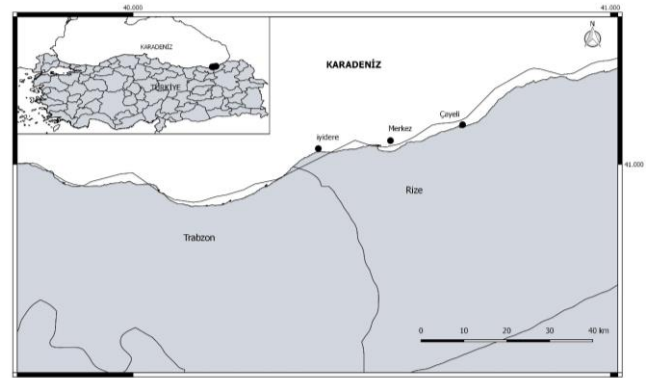
GİRİŞ

Liocarcinus depurator Kuzey Denizi'nde, Atlantik Okyanusu'nda, Akdeniz'de ve Karadeniz'de dağılım göstermektedir (Ateş, 1999; Horton & Lilley, 2008). *L. depurator* türünün ana besin kaynağını, crustacea, mollusca, polychaete, ophiuroid ve balıklardan oluştuğu rapor edilmiştir (Freire vd., 1993). Karadeniz'de günümüze kadar 17 yengeç türü tespit edilmiş olup, bu türler üzerinde yapılan çalışmalar genelde sistematik ve bulunurluk çalışmalarıdır (Anosov, 2000; Bilgin & Çelik, 2004; Gönlügür-Demirci, 2006; Ateş vd., 2010; Micu vd., 2010; Micu vd., 2011; Bilgin, 2019). Literatürde türün biyolojisi ile ilgili olarak Abello, (1989) Kuzey batı Akdeniz' de türün üreme biyolojisini ve kabuk değişimi özelliklerini, Fernández vd., (1991) İspanya kıyılarında yaptıkları çalışmada türün populasyon biyolojisini rapor etmişlerdir. Araştırma bölgesinde *L. depurator* türünün yılda iki kez yumurtladığı şeklinde yorumlanmıştır. Trol örneklemelerinde yeni birey katılımının özellikle Ağustos-Eylül arasında gerçekleştiği, von Bertalanffy büyüme denkleminde göre büyüme oranının erkeklerde dişilerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Fernández, 1991). Ría de Arousa sahillerinde (Kuzey-batı İspanya) *L. depurator* türünün %50 cinsi olgunluk boyu erkeklerde 31,4 mm ve 35,7 mm karapaks boy, dişilerde ise 25,5 mm ve 31,5 mm olarak hesaplanmıştır (Muiño vd., 1999). Rufino vd. (2005), 1994 ve 2003 yılları arasında Akdeniz'de Iberian yarım adasında 25 m ve 800 m arasındaki derinliklerde 10 yıl süreyle *L. depurator* türünün yoğunluk dağılımlarını incelenmişlerdir. Bu türün her derinlikten örneklediğini, trol örneklemelerinin yaklaşık %80'inde ve sığ çamurlu bölgelerde km² de ortalama 985 *L. depurator* bulunduğunu rapor etmişlerdir. *L. depurator* türünün megalopa evresini araştıran bir çalışmada, Batı Akdeniz ve Kuzeydoğu Atlantik 'de toplanan örnekler morfolojik olarak incelenmiş. Diğer çalışmalarla karşılaştırılmış megalopa evresindeki bireyle yetişkin bireyler arasında meritik ve morfometrik farklılıkların önemli olduğu ortaya konulmuştur (Guerao vd., 2009). Akdeniz den elde edilen megalopa örnekleri morfolojik olarak yetişkin bireylerle karşılaştırılmış ve önemli farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur (Guerao ve Abello, 2011). Akdeniz kıyılarında dip trolü ile yapılan bir çalışmada *L. depurator* türünün dişi ve erkek bireyleri arasındaki morfolojik farklılıklar incelenmiş ve dişi bireyler ile erkek bireyler arasında morfolojik karapaks boyu genişliği ve dikenleri gibi morfolojik karakterlerde önemli farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur (Rufino vd., 2009). Muiño, (2002) türün yumurta verimliliğini değerlendirmiştir. Ancak Karadeniz'de türün biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Karadeniz Ordu kıyılarında yapılan bir çalışmada *L. depurator* türünün boy ağırlık ilişkisi incelenmiş ve karapaks genişliği ile ağırlık

arasında kuvvetli bir ilişki bulunurken, karapaks boyu ve ağırlık arasında zayıf bir ilişki olduğunu ortaya konulmuştur. İncelenen bireylerin ortalama karapaks uzunluğu ve karapaks genişliği sırasıyla dişilerde 21,6 mm ve 26,6 mm, erkeklerde 30,1 mm ve 37,7 mm olarak rapor edilmiştir (Aydın vd., 2013). Aydın, (2018) türün boy-ağırlık ilişkisini çalışmış ve aralarında güçlü bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuştur ayrıca kondisyon faktörünü incelemiştir. Populasyonların sürdürülebilirliği ve doğru yönetim stratejilerinin geliştirilebilmesi için büyüme parametrelerinin bilinmesi gereklidir (Lopez-Martinez vd., 2014). Ayrıca Dekapoda türleri deniz ekosisteminin önemli ekolojik bileşenleridir ve orta trofik seviyede hayati bir rol oynarlar (Farina vd., 1997). Bu nedenle bu türlerin biyolojik ve ekolojik özelliklerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı, *L. depurator* türünün boya dayalı büyüme özelliklerinin ortaya koyulmasıdır. Ayrıca Karadeniz'de ilk kez bu çalışmayla büyümenin mevsimsellik durumu ortaya konulmuştur.

MATERIAL AND METHOD

Bu çalışma kapsamında örneklemeler, Rize açıklarındaki 3 noktada (İyidere, Merkez, Çayeli) konumlandırılmış 4 farklı derinlik konturundan 2 m genişlik ve 15 mm ağ göz açıklığına sahip kirişli trol (beam trawl) kullanılarak Aralık 2012 ve Kasım 2013 tarihleri arasında aylık olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Örneklem istasyonları.
Figure 1. Sampling stations.

İyidere istasyonu; dip yapısı bakımından genel olarak kum, çakıl ve kabuk yapıdan oluşmaktadır. Merkez istasyonu; dip yapısı bakımından kabuk, küçük kaya döküntülerinden ve kısmen makroalglerle (*Zostera* sp., *Ulva* sp.), kısmende kumluk alanların baskın olduğu alanlardan oluşmaktadır. Çayeli istasyonunda; dip yapısı kumluk ve makroalglerle (*Zostera* sp., *Ulva* sp. ve *Cystoseira* sp.) kaplıdır. Araştırmada her istasyonda sahilden başlanarak 30 m ve üzeri derinliklerden dip yapısına bağlı olarak 10-30

dakika arasında değişen sürelerde ortalama 2,2 knot hızla çekimler yapılmıştır. Çekimler, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ), Su Ürünleri Fakültesine ait SUAR isimli araştırma teknesiyle yapılmıştır. Çekim yapılan derinlikler 4 gruba ayrılmıştır. 1. derinlik: sahilden başlayarak 5 m' ye kadar olan, 2. derinlik: 5-10 m arasındaki alan, 3. derinlik: 10-20 m arasındaki alan ve 4. derinlik: 20-30+ m arasındaki alan şeklindedir. Çekimler sonucunda toplanan yengeç örnekleri aynı gün içerisinde RTEÜ, Su Ürünleri Fakültesi, Balıkçılık Laboratuvarı'na getirilmiştir. *L. depurator* türünün karapaks boyu rosturum ucundan karapaksın posterior ucuna kadar olan mesafe temel alınarak ölçülmüştür. Karapaks genişliği karapaks üzerindeki sağ ve soldan 5. dişlerin uçtan uca olan mesafesi temel alınarak ölçülmüştür (Muino vd., 1999). Ağırlıklar 0,001 g hassasiyetteki terazide tartılmış, boylar ise 0,01 mm hassasiyetli dijital kumpasla ölçülmüştür. Cinsiyet tespiti, toraksın altında kalan karın bölgesi erkeklerde daha dar ve sivri, dişilerde ise daha geniştir ve çok sayıda pleopod yer almaktadır (Abello, 1989).

L. depurator türünün kabuk değişirme (molting) safhaları Abello (1989), tarafından bildirilen karapaksın esneklik özelliklerine göre belirlenmiş ve aşağıda belirtildiği gibi beş safhada sınıflandırılmıştır.

1. kabuk değişirme safhası: dış iskelet çok yumuşak ve şeffaf görünümündedir.

2. kabuk değişirme safhası: dış iskelette kalsifikasyon oluşmaya başlamıştır. Kâğıt gibi bir görünüm kazanır. Kısaç ve yürüme bacakları karapaksa göre daha sert yapıdadır.

3. kabuk değişirme safhası: dış iskelette kalsifikasyon gelişmeye devam eder ancak hala karapaks esnek durumdadır.

4. kabuk değişirme safhası: artık dış iskelet esnekliğini kaybetmek üzere olup sertleşmeye başlamıştır.

5. kabuk değişirme safhası: tamamen yeni iskelet görünümü almış ve oldukça serttir.

Cinsiyetlere göre (dişi, yumurtalı dişi ve erkek) aylık ve genel boy frekans dağılımları 2 mm sınıf aralığında oluşturulmuştur. Cinsiyetlere göre ortalama karapaks genişliği (*KG*) arasındaki fark *t* testi kullanılarak, boy frekans dağılımları arasındaki fark ise iki örnek Kolmogorov-Smirnow testi kullanılarak incelenmiştir. İstatistiksel analizler PAST version 2.14 programı (Hammer vd., 2001) kullanılarak yapılmıştır.

L. depurator türünün erkek, yumurtalı dişi ve yumurtasız dişi bireylerinin karapaks boy ve ağırlık ilişkileri, karapaks genişlik ve ağırlık, karapaks boy ve karapaks genişlik ilişkileri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$W = aL^b,$$

Burada; *W* = yengeç ağırlığı (g), *L* = yengeç karapaks genişliği ya da karapaks boyudur (mm). *L*.

depurator türünün von Bertalanffy büyüme sabitleri cinsiyetlere göre hesaplanmıştır. von Bertalanffy büyüme fonksiyonunun mevsimsel ve mevsimsel olmayan iki farklı parametrisasyonu kullanılmıştır. Hesaplamalar, aylık karapaks genişliği (*KG*) frekans dağılım verileri ile LFDA ver. 5.0 programı (Kirkwood vd., 2001) kullanılarak yapılmıştır. Mevsimsel olmayan üç parametrelili von Bertalanffy büyüme modeli Bertalanffy (1938), tarafından belirtilen aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$L_t = L_\infty (1 - e^{-K(t-t_0)})$$

Mevsimsel von Bertalanffy büyüme modeli Somers (1988) ve ELEFAN (Electronic Length Frequency Analysis) Hoeing mevsimsel büyüme eğrisine göre Kirkwood vd. (2001), tarafından belirtilen aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$L_t = L_\infty \left[1 - e^{-K(t-t_0) - \left(\frac{CK}{2\pi}\right) \sin 2\pi(t-t_s) + \left(\frac{CK}{2\pi}\right) \sin 2\pi(t_0-t_s)} \right]$$

L_t = *t* yaşındaki yengeç boyu (mm)

L_∞ = yengecin büyüdüğü sonușmaz karapaks genişliği (mm)

K = büyüme katsayısı (yıl⁻¹)

t₀ = yengeç boyunun kuramsal olarak sıfır olduğu yaş (yıl)

C = mevsimsel salınım genliği (0 ≤ *C* ≤ 1)

t_s = mevsimsel salınım safhası (-0,5 ≤ *t_s* ≤ 0,5) (Sinüs dalgası salınımın konveks segmentinin başlangıcı).

Büyüme oranının yıl içindeki en yavaş olduğu zaman olan kış noktası (*WP*) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$WP = t_s + 0,5.$$

Von Bertalanffy büyüme eğrisinin mevsimsel ve mevsimsel olmayan parametrisasyonlarının performansını karşılaştırmak amacıyla piglerden geçme uygunluğunun bir ifadesi olan *Rn* aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Rn = \frac{10^{ESP}}{10^{ASP}}$$

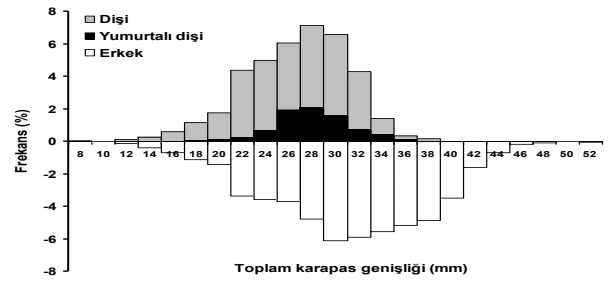
ASP = mevcut piklerin toplamı, *ESP* = büyüme eğrisinin geçtiği piklerin toplamı. Büyüme performansı indeksi (*Φ'*) dişi ve erkek bireyler için aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Pauly & Munro, 1984). *Φ'* = log(*K*) + 2 log(*L_∞*).

BULGULAR

Büyüme: Araştırmada süresince toplamda 2715 *L. depurator* bireyi biyolojik olarak incelenmiştir. Yumurtasız dişiler ile erkek bireylerin ortalama genişliği arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (t testi, p<0,001). Dişilerin (yumurtalı+yumurtasız) ortalama karapaks

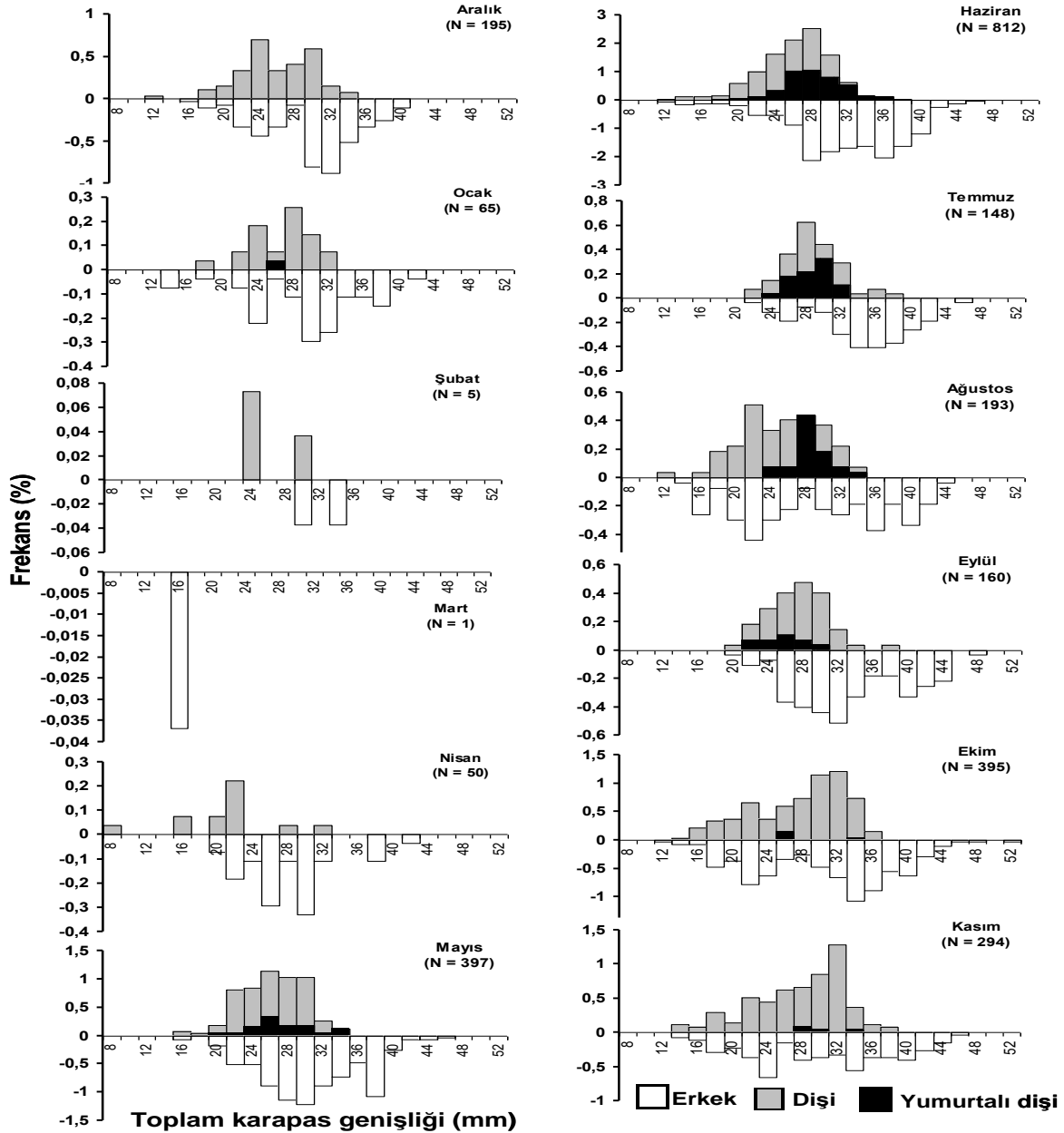
genişliğinin erkek bireylerden istatistiksel olarak daha büyük olduğu belirlenmiştir (t testi, $p < 0,001$). Dişi (yumurtalı+yumurtasız) ve erkek bireylerin boy frekans dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (iki örnek Kolmogorov-Smirnov testi, $p < 0,001$) (Şekil 2).

Örneklenen bireylerin %39,4'ünü yumurtasız dişi, %7,8'ini yumurtalı dişi ve %52,8'i ise erkek bireylerden oluşturmaktadır. Dişi, yumurtalı dişi ve erkek *L. depurator* bireylerinin aylık toplam karapaks genişliği- frekans dağılımı Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 2. Dişi, yumurtalı dişi ve erkek *L. depurator* bireylerinin toplam karapaks genişliği frekans dağılımı.

Figure 2. Frequency distribution of total carapace width of female, egg female and male *L. depurator* specimens.

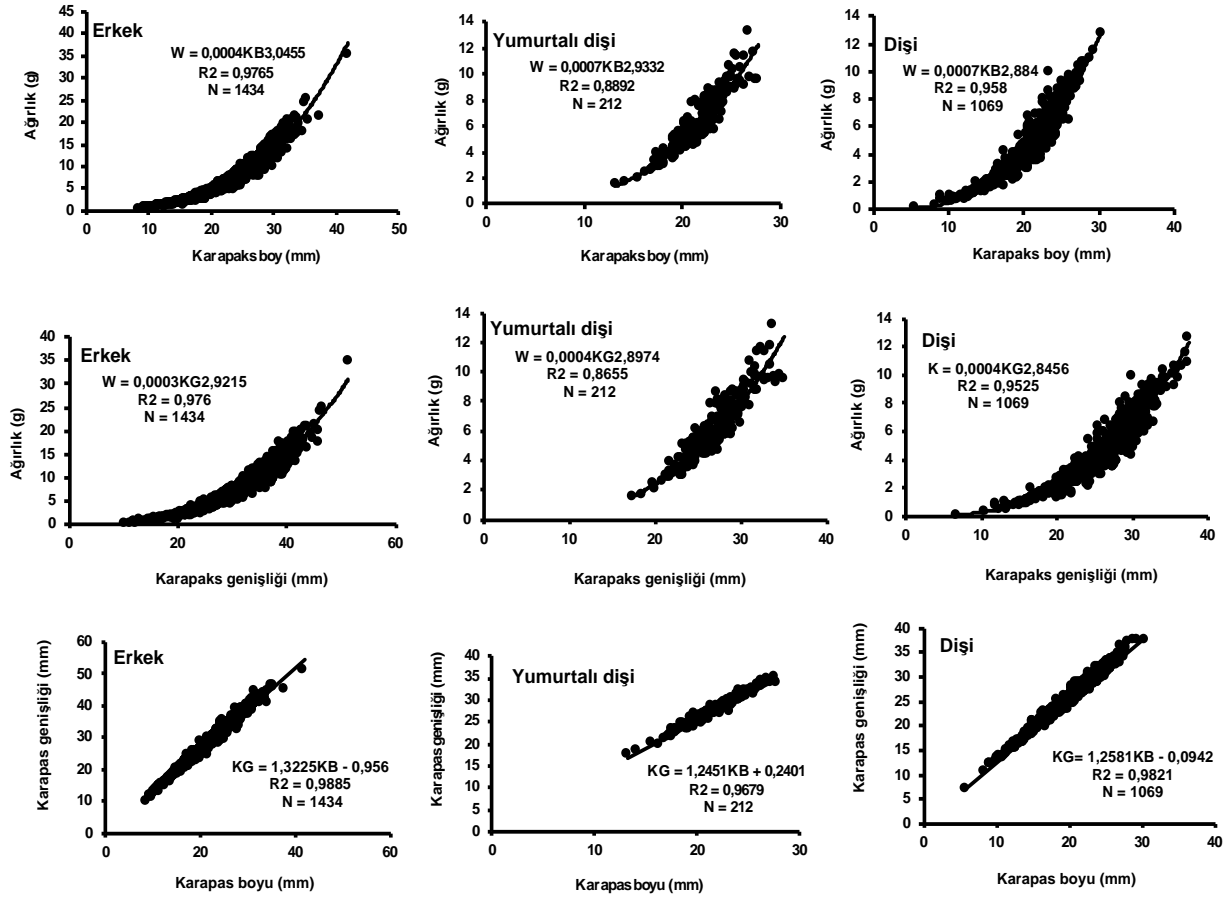


Şekil 3. Dişi, yumurtalı dişi ve erkek *L. depurator* bireylerinin aylık toplam karapaks genişliği frekans dağılımı.

Figure 3. Monthly total carapace width frequency distribution of female, egg female and male *L. depurator* specimens.

Boy-ağırlık, boy-genişlik ilişkisi: *L. depurator* türünün erkek, yumurtalı dişi ve yumurtasız dişi bireylerinin

karapaks boy ve ağırlık, karapaks genişlik ve ağırlık ve karapaks boy ve karapaks genişlik Şekil 4'te sunulmuştur.



Şekil 4. *L. depurator* türünün erkek, yumurtalı dişi ve dişi bireylerinin karapaks boy, genişlik ve ağırlık ilişkileri.

Figure 4. Carapace length, width and weight relationships of male, egg female and female individuals of *L. depurator* species.

Mevsimsel Büyüme: Araştırmada *L. depurator* türünün büyümesi mevsimsel ve mevsimsel olmayan von Bertalanffy büyüme modeline göre incelenmiştir sonuçlar Tablo 1’de sunulmuştur. Dişi ve erkek bireylerin büyüme özelliğini temsil etme açısından mevsimsel büyüme modelinin, mevsimsel olmayan modele göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Büyüme eğrisindeki mevsimsel salınımın erkeklerde ($C = 0,990$), dişilere göre ($C = 0,703$) daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 5-6). Bu sonuçlar göre *L. depurator* türünün mevsimsel büyüme özelliği gösterdiğini görülmektedir. Erkek bireyler için büyümenin en yavaş olduğu zaman, kış ortası ($WP = 0$), dişi bireyler için ise ilkbahar sonu ($WP = 4,73$) olduğu tespit edilmiştir. Büyüme performansı (Φ'), L_{∞} ve K değerleri erkek bireylerde ($\Phi' = 3,363$, $L_{\infty} = 36,4$ mm ve $K = 1,739$ yıl⁻¹), dişilerde ise ($\Phi' = 3,317$, $L_{\infty} = 35,0$ mm ve $K = 1,692$ yıl⁻¹) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler incelendiğinde, büyüme

Kabuk Değişirme safhaları: Erkek bireyler için kabuk değişirme (molting) safhalarının aylık değişimi incelendiğinde, sürecin Mayıs ayından sonra başladığı, henüz kabuk değiştirmiş 1. safhadaki bireylerin özellikle Ekim ve Kasım aylarında yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7). Özellikle kabuk değişiminden sonra yengeçlerin büyüme hızı en yüksek seviyede olduğundan

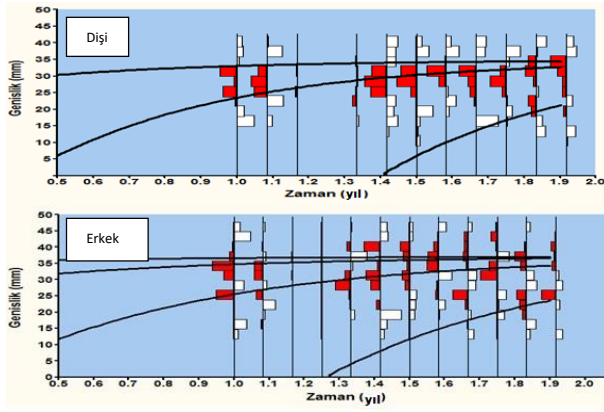
performansının dişilere göre erkeklerde daha büyük olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. Dişi ve erkek *L. depurator* için aylık boy frekans verilerinden ELEFAN (Elektronik Boy Frekans Analizi) metoduna göre hesaplanan Hoenig mevsimsel ve mevsimsel olmayan von Bertalanffy büyüme denklemi (VBBD) parametreleri.

Table 1. Hoenig seasonal and non-seasonal von Bertalanffy growth equation (VBBD) parameters calculated according to ELEFAN (Electronic Length Frequency Analysis) method from monthly height frequency data for male and female *L. depurator*.

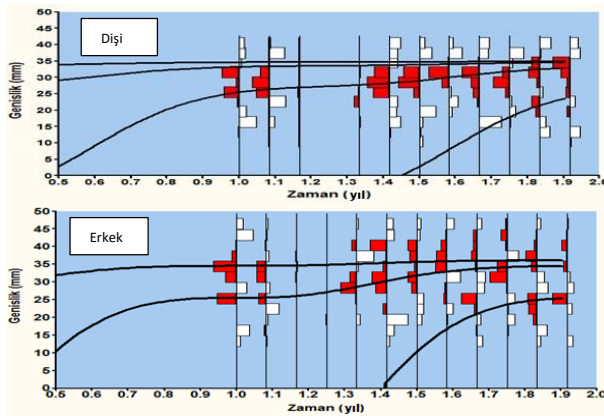
Parametre	Hoenig mevsimsel		Mevsimsel olmayan	
	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi
L_{∞} (mm)	36,42	35,00	37,14	34,74
K (yıl ⁻¹)	1,739	1,692	1,570	1,872
t_0 (yıl)	-0,600	-0,550	-0,740	-0,600
WP	0,000	4,730		
ts	-0,500	-0,270		
C	0,990	0,703		
Φ'	3,363	3,317	3,336	3,354
Rn	0,597	0,766	0,434	0,676

büyümesinin özellikle Mayıs ve Kasım ayları arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Söz konusu durum dişi bireyler içinde benzerlik göstermiştir. Ayrıca, yumurtalı 212 dişi bireyin hepsinde kabuk değişirme safhası 4 olarak tespit edilmiştir. Bu da yumurtalı bireylerin kabuk değiştirmede anlamına gelmektedir.



Şekil 5. *L. depurator* türünün dişi ve erkek bireyleri için ELEFAN göre metoduna hesaplanan mevsimsel olmayan von Bertalanffy büyüme denklemi (VBBD) grafiği.

Figure 5. Nonseasonal VBBD graph calculated by ELEFAN method for male and female individuals of *L. depurator* species.



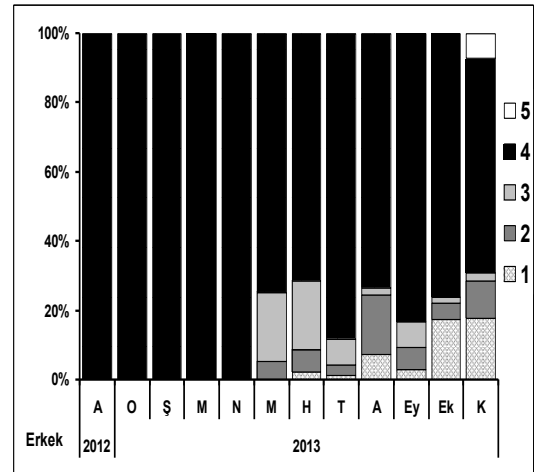
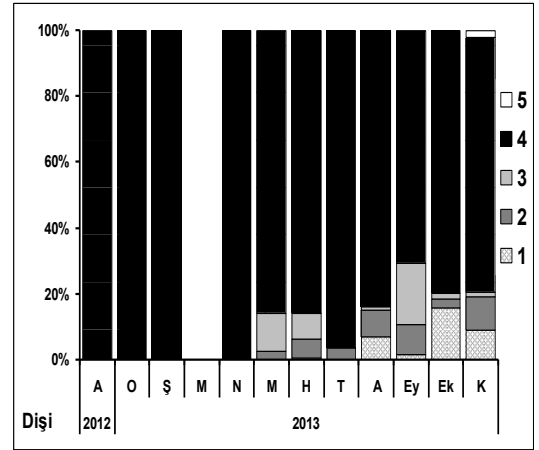
Şekil 6. *L. depurator* türünün dişi ve erkek bireyleri için ELEFAN hoenig metoduna göre hesaplanan mevsimsel von Bertalanffy büyüme denklemi (VBBD) grafiği.

Figure 6. Seasonal VBBD graph calculated according to ELEFAN hoenig method for male and female individuals of *L. depurator* species.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Büyüme: Aydın vd. (2013), Karadeniz Ordu kıyılarında uzatma ağlarına takılan bireylerin ortalama karapaks uzunluğu ve karapaks genişliği sırasıyla dişilerde 21,6 mm ve 26,6 mm, erkeklerde 30,1 mm ve 37,7 mm olarak tespit edilmiştir. Fernandez vd. (1991), İspanya Ria de Arousa kıyılarında dişi ve erkek bireylerin karapaks genişliği- ağırlık ve karapaks boyu- ağırlık arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Dişi ve erkek bireyler arasında karapaks genişliği- karapaks uzunluğu arasında farklılık olduğunu ve erkeklerin dişilerden daha uzun olduğunu belirlemiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların nedeni kullanılan av araçlarının özelliklerinden kaynaklanmış olabilir.

Mevsimsel Büyüme: Fernandez vd. (1991), Ria de Arousa (Galiçya kıyıları)'da iki farklı istasyonda (aynı habitat ve derinlik (çamurlu, 8-30 m) özellikli yaptığı örneklemeler sonucunda L_{∞} değerlerinde erkek bireyleri dişi bireylere oranla daha büyük bulmuştur (Tablo 2). Bu çalışmada Von Bertalanffy (mevsimsel olmayan) ve



Şekil 71. Erkek ve dişi *L. depurator* bireylerinin aylara göre molting (kabuk değiştirme) safhaları.

Figure 7. Molting stages of male and female *L. depurator* individuals by months.

Hoening (mevsimsel) büyüme metotları ile hesaplanan L_{∞} değerleri, Fernandez vd. (1991), tarafından hesaplanan değerler ile benzerlik göstermektedir. K ve t_0 değerleri karşılaştırıldığında her ikisi içinde bariz farklılıklar görülmektedir. Bu farklılığın nedeni çalışmaların farklı (besin sıcaklık tuzluluk gibi) biyotik ve abiyotik özelliklere sahip bölgelerde (Kuzey denizi) yapılmış olması ve araştırmacıların kullandığı farklı avcılık yöntemiyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Fernandez vd. (1991) yarı pelajik 4 m boyunda ve 10 mm göz açıklığına sahip trol kullanmış ve aylık 10 dakikalık çekimler yapmıştır.

Literatürde von Bertalanffy büyüme metodu göz önünde bulundurularak diğer yengeç türleri ile ilgili yapılan çalışmalar Tablo 2' de gösterilmiştir. Josileen ve Menon (2005) L_{∞} değerinde dişileri erkeklerden daha büyük bulurken, diğer çalışmalarda erkek bireyler dişilerden daha büyük hesaplanmıştır. Portunitlerde yaygın olarak erkekler dişilere oranla daha büyüktür. Bu farklılık dişilerin büyüme sürecinde enerjilerini gonad gelişimi ve daha sonrasında yumurta gelişimi için harcamalarıyla ilgilidir (Hartnoll, 1985). Ayrıca bu büyüklük çiftleşme

sırasında erkeğin dişiyi korumasını da sağlamaktadır (Hartnoll, 1969; Christy, 1987). Yengeçlerde K değeri erkek bireylerde dişilere oranla daha yüksektir (Tablo 2). K değerlerindeki bu durum bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Ancak diğer büyüme parametreleri arasında farklılıklar gözlenmektedir (Tablo 2). Çalışmalarda büyüme parametreleri arasındaki bu farklılıklar karşılaştırılan türlerin farklı ailelerden oluşması, örneklemelerin farklı özellikli (besin, sıcaklık ve sediment) habitatlardan yapılmış olması, bireylerin boy dağılımının farklı olması ve araştırmacıların kullandığı avcılık yönteminin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevsimsel büyüme modeli krustaselerden dekapodlarda çok yaygındır. Bu büyüme farklı türler arasında farklılık göstermezken cinsiyetler arasında farklılık gösterir (Guerao vd., 1994). *L. depurator* türünde büyüme eğrisindeki mevsimsel salınımın erkeklerde ($C = 0,990$) dişilere göre ($C = 0,703$) daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum *L. depurator* türünün mevsimsel olarak büyüdüğünü gösterir. Bu çalışmada

ovaryumlu dişilerde molting görülmemiştir. Yengeçler bu dönemde enerjilerini yumurta gelişimi için kullanırlar bu yüzden üreme zamanında büyüme yavaştır (Oh vd., 1999). Bu durum mevsimsel büyüme salınımının farklılığını açıklamaktadır. Bu çalışmada dişiler için büyümenin en yavaş olduğu zaman ilkbahar sonunda (üreme dönemi başlangıcı) $WP = 4,73$ olduğu tespit edilmiştir. Erkek bireyler için büyümenin en yavaş olduğu zaman, kış ortası olarak belirlenmiştir. Cinsiyetlere göre mevsimsel büyümenin yavaş olması su sıcaklığının düşük olması, bölgede ki besin miktarı ile besin alma oranının düşük olması ve üreme zamanlarındaki gonad gelişimi ile ilgili olabilir (Oh vd., 1999). Yengeçlerde büyüme performansı erkeklerde dişilere oranla daha büyük olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Benzer şekilde bu çalışmada da erkek bireylerde ki ($\Phi' = 3,363$) büyüme performansının dişilere ($\Phi' = 3,317$) göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın oluşmasını biyotik (genetik çeşitlilik, predatörler gibi) ve abiyotik (tuzluluk ve habitat yapısı gibi) faktörler etkilemiş olabilir (Beverton & Holt, 1957).

Tablo 2. Bazı Brachyura (yengeç) türlerinin von Bertalanffy Büyüme Denklemi parametreleri ((* Karapaks genişliği, (** Karapaks boyu) (1), Gold ve holland metodu (2) Munro metodu, (3) Fabens metodu.

Table 2. Von Bertalanffy Growth Equation parameters of some Brachyura (crab) species ((* Carapace width, (** Carapace length) (1), Gold and holland method (2) Munro method, (3) Fabens method.

Tür	Dişi				Erkek				Dişi+Erkek				Bölge	Çalışma
	L_{∞} (mm)	K (yıl ⁻¹)	t_0	Φ'	L_{∞} (mm)	K (yıl ⁻¹)	t_0	Φ'	L_{∞} (mm)	K (yıl ⁻¹)	t_0	Φ'		
<i>L. depurator</i> *	43,14	2,705	0,216	3,70	56,62	3,085	0,305	4,00					Kuzey Denizi Arosa Koyu	Fernández vd., 1991
<i>L. depurator</i> *	39,02	4,791	0,285	3,86	51,42	2,718	0,256	3,86					Güney Denizi Arosa Koyu	Fernández vd., 1991
<i>P. sanguinolentus</i> *	188,00	0,827	-0,098	4,47	195,00	0,994	-0,013	4,58					GB Hint Oky. (Mangalora)	Sukumaran & Neelakantan, 1997
<i>P. pelagicus</i> *	204,00	0,970	-0,069	4,61	211,00	1,143	-0,019	4,71					GB Hint Oky. (Mangalora)	Sukumaran & Neelakantan, 1997
<i>P. pelagicus</i> *(1)	211,80	1,700		4,88	219,80	1,820		4,94					Hint Oky.	Josileen & Menon, 2005
<i>P. pelagicus</i> *(2)	211,00	1,640		4,86	208,00	1,900		4,91					Hint Oky.	Josileen & Menon, 2005
<i>P. pelagicus</i> *(3)	188,60	1,620		4,76	204,10	1,800		4,87					Hint Oky.	Josileen & Menon, 2005
<i>C. bimaculata</i> **	19,41	0,162	-0,888	1,79	21,53	0,148	-0,867	1,836					Pasifik Oky. (Tokyo körfezi)	Doi vd., 2008
<i>C. arcuatus</i> *									150,00	1,000	4,35	4,352	Pasifik Oky. (Kalifornia körfezi)	López-Martínez vd., 2014
<i>C. bellicosus</i> *									173,00	1,300	4,59	4,590	Pasifik Oky. (Kalifornia körfezi)	López-Martínez vd., 2014
<i>C. toxotes</i> *									168,00	0,900	4,40	4,405	Pasifik Oky. (Kalifornia körfezi)	López-Martínez vd., 2014
<i>P. sanguinolentus</i> *	204,75	0,870		4,56	194,25	0,970		4,563					Doğu Çin denizi (Kuzey Tayvan)	Lee & Hsu, 2003
<i>U. cordatus</i> *	71,00	0,25		3,10	92,00	0,17		3,158					Pasifik Oky. (Birezilya Mangrove)	Diele & Koch, 2010
<i>C. sapidus</i> *									207,5	1,19	0,15	4,710	Patuxent nehri (Birezilya)	ju vd., 2001
<i>P. patagoniensis</i> *									207,5	1,71	0,31	4,867		
									12	1,4	-0,1	2,304	Pasifik Oky. (Birezilya Cassino plj.)	Alves & Pezzuto, 1998
<i>N. puber</i> *									105	0,28		3,491	Pasifik Oky. (İngiltere Plymouth)	Lee vd., 2005
<i>U. cordatus</i> *	88,60	0,26		3,31	90,30	0,28		3,359					Pasifik Oky. (Birezilya Mangrove)	Pinheiro vd., 2005
<i>C. sapidus</i> *	181,9	1,064	0,16	4,55	230,1	0,86	0,85	4,658					Beymelek lagün (Türkiye)	Sümer, vd., 2013

Kabuk değişimi (Molting): Yengeçler hayat evleri boyunca sık sık kabuk değiştirirler. Bunun nedenlerinden biri büyümek diğeri ise çiftleşmeyi kolaylaştırmak olarak sıralanabilir (Erdem vd., 2006). Bir kabuk değiştirmede %20-30 kadar büyüklük artışı sağlanmaktadır (Erdem vd., 2006). Coğrafik bölge, sıcaklık ve türlere göre kabuk değişiminin yıl içindeki

dağılımı değişmektedir (Conan, 1985). *L. depurator* türünün kabuk değişim (molting) safhalarının aylık değişimi erkek bireyler için incelendiğinde, kabuk değiştirme sürecinin mayıs ayından sonra başladığı, henüz kabuk değiştirmiş 1. safhadaki bireylerin özellikle Ekim ve Kasım aylarında daha çok miktarda olduğu tespit edilmiştir. Dişilerde yıl boyunca molting görülmesine karşı

erkeklerde görülmemiştir. Molting dişilerde Mayıs ve Temmuz aylarında yüksek, üreme döneminde ise çok düşük çıkmıştır. Dekapodlar da genel olarak molting, sıcak olan aylarda daha yüksek oranda görülmektedir (Sather, 1966). Abello (1989), üreme dönemi (Ekim- Ocak) boyunca dişilerde kabuk değişimini en az bulurken Mayıs-Temmuz aylarında yüksek oranda molting evresinin ilk safhalarında olan bireyler tespit etmiştir. Söz konusu durum dişi bireyler içinde benzerlik göstermiştir. Ayrıca, yumurtalı 212 dişi bireyin hepsinde kabuk değiştirme safhası 4 olarak tespit edilmiştir. Bu da yumurtalı bireylerin kabuk değiştiği anlamına gelmektedir. (Abello, 1989; Du Preez & McLachlan, 1984; Gonzales-Gurriaran, 1985). Pinheiro ve Fransoza (2002), Pasifik'te (Brazilya, Ubatuba) *A.cribrarius* türün de molting verilerine ilişkin olarak yetişkin 4. safhada erkek bireylerin en yoğun olduğu dönem Temmuz, Eylül ve Aralık olarak belirlemiştir Bu çalışmaya benzer olarak yumurtalı dişilerde 1'inci ve 2'inci safhada hiç birey tespit edilmemiştir. 4. Safhada olan yetişkin dişilerin en yoğun olduğu dönem ise Nisan-Ağustos ayları arasındaki periyotta tespit edilmiştir. Yumurtalı dişilerde molting evresinin ilk safhalarında olan bireylerin bulunmaması dişi bireylerin enerjilerini yumurta gelişimi için kullandıklarının bir göstergesidir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda *L. depurator* türünün bir çok demersal balığın besin kaynağı olduğunu belirtmişlerdir (Olaso, 1990; Hall vd., 1990;). Ekosistemde yer alan ve biyolojileri hakkında sınırlı bilgi sahibi olduğumuz bu canlıların biyolojileri ve ekosistemdeki yerlerinin araştırılması, sürdürülebilir balıkçılık açısından önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 2013.103.03.1 Numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı RTEÜ ve ilgili birimlere teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Abelló, P. (1989).** Reproduction and moulting in *Liocarcinus depurator* (Linnaeus, 1758) (Brachyura: Portunidae) in the northwestern Mediterranean sea. *Scientia Marina*, **53**, 127- 134.
- Alves, E.S. & Pezzuto, P.R. (1998).** Population dynamics of *Pinnixa patagoniensis* Rathbun, 1918 (Brachyura: Pinnotheridae) a symbiotic crab of Sergio mirim (Thalassinidea: Callinassidae) in Cassino Beach, Southern Brasil. *Marine Ecology*, **19**, 37-51. DOI: [10.1111/j.1439-0485.1998.tb00452.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1998.tb00452.x)
- Anosov, S.E. (2000).** Keys to identification of Brachyuran larvae of the Black Sea. *Crustaceana*,

73(10), 1239-1246. DOI: [10.1163/156854000505218](https://doi.org/10.1163/156854000505218)

- Ateş, A.S., Kocataş, A., Katağan, T. & Özcan, T. (2010).** An updated list of Decapod Crustaceans on the Turkish coast with a new record of the Mediterranean shrimp, *Processa acutirostris* Nouvel and Holthuis 1957 (Caridea, Processidae). *North-Western Journal of Zoology*, **6(2)** 209-217.
- Ateş, S. (1999).** *Liocarcinus depurator* and *Brachynotus sexdentatus*: two new records for the Turkish Black Sea fauna. *Turkish Journal of Zoology*, **23**, 115-118.
- Aydın, M., Karadurmuş, U. & Mutlu, C. (2013).** Ordu ili kıyılarında bulunan *Liocarcinus depurator* (Linnaeus, 1758) (Brachyura: Portunidae) yengeç türünün boy-ağırlık ilişkisi ve kondisyon faktörü üzerine bir çalışma. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, **3(8)**, 112-121.
- Aydın, M. (2018).** Length-Weight Relationships and Condition Factors of Five Crab Species (Decapoda) in the Black Sea. *Pakistan Journal of Zoology*, **50(4)**, 1519-1524. DOI: [10.17582/journal.pjz/2018.50.4.1519.1524](https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.4.1519.1524)
- Bertalanffy, L. von. (1938).** A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth law II). *Human Biology*, **10(2)**, 181-213.
- Beverton, R.J.H. & Holt, S.J. (1957).** On the dynamics of exploited fish populations. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Fisheries Investigations London, Series 2, 19, 1-533.
- Bilgin, S. & Çelik, E.Ş. (2004).** Karadeniz'in Sinop kıyıları (Türkiye) yengeçleri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **16(2)**, 337-345.
- Bilgin, S. (2019).** Review: An Update List of Crab Species (Crustacea: Decapoda: Brachyura) with Exotic Crabs in the Black Sea Fauna. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **4(2)**, 211-215. DOI: [10.35229/jaes.566520](https://doi.org/10.35229/jaes.566520)
- Christy, J.H. (1987).** Competitive mating, mate choice and mating associations of brachyuran crabs. *Bulletin of Marine Science*, **41**, 177-191.
- Conan, G.Y. (1985).** Periodicity and phasing of molting. In Crustacean Issues 3: Factors in adult growth, pp. 73-99. Ed. by A. M. Wenner. A. A. Balkema, Rotterdam. 362 pp
- Diele, K. & Koch, V. (2010).** Comparative Population Dynamics and Life Histories of North Brazilian Mangrove Crabs, Genera *Uca* and *Ucides* (Ocypodoidea). In: Saint-Paul U., Schneider H. (eds) Mangrove Dynamics and Management in North Brazil. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 211. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: [10.1007/978-3-642-13457-9_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13457-9_18)
- Du Preez, H.H. & McLachlan, A. (1984).** Biology of the three spot swimming crab *Ovalipes punctatus* (De Haan). III. Reproduction, fecundity and egg development. *Crustaceana*, **47**, 285-297. DOI: [10.1163/156854084X00540](https://doi.org/10.1163/156854084X00540)

- Erdem, Ü., Başusta, N. & Türeli, C. (2006).** Su Omurgasızları yayın no: 833 Baskı 2, ISBN: 975-591-818-3.
- Fariña, A.C., Freire, J. & González-Gurriarán, E. (1997).** Megabenthic decapod crustacean assemblages on the Galician continental shelf and upper slope (north-west Spain). *Marine Biology*, **127**(3), 419-434. DOI: [10.1007/s002270050029](https://doi.org/10.1007/s002270050029)
- Fernández, L., González-Gurriarán, E. & Freire, J. (1991).** Population biology of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae) in Mussel Raft Culture Areas in the Ría de Arousa (Galicia, Nw Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **71**, 375-390. DOI: [10.1017/S0025315400051651](https://doi.org/10.1017/S0025315400051651)
- Freire, J., Fernández, L., Muíño, R. & González-Gurriarán, E. (1993).** Análisis geoestadístico de la distribución espacial de las poblaciones de crustáceos y peces megabentónicos en la Ría de Ferrol (Galicia NO España). *Publicaciones Especiales del Instituto Español de Oceanografía*, **11**, 259-267.
- Gonzalez-Gurriaran, E. (1985).** Reproducción de la necora *Macropipus puber* (L.) (Decapoda, Brachyura), y ciclo reproductivo en la Ría de Arousa (Galicia, NW España). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, **2**, 10-32.
- Gönlügür-Demirci, G. (2006).** Crustacea fauna of the Turkish Black Sea coast a check list. *Crustaceana*, **799**, 1129-1139. DOI: [10.1163/156854006778859641](https://doi.org/10.1163/156854006778859641)
- Guerao, G. & Rotllant, G. (2009).** Development and growth of the early juveniles of the spider crab *Maja squinado* (Brachyura: Majoidea) in an individual culture system. *Aquaculture*, **307**, 105-110. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.006)
- Guerao, G. & Abelló, P. (2011).** Early juvenile development of Mediterranean *Liocarcinus depurator* (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). *Journal of Natural History*, **45**, 35-36, 2171-2189. DOI: [10.1080/00222933.2011.590948](https://doi.org/10.1080/00222933.2011.590948)
- Guerao, G., Perez-Baquera, J. & Ribera, C. (1994).** Growth and reproductive biology of *Palaemon xiphias* Risso, 1816 (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, **14**, 280-288. DOI: [10.2307/1548908](https://doi.org/10.2307/1548908)
- Hall, S.J., Raffaelli, D. & Turrell, W.R. (1990).** Predator caging experiments in marine systems: a reexamination of their value. *American Naturalist*, **136**, 656-672. DOI: [10.1086/285121](https://doi.org/10.1086/285121)
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001).** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**, 9.
- Hartnoll, R.G. (1969).** Mating in the Brachyura. *Crustaceana*, **16**, 161-181. DOI: [10.1163/156854069X00420](https://doi.org/10.1163/156854069X00420)
- Hartnoll, R.G. (1985).** Growth, sexual maturity and reproductive output. In Wenner A.M. (ed.). *Crustacean*, **3**, 101-128.
- Horton, A. & Lilley, J. (2008).** Crabs of the seashore of the British Isles. British Marine Life Study Society.
- Josileen, J. & Menon, N.G. (2005).** Growth of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) (Decapoda, Brachyura) in captivity. *Crustaceana*, **78**(1), 1-18. DOI: [10.1163/1568540054024556](https://doi.org/10.1163/1568540054024556)
- Ju, S.J., Secor, D.H. & Harvey, H.R. (2001).** Growth rate variability and lipofuscin accumulation rates in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine Ecology-Progress Series*, **224**, 197-205. DOI: [10.3354/meps224197](https://doi.org/10.3354/meps224197)
- Kirkwood, G.P., Aukland, R. & Zara, S.J. (2001).** Length frequency distribution analysis (LFDA), version 5.0. MRAG Ltd, London, UK.
- Lee, J.T., Coleman, R.A. & Jones, M.B. (2005).** Population dynamics and growth of juveniles of the velvet swimming crab *Necora puber* (Decapod: Portunidae). *Marine Biology*, **148**, 609-619. DOI: [10.1007/s00227-005-0107-1](https://doi.org/10.1007/s00227-005-0107-1)
- Lee, H. & Hsu, C. (2003).** Population biology of the swimming crab *Portunus sanguinolentus* in the water off northern Taiwan. *Journal of Crustacean Biology*, **23**, 691-699. DOI: [10.1651/C-2358](https://doi.org/10.1651/C-2358)
- Lopez-Martinez, J., Lopez-Herrera, L., Valdez-Holguin, J.E. & Rabago-Quiroz, H.C. (2014).** Population dynamics of the swimming crabs *Callinectes* (Portunidae) components of shrimp bycatch in the eastern coast of the Gulf of California. *Revista de Biología Marina Oceanografía*, **49**, 17-19. DOI: [10.4067/S0718-19572014000100003](https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000100003)
- Micu, D., Niță, V. & Todorova, V. (2010).** First record of the Japanese shore crab *Hemigrapsus sanguineus* (de Haan, 1835) (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae) from the Black Sea. *Aquatic Invasions*, **5**(1), 1-4. DOI: [10.3391/ai.2010.5.S1.001](https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.S1.001)
- Micu, D., Niță, V. & Todorova, V. (2011).** First record of Say's mud crab *Dyspanopeus sayi* (Brachyura: Xanthoidea: Panopeidae) from the Black Sea. *Marine Biodiversity Records*, **3**, 36. DOI: [10.1017/S1755267210000308](https://doi.org/10.1017/S1755267210000308)
- Muñiño R., Fernández L., González-Gurriarán E., Freire J. & Vilar J. A. (1999).** Size at maturity of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae): a reproductive and morphometric study. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **79**(02), 295-303. DOI: [10.1017/S0025315498000320](https://doi.org/10.1017/S0025315498000320)
- Muñiño R., 2002.** Fecundity of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae) in the Ría de Arousa (Galicia, north-west Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **82**(1)109-116. DOI: [10.1017/S0025315402005222](https://doi.org/10.1017/S0025315402005222)
- Olaso, I. (1990).** Distribución abundancia del megabentos invertebrado en fondos de la plataforma Cantábrica. *Publicaciones Especiales del Instituto Español de Oceanografía*, **5**, 128.

- Oh, C.W., Hartnoll, R.G. & Nash, R.D.M. (1999).** Population dynamics of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.), in Port Erin Bay, Isle of Man, Irish Sea. *ICES Journal of Marine Science*, **56**, 718-733. DOI: [10.1006/jmsc.1999.0501](https://doi.org/10.1006/jmsc.1999.0501)
- Pinheiro, M.A.A., Fiscarelli, A.G. & Hattori, G.Y. (2005).** Growth of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ocypodidae). *Journal of Crustacean Biology*, **25**, 293-301. DOI: [10.1651/C-2438](https://doi.org/10.1651/C-2438)
- Pinheiro, M.A.A. & Fransozo, A. (2002).** Reproduction of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Brachyura: Portunidae) on the Brazilian coast near 23° 30'S. *Journal of Crustacean Biology*, **22**(2), 416-428. DOI: [10.1163/20021975-99990249](https://doi.org/10.1163/20021975-99990249)
- Rufino, M. (2004).** Distribution of *Liocarcinus depurator* along the western mediterranean coast. PHD thesis. School of Ocean Sciences (University of Wales) Institut de Ciències del mar Spain, 213 p.
- Rufino, M., Abello, P., Yule, A.B. & Torres, P. (2005).** Geographic, bathymetric and inter-annual variability in the distribution of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae) along the Mediterranean coast of the Iberian Peninsula. *Scientia Marina*, **69**(4), 503-518. DOI: [10.3989/scimar.2005.69n4503](https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n4503)
- Sather, B. T. (1966).** Observations on the molt cycle and growth of the crab, *Podophthalmus vigil* (Fabricius) (Decapoda, Portunidae). *Crustaceana*, **11**, 185-197. DOI: [10.1163/156854066X00351](https://doi.org/10.1163/156854066X00351)
- Severino-Rodrigues, E., Musiello-Fernandes, J., Moura, A.A.S., Branco G.M.P. & Canéo, V.O.C. (2012).** Biologia reprodutiva de fêmeas de *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) no Complexo Estuarino-Lagunar de Iguape e Cananeia (SP). *Boletim do Instituto de Pesca*, **38**, 31-41.
- Sukumaran, K.K. & Neelakantan, B. (1997).** Sex ratio, fecundity and reproductive potential in two marine portunid crabs, *Portunus (Portunus) sanguinolentus* (Herbst) and *Portunus (Portunus) pelagicus* (Linnaeus) along the Karnataka coast. *Indian Journal of Marine Sciences*, **26**, 43-48.
- Sumer, Ç., Teksam, I., Karatas, H., Beyhan, T. & Aydın, C.M. (2013).** Growth and Reproduction Biology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, in the Beymelek Lagoon (Southwestern Coast of Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **13**, 675-684. DOI: [10.4194/1303-2712-v13_4_13](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_4_13)



Current Approaches to Short and Long-Term Storage of Honey Bee Semen

Arda Onur ÖZKÖK

Department of Veterinary, Amasya University, Amasya, Turkey

Geliş/Received: 11.10.2021

Kabul/Accepted: 23.12.2021

Yayın/Published: 31.03.2022

How to cite: Özkök, A.O. (2022). Current Approaches to Short and Long-Term Storage of Honey Bee Semen. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 72-75.

Atıf yapmak için: Özkök, A.O. (2022). Bal Arısı Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanmasıyla İlgili Güncel Yaklaşımlar. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 72-75.

*ID: <https://orcid.org/0000-0001-9932-3608>

***Corresponding author:**

Arda Onur ÖZKÖK
Department of Veterinary, Amasya University,
Amasya, Turkey
✉: arda.ozkok@amasya.edu.tr

Abstract: There are many studies on the storage of honey bee semen. Due to its unique structure, bee semen varies according to the storage period but is suitable for short-term storage conditions. However, in terms of long-term storage conditions, developments in mammals have not been caught. It is known that more studies are needed on this subject. The great advantages of semen storage are its effective role in eliminating the problems of inbreeding after a while in pure breed enterprises, increasing the yield characteristics and preventing gene pollution. To solve these problems, beekeepers have to buy breeding queens from abroad with very high costs, and the expected results cannot always be obtained from the bees brought. Especially considering the genetic risks faced by regional breeds in Turkey, it is necessary to preserve semen, to protect colonies in pure breed enterprises, as well as to develop genetically yield characteristics and to prevent inbreeding. It can also prevent the spread of diseases compared to natural mating by contributing to artificial insemination. By improving the storage conditions of honey bee semen, long-term use of semen from well-known colonies will be possible. Producers will be able to benefit from the advantages of artificial insemination at a cheaper cost, with the semen being sent to distant regions as in mammals under appropriate storage conditions. The purpose of this review is to give information about the storage conditions of honeybee semen.

Keywords: Honey bee, semen, storage.

Bal Arısı Spermasının Kısa ve Uzun Süreli Saklanmasıyla İlgili Güncel Yaklaşımlar

Öz: Bal arısı spermasının saklanabilmesiyle ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Arı sperması kendine özgü yapısı nedeniyle saklama süresine göre değişimle birlikte kısa süreli saklama koşulları için elverişlidir. Ancak uzun süreli saklama koşulları açısından memeli hayvanlardaki gelişmeler yakalanamamıştır. Bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Spermanın saklanabilmesinin büyük avantajları saf ırk bulunan işletmelerde bir süre sonra akrabalı yetiştiriciliğin verdiği problemlerin giderilebilmesi, verim özelliklerinin artırılabilmesi ve gen kirliliğinin önlenbilmesindeki etkin rolüdür. Arı yetiştiricileri bu problemleri giderebilmek için yurt dışından çok yüksek maliyetlerle damızlık kraliçe satın almak zorunda kalmakta ve getirilen arılardan her zaman beklenen sonuçlar alınamamaktadır. Özellikle ülkemizde bölgesel ırkların karşılaştığı genetik riskleri düşünürsek spermanın saklanabilmesi, saf ırk işletmelerdeki kolonilerin korunabilmesinin yanında genetik olarak verim özelliklerinin geliştirilmesi, akrabalı yetiştiriciliğin önlenbilmesi için de gereklidir. Ayrıca suni tohumlamaya katkıda bulunarak doğal çiftleşmeyle karşılaştırıldığında hastalıkların yayılmasını önleyebilmektedir. Bal arısı spermasının saklanma koşullarının geliştirilmesiyle özellikleri bilinen kaliteli kolonilerden alınan spermanın uzun süreli kullanımı mümkün olacaktır. Üreticiler alınan spermanın uygun saklama koşullarında memeli hayvanlardaki gibi uzak bölgelere gönderilebilmesiyle birlikte daha ucuza suni tohumlamanın sunduğu avantajlardan yararlanılabileceklerdir. Bu derlemenin amacı bal arısı spermasının saklanma koşullarıyla ilgili bilgi vermektir.

***Sorumlu yazar:**

Arda Onur ÖZKÖK
Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek
Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü,
Amasya, Türkiye
✉: arda.ozkok@amasya.edu.tr

Anahtar kelimeler: Bal arısı, sperma, depolama.

INTRODUCTION

Studies on the storage of honey bee semen are important for the development and dissemination of artificial insemination in honey bees. Improving the storage conditions is key, especially to increase the yield characteristics of pure breed bees and to contribute to the development of beekeeping with the transport of semen.

It has been reported that honey bee semen can be stored at room temperature for up to 1 week (Collins, 2000). According to Cobey, (2007), honeybee semen can be stored at room temperature for a maximum of 2 weeks. The acrosome length of the honeybee semen is 5 µm and the total length including the flagellum is around 250-270 µm (Lensky et al., 1979; Lino-Neto et al., 2000). Honeybee semen is sensitive to adverse events that may occur during freezing (Wegener et al., 2014a). The low percentage of worker bees in the eggs of the fertilized queen bees as a result of keeping the semen in storage conditions for a long time was found to be remarkable (Harbo, 1979; Cobey, 2007). It has been stated that antioxidants have a positive effect on honey bee semen as in mammals. It has been reported that glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase have a positive effect on semen quality, especially against the damages of oxidative stress (Abdelkader et al., 2019).

Semen Diluents: Diluents added to the semen are very important for the storage of semen for artificial insemination in honey bees. For this purpose, many studies have been conducted and the effects of different diluents on semen have been evaluated.

In a study of queen bees inseminated with semen diluted with Tris, Hayem, and Kiev diluents, it was found that diluted and centrifuged semen extended the ovulation time at different rates. Moreover, it has been reported that diluents change the rate of drones in inseminated bees (Moritz, 1984). Amino acids and antibiotics added to the diluent have a beneficial effect on storage conditions. Besides, the success of using the diluted semen by centrifugation varies depending on the diluents (Moritz, 1984). In the cryopreservation application applied for the storage of honey bee semen, the semen can be diluted with suitable diluents and the dilution rates may vary according to the solution used. Dilution ratios such as 1:1, 5:1, 3:2 can be preferred (Paillard et al., 2017). It is also used in different ratios from cryoprotectant agents such as glycerol, ethylene glycol, DMSO under long-term storage conditions (Taylor et al., 2009). Harbo's successful diluent contains 60% semen, 10% DMSO and 30% saline solution (Harbo, 1979). To increase the effectiveness of diluents, it has also been tried to use substances such as egg yolk and coconut water for semen diluents. Hopkins et al., (2012) emphasized the importance of the fact that egg yolk added

to the diluent can cause infection because it is an animal product, as well as it can negatively affect the life of the queen bee by causing obstruction in the reproductive canal. It has been observed that coconut water had a supportive effect on the semen vitality rate. In this way, no significant loss of vitality was observed for up to 14 days (Almeda & Soarez, 2002). It has been stated that antioxidants added to semen diluent increase the semen quality (Cobey, 2007; Taylor et al., 2009). Moreover, it has been reported that the buffer content of the diluent contains amino acids and sugar, as well as a pH value of 8.5 for honey bees.

Protocol Regarding Filling Honeybee Semen into Straws: To ensure healthy storage conditions, the semen diluted with the appropriate dilution rate and method are filled into straws in the form of diluent-air-space-semen-air-space-diluent, and the open end of the straw is pressed and closed (Hopkins et al., 2012).



Figure 1. Filling of honey bee semen into the straw (Gül et al., 2017).

Approaches to the Short-Term Storage of Honeybee Semen: It has been reported that no serious semen loss was observed when honey bee semen was stored under room temperature conditions for as little as a week. It has been stated that it can be used by keeping it waiting for artificial insemination in this way. After the diluted semen was loaded into the capillary tube, it could be stored for up to 6 weeks with around 80% spermatozoa viability preserved. It was emphasized that the success rate increased due to the improvement of short-term storage conditions at 12-16°C (Collins, 2000). It has been observed that viability and motility decrease as the storage period increases under short-term storage conditions (Looke & Peng, 1993). For artificial insemination, honeybee semen can be stored for a short time at 15-36°C for up to 36 hours. It has been reported that semen can be stored for up to 48 hours at 21°C (Harbo & Williams, 1987). The semen, which is diluted and transferred to capillary tubes, can be stored as diluent-air-semen-air-diluent. The prepared capillary tubes can be stored in special incubators at 16 ± 1 °C, protected from light (Paillard et al., 2017). Since the queen bee can be adversely affected by the composition of the diluent, it can be centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes in a 1.5 ml eppendorf tube, and the semen can be purified from the diluent (Wegener et al., 2014b). Centrifugation of diluted semen can damage spermatozoa. It has been reported that it is better to mix gently with an instrument rather than a centrifuge (Lodessani et al., 2004).

It has been stated that temperatures between 16°C and -196°C are suitable for storing honeybee semen. The important thing is to obtain healthy results when the stored semen is used in artificial insemination (Paillard et al., 2017). The semen taken from drones can be temporarily stored at room temperature for a few days and can be practically used in artificial insemination. For this purpose, the two ends of the capillary glass tubes used to collect semen are temporarily closed with petroleum jelly or similar material. Since light can damage semen, it can be stored in dark conditions (Cobey, 2013).

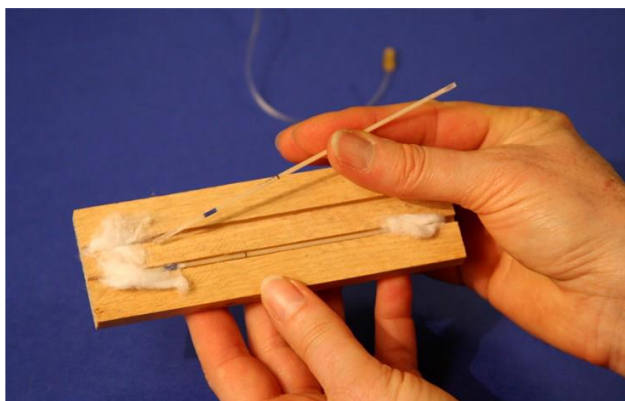


Figure 2. Short-term storage of semen for artificial insemination (Cobey, 2013).

Approaches to the Long-Term Storage of Honeybee Semen: With the long-term storage of semen, artificial insemination is possible not only during the season but also when drones are not available (Cobey, 2013). Honeybee semen has a very long flagellum. Furthermore, the head is long and the acrosome and nucleus lengths are the same. The mitochondrial helix functions by stretching along the flagellum (Lino-Neto et al., 2000). The secretions of the attachment glands that participate in the structure of the semen in drone and the special proteins it contains play an important role in the survival of the spermatozoa (den Boer et al., 2009). In honeybees, long-term semen can be stored using freezing methods (Harbo, 1979). Semen can be stored in liquid nitrogen using various cryoprotectants (Dimethyl sulfoxide, glycerol etc). However, it has been determined that a significant part of the eggs of the queen bees fertilized in the sperm stored for a long time in this way are male eggs (Wegenner & Bienefeld, 2012). It has been reported that the reason for this situation is the genetic damage suffered during the freezing of semen (Harbo, 1981). The main factors affecting the success of cryopreservation methods are thought to be the toxicity of cryoprotectants, temperature sensitivity, freezing speed ratio and cold shock (Hopkins & Herr, 2010). Therefore, it is necessary to develop appropriate storage techniques for the long-term storage of honey bee semen (Cobey, 2007). Many studies have been done on this subject and different

semen freezing methods have been tried. Hopkins and Herr (2010) reduced the temperature gradually from room temperature to -40°C with a temperature loss of 3°C per minute and then transferred it to -196°C liquid nitrogen. In another semen freezing study, semen, which was gradually cooled to 5°C, was stored directly in -196°C liquid nitrogen (Dadkhah et al., 2016). In their study, Alçay et al., (2015) reduced the temperature of semen to 5°C and kept them in the cooler for 2 hours at 5°C for the equilibration process. They were then cooled to -110 °C in liquid nitrogen vapor for 10 minutes and stored in liquid nitrogen at -196 °C. Thawing of frozen bee semen was done by keeping it at 37°C for 30 seconds (Paillard et al., 2017).

It was observed that the percentage of drones in artificially inseminated queen bees decreased when honey bee semen was frozen and stored for a long time. As the storage period increases, the percentage of drones also decreases. The percentage of drones was determined as 22% in semen stored frozen for 4 days and 8% in semen stored for 2 years (Harbo, 1983). DMSO has been found to be safer for honey bees among other cryoprotectant agents (Harbo, 1979; Taylor et al., 2009). In a study on storing bee semen at -196°C for 1 year by freezing with a diluent containing DMSO, it was reported that storage conditions below freezing temperature were more successful. Besides, the importance of frozen and thawed semen in terms of protecting the health of the queen bee was mentioned (Paillard et al., 2017).

CONCLUSION

It is seen that short-term storage of bee semen has very successful results compared to long-term storage. The most important determinant of success is the percentage of drones in the eggs of the queen bee inseminated with the stored sperm. It is a great advantage that bee semen can be stored at room temperature for up to 1 week after collection. On the other hand, when stored for a long time, semen must be frozen and cryoprotectant must be added to the semen diluent. Due to its unique structure, honey bee semen suffers serious damage during freezing and thawing. In the storage of semen, the substances added to the semen diluent and antioxidants contribute to the improvement of the storage conditions. With the storage of semen in honey bees, the cost of forming colonies with the desired genetic characteristics can be reduced. Disease and parasitic diseases can be prevented. Pure breeds can be maintained in controlled beekeeping. Artificial insemination can be expanded. There are many studies on the storage of honey bee semen, and new studies shed light on this field every day. However, it is thought that more studies are needed on the long-term storage of bee semen.

REFERENCES

- Abdelkader, F.B., Kairo, G., Bonnet, M., Barbouche, N., Belzunces, L.P. & Brunet, J.L. (2019).** Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen. *Journal of Apicultural Research*, *58*(5), 740-745. DOI: [10.1080/002118839.2019.1655182](https://doi.org/10.1080/002118839.2019.1655182)
- Alçay, S., Üstüner, B; Çakmak, İ; Çakmak, S; Nur, Z. (2015).** Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, *21*(1), 31-35. DOI: [10.9775/kvfd.2014.11515](https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11515)
- Almeida, R., & Soares, A.E.E. (2002).** Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apoidea). *Interciencia*, *27*(6), 317-321.
- Cobey, S. W. (2007).** Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, *38*(4), 390-410. DOI: [10.1051/apido:2007029](https://doi.org/10.1051/apido:2007029)
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013).** Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, *52*(4), 1-18. DOI: [10.3896/IBRA.1.52.4.09](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09)
- Collins, A.M. (2000).** Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *Journal of Economic Entomology*, *93*(3), 568-571. DOI: [10.1603/0022-0493-93.3.568](https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.568)
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M. & Hopkins, B.K. (2016).** Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*, *55*(4), 279-283. DOI: [10.1080/00218839.2016.1243292](https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292)
- Den Boer, S.P., Boomsma, J.J. & Baer, B. (2009).** Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *Journal of Insect Physiology*, *55*(6), 538-543. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2009.01.012](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.01.012)
- Gül, A., Şahinler, N., Onal, A.G., Hopkins, B.K. & Sheppard, W.S. (2017).** Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, *101*, 109-113. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2017.06.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.020)
- Harbo, J.R. (1979).** Storage of honeybee spermatozoa at -196°C. *Journal of Apicultural Research*, *18*(1), 57-63. DOI: [10.1080/00218839.1979.11099945](https://doi.org/10.1080/00218839.1979.11099945)
- Harbo, J.R. (1983).** Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196°C). *Annals of the Entomological Society of America*, *76*(5), 890-891. DOI: [10.1093/aesa/76.5.890](https://doi.org/10.1093/aesa/76.5.890)
- Harbo, J.R. & Williams, J.L. (1987).** Effect of above-freezing temperatures on temporary storage of honeybee spermatozoa. *Journal of Apicultural Research*, *26*(1), 53-55. DOI: [10.1080/002118839.1987.11100735](https://doi.org/10.1080/002118839.1987.11100735)
- Hopkins, B.K. & Herr, C. (2010).** Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, *41*(5), 548-556. DOI: [10.1051/apido/20010006](https://doi.org/10.1051/apido/20010006)
- Hopkins, B.K., Herr, C. & Sheppard, W.S. (2012).** Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, *24*(8), 1079-1083. DOI: [10.1071/RD11088](https://doi.org/10.1071/RD11088)
- Lensky, Y., Eytan, B.-D. & Schindler, H. (1979).** Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honeybee. *Journal of Apicultural Research*, *18*, 264-271. DOI: [10.1080/00218839](https://doi.org/10.1080/00218839)
- Lino-Neto, J., Bão, S. N., & Dolder, H. (2000).** Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*)(L)(Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*, *32*(4), 322-327. DOI: [10.1054/tice.2000.0119](https://doi.org/10.1054/tice.2000.0119)
- Locke, S.J., & Peng, Y.S. (1993).** The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological entomology*, *18*(2), 144-148. DOI: [10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x)
- Lodesani, M., Balduzzi, D., & Galli, A. (2004).** Functional characterisation of semen in honey bee queen (*Am ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Italian Journal of Animal Science*, *3*(4), 385-392. DOI: [10.4081/ijas.2004.385](https://doi.org/10.4081/ijas.2004.385)
- Moritz, R.F.A. (1984).** The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. Apic. Res.*, *23*(3), 164-167. DOI: [10.1080/00218839.1984.11100626](https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100626)
- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P. & Bailey, J.L. (2017).** Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *Journal of economic entomology*, *110*(4), 1412-1418. DOI: [10.1093/jee/tox149](https://doi.org/10.1093/jee/tox149)
- Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., & Buhr, M. M. (2009).** Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, *72*(2), 149-159. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.02.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012)
- Wegener, J. & Bienefeld, K. (2012).** Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, *77*(3), 600-607. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.08.036](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.036)
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014a).** A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, *69*(2), 236-242. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2014.07.011](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.011)
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014b).** New methods and media for the centrifugation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *Journal of economic entomology*, *107*(1), 47-53. DOI: [10.1603/EC13159](https://doi.org/10.1603/EC13159)



Rize İl Sınırları İçerisindeki *Rubus* L. (Rosaceae) Türlerinin Morfolojik, Mikromorfolojik ve Moleküler Sistematik Özelliklerinin Analizi

Fatma KUYUMCU* Fatih Şaban BERİŞ Vagif ATAMOV

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 53100, Merkez/Rize, Türkiye.

Geliş Tarihi: 28.10.2021

Kabul Tarihi: 23.02.2022

Basım Tarihi: 31.03.2022

Atf yapmak için: Kuyumcu, F., Beriş, F.Ş. & Atamov, V. (2022). Rize İl Sınırları İçerisindeki *Rubus* L. (Rosaceae) Türlerinin Morfolojik, Mikromorfolojik ve Moleküler Sistematik Özelliklerinin Analizi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), -.

How to cite: Kuyumcu, F., Beriş, F.Ş. & Atamov, V. (2022). Analysis of Morphological, Micromorphological and Molecular Systematic Properties of *Rubus* L. (Rosaceae) Species in Rize Province. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), -.

*ID: <https://orcid.org/0000-0001-9778-614X>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-0535-943X>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-6718-7979>

*Sorumlu yazarın:
Fatma KUYUMCU
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen
Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
53100, Merkez/Rize, Türkiye.
✉: fatmakuyumcu@hotmail.com.tr

Öz: Bu çalışma ile Rize ilinde yayılış gösteren 8 *Rubus* türü morfolojik, mikromorfolojik ve moleküler sistematik yönden araştırıldı. Bitki materyalleri 2019 yılında yapılan arazi çalışmaları ile toplandı. Araştırma bölgesinden toplanan örnekler teşhis edildi ve herbaryum örneği haline getirildi. Bu türlerin gövde, yaprak ve çiçek gibi kısımları stereomikroskopta morfolojik, SEM’de ise mikromorfolojik olarak incelendi. Sonrasında örnekler ait ITS bölgeleri PZR ile çoğaltılarak dizi analizi yapıldı. Analiz sonucu 8 tür arasındaki benzerlik ilişkisini ortaya koyan filogenetik ağaç oluşturuldu. Mikromorfolojik görüntülere bakıldığında 8 tür arasında gövde, yaprak tüylenmesi, tüy tipleri ve diken yapısının ayırıcı özellikte olduğu tespit edildi. Morfolojik bulgular sonucunda 8 *Rubus* türünün yaprak, meyve, diken, petal, yaprak ve yaprakçık ölçüsü, meyve tanelerinin yapısı, sayısı ve şekli, yaprak alt ve üst yüzeyi, petal yüzeyi tüylenme durumu, meyve ve sepallerin rengi, yaprak kenarı yapısı bakımından birbirinden ayrıldığı, bu özelliklerin karakteristik olduğu belirlendi. *Rubus* türlerinin dizi analizi sonucunda elde edilen moleküler bulgularda ortalama baz uzunluğunun 709 ile 731 bp arasında değiştiği belirlendi. Oluşturulan filogenetik ağaç neticesinde *Rosacea* familyasına en yakın türlerin *Rubus hirtus* ve *Rubus tereticaulis*, en uzak türün ise *Rubus sanctus* olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Rubus*, morfoloji, mikromorfoloji, ITS, filogenetik ağaç, PZR.

Analysis of Morphological, Micromorphological and Molecular Systematic Properties of *Rubus* L. (Rosaceae) Species in Rize Province

Abstract: *Rubus* species in Rize province were compared morphologically and micromorphologically along with molecular systematics of plants in this work. Analysed plant materials were sampled during field studies conducted in 2019. The collected samples were identified according to known methods and were transferred into herbarium plants. A total of 8 taxa belonging to *Rubus* species were found. Plant parts such as stem, leaves and flowers were examined morphologically and micromorphologically under stereo microscope and SEM. Then, plant genomic DNA was isolated from fresh leaf samples by suitable methods to determine ITS profiles. Then the ITS regions were amplified by PCR and sequenced. A phylogenetic tree showing the similarity among this 8 species was then created based on the sequence analysis. The stem, leaf trichomes, trichome types and thorn structure were found to be distinctive among these 8 species when micromorphological images were examined. As a result of morphological findings, *Rubus* plants constitute 8 distinct species in terms of leaf, fruit, thorn, shape, petal, leaf and leaflet size, structure, number and shape of fruit grains, leaf adaxial and abaxial surface, trichome amount of petal surface, color of fruit and sepals and leaf edge structure. These features were characteristic for all the species examined. Molecular data showed that the average base length of *Rubus* species was found to be between 709 and 731 bps. Created phylogenetic tree revealed that the species closest to the Rosacea family were *Rubus hirtus* and *Rubus tereticaulis* while the most distant species were *Rubus sanctus*.

*Corresponding author’s:
Fatma KUYUMCU
Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of
Arts and Sciences, Department of Biology,
53100, Center/Rize, Turkey
✉: fatmakuyumcu@hotmail.com.tr

Keywords: ITS, micromorphology, morphology, PCR, phylogenetic tree, *Rubus*.

GİRİŞ

Türkiye, 780,576 km²'lik yüz ölçümü ile dünyanın 32. büyük ülkesidir. Türkiye Damarlı Bitkileri Listesi'ne göre (Güner vd., 2012), ülkemizde toplam 167 familya ve 1.320 cinse ait 9.996 tür, 1989 alttür, 867 varyete, 263 melez tür ve 5 melez alttür olmak üzere toplam 11.707 takson bulunmaktadır. Türkiye'deki 12.000'e yakın bitki taksonundan 500'ünün tıbbi ve aromatik özellikli ve bunlardan 200 tanesinin ise ihracat potansiyeline sahip olduğu açıklanmıştır. Bu özelliklerinden dolayı Türkiye florası hem yerli, hem de yabancı botanikçilerin ilgisini çekmiştir (Özer, 2017; Koday & Erhan, 2013).

Coğrafi açıdan bakıldığında Türkiye'nin kuzeydoğusunda, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yer alan Rize ili kuzeyden tamamen Karadeniz ile çevrilmiştir. Batıda Trabzon, doğusunda Artvin, güneyde Erzurum ile komşu olan Rize fitocoğrafik olarak Avrupa Sibirya bölgesinin Kolşik flora kesiminde bulunmaktadır. İlin vejetasyonu genellikle mezofitik özellikli ormanlar, çalılar ve yüksek dağ çayırlarından oluşmaktadır. Rize ilinin florası ile ilgili yapılan çalışmalar sırasıyla Güner (1984), Vural (1996), Çobanoğlu (2012), Demir (2013), Aksoy (2013), Baykal vd. (2018), Ofluoğlu, (2015), Ekşi (2016), Süzen (2017), Sarıgül (2018), Baykal & Atamov (2018), Batan vd. (2018), Atamov & Çobanoğlu (2019), Demir & Atamov (2019) tarafından yapılmıştır. Bu bölgenin bitki örtüsü açısından ne kadar zengin olduğu yapılan birçok araştırmalardan da anlaşılmaktadır (Özer, 2017).

Ülkemizde oldukça geniş yayılışa sahip *Rubus* L. cinsine ait türler özellikle Doğu Karadeniz Bölgesinde doğal olarak bulunmaktadır ve Türkiye'deki yayılışı, birçok türü için Doğu Karadeniz Bölgesi ile sınırlıdır. Yapılan

çalışmalar yayılış alanlarıyla beraber yeni yayılış alanları, toprak özellikleri (humus içerikleri), etkileri ve ekolojileri üzerinedir (Kuyumcu, 2020).

Ülkemizde böğürtlen (*Rubus* L.) cinsine ait taksonlar özellikle Karadeniz sahil bölgelerinde yaygın olarak yetişmektedir. Böylesine yaygın olarak yetişen bu cinse ait türlerin morfolojik olarak birbirine benzer olması ve bundan dolayı teşhisin kolay yapılması için genetik karakterizasyonunun yapılması ve daha sonraki çalışmalara da ışık tutması açısından önem arz etmektedir. Bu çalışma Rize ili hudutlarını (A8 karesi) kapsamaktadır. Çalışmanın amacı, Rize ilinde yayılış gösteren *Rubus* türlerinin morfolojik yönden incelenmesi ve filogenetik farklılıklarını Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgelerini moleküler farklılığını ortaya koyabilmektir.

MATERYAL VE METOT

Rubus cinsi Türkiye'de 8 türe ait 9 taksonla temsil edilmektedir. Bu taksonlar: *Rubus caesius* L., *Rubus canescens* DC. var. *canescens*, *Rubus canescens* DC. var. *glabratus* (Gordon) Davis & Meikle, *Rubus caucasicus* Focke, *Rubus hirtus* Waldst & Kit, *Rubus idaeus* L., *Rubus sanctus* Schreber, *Rubus saxatilis* L. ve *Rubus tereticaulis* P.J. Mueller (Eminağaoğlu vd., 2021). Bu araştırmanın materyalini 2018-2019 yılları arasında Rize il sınırları içerisinde yer alan ve Tablo 1'de verilen lokalitelerden alınan *Rubus* cinsine ait türler oluşturmaktadır. Toplanan örnekler preslenerek herbaryum örneği haline getirilmiştir. Davis (1972)'e göre teşhis edilen türlerin adları Türkiye'nin Bütün Ağaçları ve Çalıları (Eminağaoğlu vd., 2021) kullanılarak kontrol edilmiştir.

Tablo 1. Bitki örneklerinin toplandığı tarih yükseklik lokalite ve habitatlar.

Table 1. The date the plant samples were collected, altitude, locality and habitats.

Yer Kod (Location code)	Yer (Location)	GPS	Yükseklik (Altitude) (m)	Habitat	Tarih (date)	Tür (Species)
A2	Ardeşen müftü 2	37 T 0667219 UTM 4562084	19	Dere kenarı yol kenarı dikenlik	10.07.2019	<i>R. caesius</i>
N1	Yeşiltepe	N4055336 E 040 48050	927	Kestane ve ıhlamur yaygın	22.06.2019	<i>R. canescens</i>
A1	Ardeşen Müftü 2	37 T 0667219 UTM 4562084	19	Yol kenarı, Dere yanı	10.07.2019	<i>R. canescens</i>
Ç2	Çamlıhemşin	37 T 0671642 UTM 4550049	411	Köy içi bahçe kenarları	7.07.2019	<i>R. caucasicus</i>
M1	Marabadam Yaylası	37 T 0647647 UTM 4522585	1500	Karışık orman Kızılağaç yaygın	22.06.2019	<i>R. caucasicus</i>
Ç4	Çamlıhemşin 4 yol	37 T 0675309 UTM 4547946	1383	Karışık orman içine step yerleşmiş	7.07.2019	<i>R. caucasicus</i>
ÇK1	Çat Köyü	37 T 0660665 UTM 4528237	1057	Orman bitki örtüsü yol kenarı	6.07.2019	<i>R. caucasicus</i>
G1	Gürpınar Köyü Babik	37 T 0668411 UTM 4524245	759	Çalılık	22.07.2019	<i>R. hirtus</i>
V2	Verçenik Yaylası	37 T 0660981 UTM 4517858	2029	Subalpin çayır	6.07.2019	<i>R. idaeus</i>
K1	Koçdüzü Yaylası	37 T 06795151 UTM 4543760	1970	Alpin çayır	7.07.2019	<i>R. idaeus</i>
K2	Koçdüzü Yaylası	37 T 06795151 UTM 4543760	1970	Alpin çayır	7.07.2019	<i>R. idaeus</i>
V3	Verçenik Yaylası	37 T 0661197 UTM 4518050	1997 m	Geniş, Alpin çayırlar	6.07.2019	<i>R. saxatilis</i>
Ç1	Çamlıhemşin	37 T 0668671 UTM 4544461	363 m	Orman içi açıklık	6.07.2019	<i>R. tereticaulis</i>
AÇ	Ardeşen	37 T 0667219 UTM 4562084	17 m	Çarşı içi	10.08.2019	<i>R. sanctus</i>

Morfolojik özelliklerin ölçümleri herbaryum materyali şekline getirilmiş bitki örneklerinden faydalanılarak yapılmıştır. Bitki örneklerinin gövde, yaprak, çiçek ve bunların kısımlarına bakılmış ve ölçüleri alınmıştır. Bazı mikro karakterlerin milimetrik oküler yardımı ile ölçülmesinde LEICA S6D marka stereomikroskopundan yararlanılmıştır (Hekimoğlu, 2019).

Yapılan incelemelerde türlerin yaprak ayası ve kenar şekilleri, yaprak alt ve üst yüzeyindeki tüylenmeler, petiyolun tüy ve diken yapısı, tüylenme durumu, stipul şekilleri ile gövde üzerindeki tüylenme ve diken yapısı gibi özellikler incelenmiştir. Yine türlere ait herbaryum örnekleri incelenerek morfolojik özelliklerinin daha iyi belirlenmesi sağlanmıştır (Gedik, 2019; Toker, 2004).

Bitki örneklerinin mikromorfolojik özelliklerinin belirlenmesinde taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) kullanılmıştır. Toplanan bitki örneklerinin yaprak ve gövde kısımları görüntülenmiştir. Alınan görüntüler 4565-PhotoScape_V3.7.exe yazılımı ile düzenlenerek yalınlaştırılmış, ölçek ve tonlamalara sadık kalınmıştır (Hekimoğlu, 2019).

SEM çalışmaları bitkilerin yaprak altı, yaprak üstü ve gövdelerinden alınan örneklerle yapılmıştır. İlk olarak polenler üzerinde çift tarafı yapışkan karbon bantlı staplara (metal taşıyıcılar) yerleştirilerek yerleşim düzeyi not edilmiştir. Bu staplar iletkenliği sağlamak amacıyla SC502 Sputter Coater yardımıyla altınla kaplandı. Altınla kaplanan yaprak ve gövde yapıları çoğunlukla 100X, 200X, 1000X ve 2000X büyütme gücünde fotoğraflandı. SEM çalışmaları Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan JEOL JSM-6610 marka SEM kullanılarak 5-15 kV altında yürütüldü (Güzel, 2018).

Moleküler Çalışmalar:

Genomik DNA İzolasyonu: Laboratuvarında -20 °C’de saklanan bitki yaprak örneklerinden DNA izole etmek için sıvı azot ile öğütme işlemi uygulandı. DNA izolasyonu, Haymes (1996)’e göre revizyon yapılarak CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolü üzerinden elde edildi.

PZR: Çalışmalarda uygulanan PZR içeriği Tablo 2’de, PZR şartları ise Tablo 3’de verilmiştir. Toplamda 25 µL olarak hazırlanan reaksiyon içeriği ve miktarları aşağıdaki (Tablo 3) gibidir.

Tablo 2. PZR içeriği (Haymes, 1996).

Table 2. PCR contents (Haymes, 1996).

Kimyasal (Chemical)	Miktar (Amount)	Stok (Stock)
DNA	2 µL	-
MgCl ₂	1,2 µL	25 mm
dNTP	1,4 µL	10 mm
ITS4 ve ITS5 primerler	2+2 µL	100 pmol
Taq DNA Polimeraz	1,5 µL	3 U/µL
10X Buffer	2 µL	10X
dH ₂ O	23 µL	-

Tablo 3. PZR şartları (Haymes, 1996).

Table 3. PCR conditions (Haymes, 1996).

Sıcaklık (Temperute)	Süre (Time)	Döngü (Loop)
94 °C	4 dakika (minute)	40 döngü (Loop)
94 °C	2 dakika (minute)	
48 °C	1 dakika (minute)	
	30 saniye (second)	
72 °C	2 dakika (minute)	
72 °C	10 dakika (minute)	

Agaroz Jel Elektrofrezisi; PZR ürünleri %1’lik hazırlanan agaroz jelde 110 voltta 20 dakika yürütüldü ve EtBr ile

boyanarak UVP Gel Documentation System ile UV ışığında görüntüldü.

ITS Bölgelerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi; PZR örnekleri MedSantek (Ankara) firmasına gönderilerek aynı primerler ile DNA dizi analizine tabi tutuldu. Elde edilen sekans sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzünden faydalanılarak GenBank’taki verilerle karşılaştırıldı ve CLUSTAL-W ile taksonlar arasındaki benzerlikler analizi yapılarak filogenetik ağaç çizildi.

BULGULAR

Morfolojik Bulgular: Bölgede *Rubus* cinsine ait türlerin çiçek yapısında iştirak eden anter ve petallerin boy ve en ölçüleri, filamentlerin ise boy ölçüleri Tablo 4 ’te verilmiştir.

Tablo 4. *Rubus* türlerinin anter, filament ve petal ölçülerinin karşılaştırılması.

Table 4. Comparison of anther, filament and petal sizes of *Rubus* species.

	Anter		Flament Boy(most) (µm)	Petal	
	Boy(most) (µm)	En (size) (µm)		En (size) (µm)	Boy(most) (µm)
<i>R. caesius</i>	3.39	2.29	3.26	2.41	9.03
<i>R. canescens</i>	0.54	2.99	2.02	2.66	5.47
<i>R. caucasicus</i>	0.81	0.68	4.48	3.47	9.17
<i>R. hirtus</i>	0.40	0.98	3.48	2.46	6.30
<i>R. idaeus</i>	0.76	0.64	3.79	2.74	8.09
<i>R. sanctus</i>	0.27	0.42	2.92	2.17	4.13
<i>R. saxatilis</i>	-	-	-	2.75	5.49
<i>R. tereticaulis</i>	0.47	0.33	3.54	3.04	9.12

Araştırma alanında yayılış gösteren *Rubus* cinsine ait türlerin yaprak boy ölçümleri Tablo 5 ’te ve Şekil 1 ’de verilmiştir.



Şekil 1. *Rubus* türlerinin yaprak boyu bakımından karşılaştırılması.
Figure 1. Comparison of *Rubus* species in terms of leaf length.

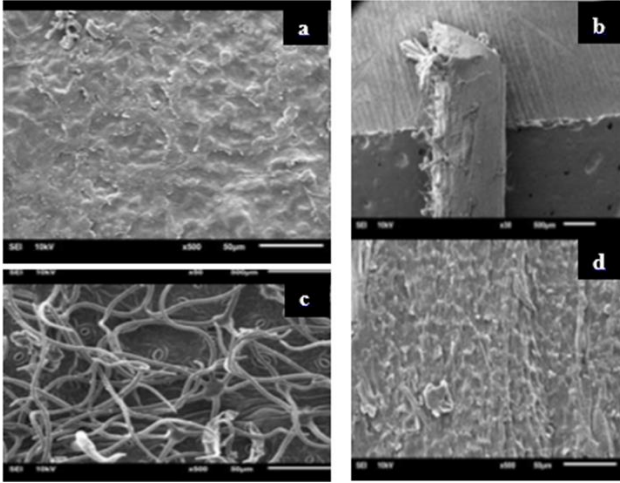
Tablo 5. *Rubus* türlerinin yaprak boyu, çiçek boyutu ve drupa sayısı bakımından karşılaştırılması.

Table 5. Comparison of *Rubus* species in terms of leaf length, flower size and number of drupes).

	<i>R. caesius</i>	<i>R. canescens</i>	<i>R. caucasicus</i>	<i>R. hirtus</i>	<i>R. idaeus</i>	<i>R. sanctus</i>	<i>R. saxatilis</i>	<i>R. tereticaulis</i>
Yaprak boyu (leaf size)(cm)	8	9	10	7	6	2.7	4	6.5
Drupa sayısı (adet)	15	7	30	7	7	20	6	13
Çiçek eni (flower width) (cm)	-	9	10	12	11	6.5	13	1

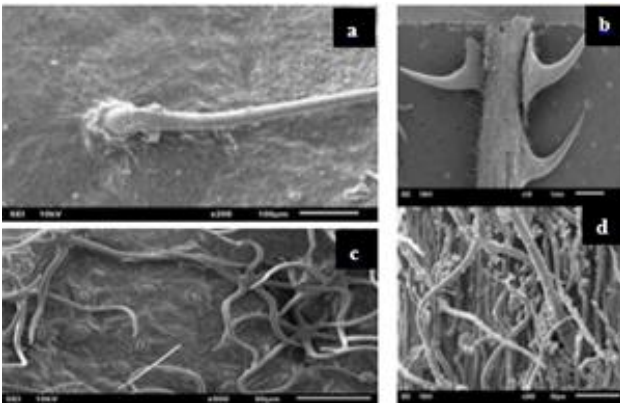
Araştırma alanı sınırları içerisinde rastlanan *Rubus* cinsine ait türlerin drupa tipi meyvelerinin drupa sayısı, çiçek boyutu, yaprak boyu bakımından karşılaştırılması sonuçları Tablo 5’de verilmiştir. Tablo 5 ‘de *Rubus caesius*’un çiçek boyutu ile ilgili bir bilgi görülmektedir. Bunun nedeni bu türe ait çiçeklerin örnek toplama döneminde meyveye dönüşmüş olmasıdır.

Mikromorfolojik Bulgular: Araştırma alanı sınırları içerisinde bulunan *Rubus* cinsine ait türlerin yaprak üstü, yaprak altı ve gövdelerine ait mikromorfolojik görüntüleri çekilmiştir. Buna göre; *Rubus caesius*’un yaprak üst yüzeyine bakıldığında tüylenme ve diken yapısına rastlanmamaktadır. Yaprak alt yüzeyinde ise yoğun ve birbirine geçmiş şekilde kıvrık krispit tüyler ve stomalara rastlanmaktadır. Gövde epidermis yapısında da yer yer salgı tüyü ve basit tüye rastlanmakta, diken yapısının yoğun olmadığı görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. *Rubus caesius*’a ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x500 görüntü (b) gövde x30 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x500 görüntü

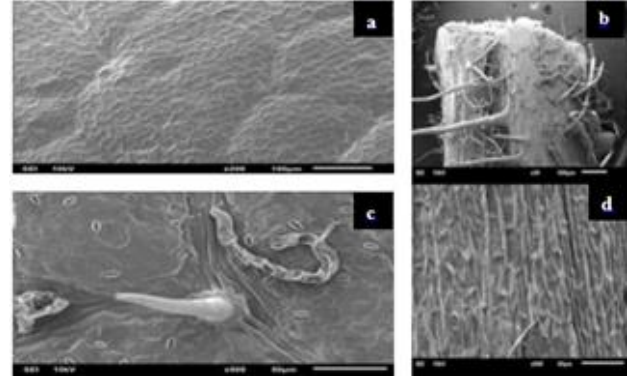
Figure 2. Micromorphological images of *Rubus caesius* (a) x500 image on the leaf (b) x30 image of the stem (c) x500 image under the leaf (d) x500 image of the stem.



Şekil 3. *Rubus canescens*’e ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x16 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x500 görüntü.

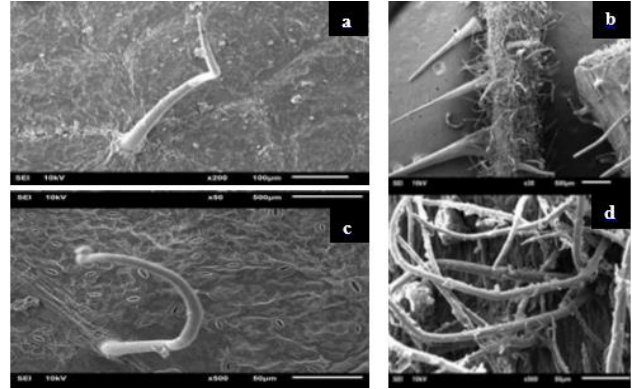
Figure 3. Micromorphological images of *Rubus canescens* (a) x200 image above leaf (b) stem x16 image (c) under leaf x500 image (d) stem x500 image.

Rubus canescens’in yaprak üst yüzeyinde seyrek basit tüyler, yaprak alt yüzeyinde ise sık kıvrık krispit tüyler ve stomalar görülmektedir. Gövde epidermis yapısına bakıldığında yoğun şekilde tüylerle kaplı olduğu ve oraksı orta tabanlı bir diken yapısı görülmektedir (Şekil 3). *Rubus caucasicus* türünün yaprak üst yüzeyinde tüylenme ve diken yapısına rastlanmazken, yaprak altında seyrek, basit, kıvrık tüyler ile stomalara rastlanmaktadır. Gövdede ise basit tüylenmeler ve yoğun bir şekilde düz uzun diken yapısı görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. *Rubus caucasicus*’a ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x30 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x500 görüntü.

Figure 4. Micromorphological images of *Rubus caucasicus* (a) x200 image on the leaf (b) x30 image of the stem (c) x500 image under the leaf (d) x500 image of the stem.



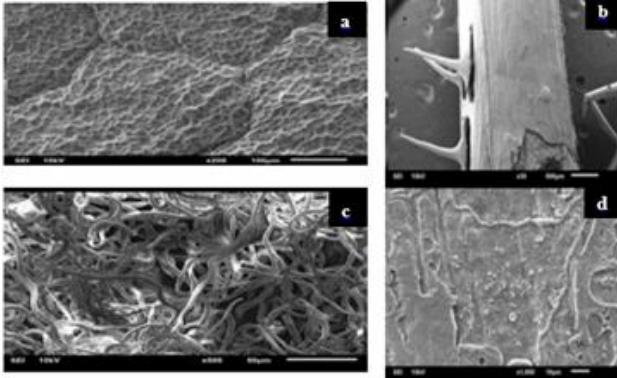
Şekil 5. *Rubus hirtus*’a ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x30 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x500 görüntü.

Figure 5. Micromorphological images of *Rubus hirtus* (a) x200 image on the leaf (b) x30 image on the stem (c) x500 image under the leaf (d) x500 image on the stem.

Rubus hirtus’un yaprak üst yüzeyinde seyrek basit tüyler, yaprak alt yüzeyinde ise üst yüzeyine oranla daha sık bir şekilde basit tüyler bulunduğu görülmektedir. Yaprak alt yüzeyindeki stoma yoğunluğu diğer türlere göre daha fazladır. Gövde epidermis yapısına bakıldığında oldukça dik uzun diken yapılarına rastlanmaktadır. Gövdeyi çok yoğun şekilde saran birbirine karışmış şekilde basit tüy yapısı bulunmaktadır (Şekil 5).

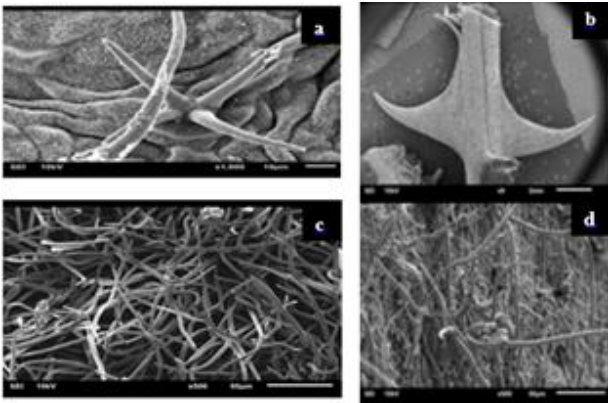
Rubus idaeus yaprak üst yüzeyinde herhangi bir tüy ve diken yapısı görülmemektedir. Yaprak alt yüzeyine bakıldığında diğer türlerden ayrılacak şekilde oldukça yoğun basit tüy yapısı görülmektedir. Stomalar görülemez. Yoğun tüy yapısının altında olduğu

düşünülebilir. Gövde epidermis yapısına bakıldığında tüy yapısı yok denecek kadar azdır. Seyrek diken yapısı görülmektedir ve dikenler kısa dik şekildedir (Şekil 6).



Şekil 6. *Rubus idaeus* ' a ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x30 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x1000 görüntü.

Figure 6. Micromorphological images of *Rubus idaeus* (a) x200 image on the leaf (b) x30 image of the stem (c) x500 image under the leaf (d) x1000 image of the stem.

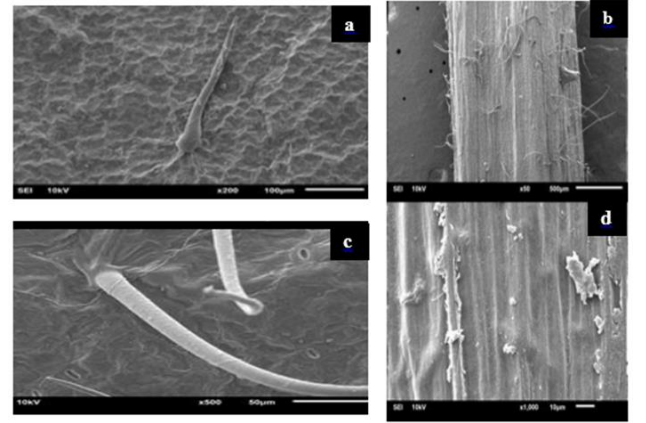


Şekil 7. *Rubus sanctus*' a ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x500 görüntü (b) gövde x9 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x500 görüntü.

Figure 7. Micromorphological images of *Rubus sanctus* (a) x500 image on the leaf (b) x9 image of the stem (c) x500 image under the leaf (d) x500 image of the stem.

Diğer türlerden farklı olarak yaprak üst yüzeyi tüylü olan *Rubus sanctus*'ta kalkık tüyler görülmektedir. Yaprak alt yüzeyine bakıldığında tüm yüzeyi kaplayan çok yoğun bir şekilde birbirine geçmiş tüy yapısı görülmektedir. Tüy yoğunluğundan dolayı tam tipi anlaşılacakla birlikte basit tüy olduğu anlaşılmaktadır. Gövdesinde ise diğer türlerden farklı olarak daha geniş tabanlı ve daha büyük bir diken yapısı görülmektedir ve tipi oraksıdır. Diken üzerinde de dahil olmak üzere tüm gövde kısa ve yoğun basit tüylerle kaplıdır (Şekil 7).

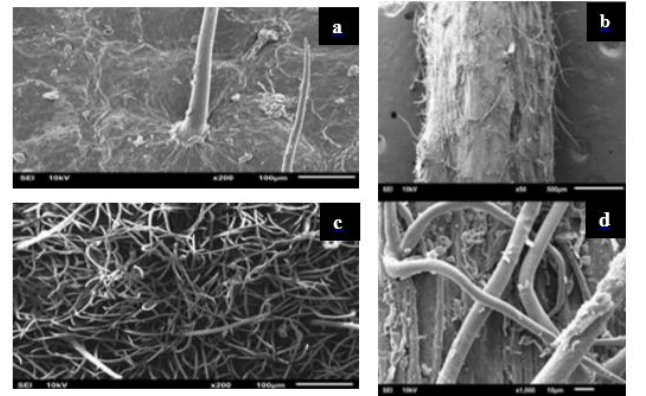
Rubus saxatilis'in yaprak üst ve alt yüzeylerinde seyrek basit tüyler görülmektedir. Yaprak alt yüzeyinde yer yer stomalara rastlanmaktadır. Gövde epidermis yapısına bakıldığında diken yapısı yok denecek kadar azdır ve çok ince seyrek basit tüyler bulunmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. *Rubus saxatilis*' e ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x50 görüntü (c) yaprak altı x500 görüntü (d) gövde x1000 görüntü

Figure 8. Micromorphological images of *Rubus saxatilis* (a) x200 image on the leaf (b) x50 image on the stem (c) x500 image under the leaf (d) x1000 image on the stem.

Rubus tereticaulis'in yaprak üst yüzeyinde seyrek basit tüyler, yaprak alt yüzeyinde ise tüm yüzeyi kaplayan çok yoğun şekilde birbirine geçmiş tüyler görülmektedir. Yaprak altında tüy yoğunluğundan dolayı tam tipi anlaşılacakla birlikte basit tüy olduğu anlaşılmaktadır. Gövde epidermis yapısına bakıldığında seyrek kalkık tüyler bulunmakla birlikte diken yapısı alınan görüntüde bulunmamaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. *Rubus tereticaulis*' e ait mikromorfolojik görüntüler (a) yaprak üstü x200 görüntü (b) gövde x50 görüntü (c) yaprak altı x200 görüntü (d) gövde x1000 görüntü.

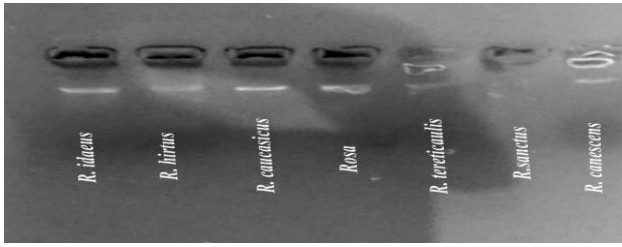
Figure 9. Micromorphological images of *Rubus tereticaulis* (a) x200 image on the leaf (b) x50 image on the stem (c) x200 image under the leaf (d) x1000 image on the stem.

Moleküler Bulgular: 2019 yılında yapılan arazi çalışmaları sonucu *Rubus* L. taksonlarının genomik DNA'ları daha önceki bölümde bahsedilen prosedüre göre çoğaltılmıştır. Şekil 10 bazı *Rubus* örneklerinin ITS bantlarının jel görüntülerini göstermektedir. Laboratuvar çalışmalarında aynı anda bantların jel görüntüleri elde edilemediğinden dolayı bir kısmı verilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda örneklere ait ITS dizileri uzunluklarının 709-731 bp arasında değişiklik gösterdiği; bütün ITS nükleotid uzunluğundaki G+C

içeriğinin ise, %55,26-56,92 arasında değiştiği bulunmuştur. G+C içeriği URL-2 'de verilen sayfada hesaplanmıştır. Her örnek için elde edilen ITS uzunluğu, G+C içeriği değerleri Tablo 6 'de verilmiştir. Bütün çalışılan örneklerin ITS bölgeleri arasındaki benzerlik ilişkileri Clustal W programından (URL- 1) yararlanılarak ortaya konmuştur (Şekil 11).

Şekil 10'a göre *Rubus hirtus* ile *Rubus tereticaulis*'in ve *Rubus idaeus* ile *Rubus caucasicus*'in arasındaki yakınlığın daha çok olduğu, *Rosaceae* familyasına en uzak taksonun ise *Rubus sanctus* olduğu ortaya konmuştur.



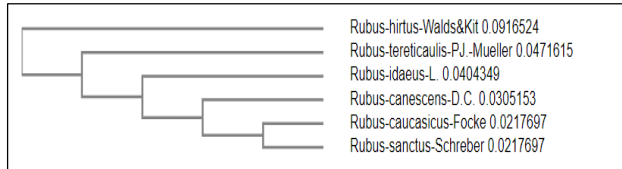
Şekil 10. Bazı Rubus örneklerinin ITS bölgelerine ait PZR bantları. (PCR amplicons of the ITS region of some Rubus species).

Figure 10. PCR bands of ITS regions of some Rubus samples. (PCR amplicons of the ITS region of some Rubus species).

Tablo 6. ITS PZR sonuçlarında elde edilen nükleotid uzunlukları ve G+C içeriği.

Table 6. Base lengths and GC contents of ITS-PCR.

Tür Adı	ITS Uzunluğu (bp)	G+C %
<i>Rubus hirtus</i>	710	56,90
<i>Rubus caucasicus</i>	714	56,44
<i>Rubus tereticaulis</i>	709	55,85
<i>Rubus sanctus</i>	712	56,04
<i>Rubus idaeus</i>	716	55,45
<i>Rubus canescens</i>	715	56,92



Şekil 11. ITS bölgelerinden CLUSTAL W ile yapılmış filogenetik ağaç.
Figure 11. Phylogenetic tree of ITS regions constructed with CLUSTAL W.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmayla Rize il'inde yayılış gösteren *Rubus* cinsine ait 8 türün olduğu görülmüştür. Morfolojik bulgular sonucunda *Rubus* cinsine ait 8 türün yaprak, meyve, diken, şekli, petal, yaprak ve yaprakçık ölçüsü, meyve tanelerinin yapısı, sayısı ve şekli, yaprak alt ve üst yüzey, petal yüzeyi tüylenme durumu, meyve ve sepallerin rengi, yaprak kenarı yapısı bakımından birbirinden ayrıldığı görülmüştür. Bu özelliklerin karakteristik olduğu belirlenmiştir.

Lokalite olarak bakıldığında *Rubus caesius*, *R. canescens*, *R. sanctus*, *R. tereticaulis*'in Türkiye yayılış haritasında Rize'de olmadığı belirtilmiş fakat yapılan

çalışmayla bu türlerin bu bölgede de yayılış gösterdiği kanıtlanmıştır.

Mikromorfolojik bulgular sonucunda bazı taksonlarda yaprak alt yüzeyinde stomaların bulunduğu bazıları ise bulunmadığı görülmektedir. *Rubus sanctus*'ta kalkık tüyler görülmektedir. *Rubus tereticaulis*, *R. sanctus*, *R. idaeus* türlerinin yaprak alt yüzeyinin diğer türlere nazaran daha yoğun tüylerle kaplı olduğu görülmüştür. Yine 8 tür arasında mikromorfolojik görüntülere bakıldığında gövde, yaprak tüylenmesi, tüy tipleri ve diken yapısının ayırıcı özellikte olduğu tespit edilmiştir.

Moleküler bulgulara göre *Rubus hirtus* ile *R. tereticaulis*, *R. idaeus* ve *R. caucasicus* arasındaki yakınlığın daha çok olduğu, *Rosaceae* familyasına en uzak taksonun ise *R. sanctus* olduğu ortaya konmuştur. *Rubus sanctus*'un en farklı tür olduğu ölçümler, diken ve tüy yapısı bakımından morfolojik ve mikromorfolojik resimlere bakıldığında da bulunan moleküler verileri desteklemektedir. Yine *Rubus hirtus* ile *Rubus tereticaulis* 'in yakınlığı sadece moleküler bulgulara göre değil, yaprak en-boy, filament boy, petal en-boy ölçümlerine bakılarak da görülebilmektedir. Bunun yanı sıra *Rubus idaeus* ve *Rubus caucasicus* arasındaki yakınlık gerek drupa sayısı gerek yaprak, petal vb. ölçülerde görülememektedir. Yapılan çalışmalar sonucu örnekler için ITS dizileri uzunlukları 709-731 bp arasında değişiklik gösterdiği; bütün ITS nükleotid uzunluğundaki G+C içeriği ise, %55,26-56,92 arasında değiştiği bulunmuştur.

Polat ve Göçmen (2008) tarafından yapılan çalışmada ahududu türleri incelenmiştir. Çalışma alanı olarak Karadeniz Bölgesi seçilmiştir. 15 ahududu tipi RAPD primeri kullanılarak DNA analizi yapılmış ve sonuç olarak genetik benzerliğinin %50 ve %98 arasında değiştiği ortaya konmuştur. Bu da Karadeniz Bölgesinde yayılış gösteren kırmızı ahududu tiplerinde genetik varyasyonun fazla olduğunu kanıtlamaktadır.

Eker ve Kolören (2017) tarafından yapılan çalışmada, Ordu ilinden *Rubus* cinsine ait 30 örnek toplanmış ve DNA izolasyon prosedürü olan Haymes (1996) CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Ribozomal RNA (rRNA) ITS gen bölgesi için, Gen Bankasından temin edilen referans sekans dizileri ile çalışmada elde edilen sekans sonuçları karşılaştırılmıştır. Dizilerin genetik uzaklıkları CLUSTAL W programı kullanılarak hesaplanmış ve bu veri setleri ile filogeni ağaçlarının çizimi yapılmıştır. Örnekler arasında on *Rubus* türü tespit edilmiştir. Örneklerinden 6 tane haplotip sonucu çıkmıştır. Bunlardan; Haplotip 1 (F3), Haplotip 3 (P2), Haplotip 4 (P5), Haplotip 5 (CM3, S1) ve Haplotip 6 (O1, CT1, CT2, CT3) %100 nükleotid dizisi benzerliği bakımından sırasıyla *R. sanctus*, *Rubus* sp., *R. divaricatus*, *R.*

conothyrsoides ve *R. capricollensis* ile yakın akraba olarak belirlenmiştir. Haplotip 2 (F6) ise, %99,8 nükleotid dizisi benzerliği bakımından *R. silvativus* ile yakın akraba olarak görülmüştür. Kullanılan teknikler çalışmamızla çok benzer olmakla birlikte incelenen taksonlar ve lokalite farklıdır.

Günay (2015) tarafından yapılan çalışmada maya suşlarının DNA dizi analizleri sonucuna göre nar meyvesinden ve ahududu meyvesinden maya izolasyonu yapılmıştır. Araştırmanın sonucuna bakıldığında nar meyvesi yüzeyinden izole edilen maya suşları *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus bestiolae*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida zeylanoides*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces lactis* ve *Metschnikowia* sp. türleriyle, ahududu meyvesinden izole edilen maya suşları ise *M. pulcherrima*, *A. pullulans*, *Candida* sp., *H. uvarum* ve *Metschnikowia* sp. türleri arasındaki homoloji oranı çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. API-ZYM test sistemi kullanılmış ve bunun neticesinde nar meyvesinden elde edilen maya türlerinin alkalın fosfataz, lösin arilamidaz, esteraz (C 4), esteraz lipaz (C 8), asit fosfataz, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz enzimlerinin; ahududu meyvesinden elde edilen maya türlerinde ise Lösin arilamidaz ve β - Glukosidaz enzimlerinin yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Allice ve Campbell (1999) tarafından yapılan çalışmaya göre Rosaceae familyasına ait *Rubus* ve *Dalibarda* L. cinslerinin ITS verilerine dayanarak filogenetik açıdan farklı olduğu fakat morfolojik olarak türdeş oldukları kabul edilmektedir. Yine bu çalışmada filogenetik ağaca bakıldığında *Rubus saxatilis* ve *Rubus idaeus*'un benzer oldukları ve *Rubus* türlerinin odunsudan otsuya geçişinde yaprakların da bileşik yaprakтан basit yaprağa doğru evrimleştiği ortaya konulmuştur.

Işık (2014) tarafından *Rubus* L. cinsi *Glandulosi* subseksiyonunda yer alan dört taksona (*R. tereticaulis*, *R. hirtus*, *R. platyphyllos* ve *R. caucasicus*) ait anatomik, morfolojik, palinolojik, fitokimyasal, sitogenetik, genetik ve ekolojik özellikler çalışılmıştır. İklimsel olarak bakıldığında *R. caucasicus* ve *R. platyphyllos*'un, yayılış alanlarında, diğer taksonlarla karşılaştırıldığında daha yüksek nem miktarına gereksinim duyduğu belirlenmiştir. ISSR tekniği kullanılarak yapılan DNA analizi sonucunda *R.hirtus* ve *R. platyphyllos* taksonlarının genetik olarak birbirine uzak, *R. hirtus*'un *R. tereticaulis*'e genetik olarak daha yakın olduğu görülmüştür. SEM yardımı ile *R. caucasicus* taksonuna ait polen görüntüleri alınmış ve bu taksonun trikolporat yapıda tipik Rosaceae polenlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Morfolojik çalışmalara bakıldığında ise Davis ve Meikle (1972), The Flora of Turkey and the East Egean Islands (1972) adlı eserinde tüy rengi ve boyu hakkında yeterli derecede aydınlatıcı bilgi olmadığı vurgulanmıştır. Tüy yapısı ve yoğunluğunun

Rubus taksonları için karakteristik olduğunu yaptığımız çalışma desteklemektedir.

TEŞEKKÜR

Bu makalenin FYL-2019-1010 nolu proje ile desteklenmesi sebebiyle BAP Birimi (Bilimsel Araştırma Projesi Birimi) 'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Aksoy, K.P. (2013).** Rize ili sınırları içerisinde yetişen *Sorbus L. (Rosaceae)* türlerinin ekolojik, morfolojik ve anatomik incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye, 178s.
- Atamov, V. & Çobanoğlu, M. (2019).** Floristic Diversity of Handüzü Natural Park and Environs, Turkey. *KSU J. Agric Nat*, 22(Suppl 1), 84-90.
- Batan, N., Atamov, V., Ekşi, S. & Erata, H. (2018).** Contribution to the bryophyte flora of the İkizdere district (Rize, Turkey), *Phytologia Balcanica* 24(1), 9-15.
- Baykal, H., Atamov, V. & Yüksek, T. (2018).** Tunca Vadisi Tabiat Parkı ve çevresinin florası (Ardeşen-Rize / Türkiye), *Biological Diversity and Conservation*, 11(2), 9-24.
- Baykal, H. & Atamov, V. (2018).** Flora of Isırlık natural park and environs (Rize-Turkey), *OT Sistemik Botanik Dergisi*, 25(2), 151-170.
- Çobanoğlu, M. (2012).** Güneysu-Çağrankaya Arası Bölgenin Flora ve Vejetasyonu. Yüksek Lisans Tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Rize, Türkiye, 178s.
- Davis, P.H. (1972).** Flora of Turkey and The East Aegean Island. *Edinburgh:University Press*, Edinburgh, 4, 540-41.
- Demir, E. & Atamov, V. (2019).** Galerüzü-Ceymakçur yaylaları (Çamlıhemşin / Rize) arasında kalan bölgenin florası. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 201-210.
- Demir, E. (2013).** Ayder-Cemakçur (Çamlıhemşin/Rize) Yaylalarının Florası ve Yöre Ballarının Kimyasal ve Palinolojik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize. Türkiye, 118s, 18-40.
- Eker, S. & Kolören, O. (2017).** Yabancı Otların Moleküler Teşhisinde ribozomal RNA (rRNA) internal transcribed spacer (ITS) gen bölgelerinin kullanımı. *Ordu Üniversitesi Bilim Teknik Dergisi*, 7(1), 11-21.

- Eksi, S. (2016).** *Çamlık ve Cimil Deresi (İkizdere/Rize) Çevresinin Briyofit Florası*. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize. Türkiye, 63s.
- Eminağaoğlu, Ö., Yılmaz, H., Aksoy, N., Ok, T., Fırat, M., Akyıldırım Beğen, H. & Akkemik, Ü. (2021).** Rosaceae. Şu eserde: Akkemik, Ü. (ed.). *Türkiye'nin Bütün Ağaçları ve Çaluları*. Türkiye İş Bankası Yayınları, 965-1125s.
- Gedik, Y. (2019).** *Samsun çevresinde yayılış gösteren bazı dikotil bitkilerin yaprakları üzerinde morfolojik, anatomik ve mikromorfolojik bir çalışma*. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye, 94s.
- Günay, M. (2015).** *Rubus idaeus L (Ahududu) ve Punica granatum L. (Nar) meyvelerinden izole edilen maya türlerinin moleküler düzeyde tanımlanması ve hücre dışı enzim aktivitelerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, Türkiye, 140s.
- Güner, A. (1984).** Rize Florasına Hazırlık I, Rize 'den Bitki Toplayanlar Listesi. *Doğa Bil. Derg.* 8(2), 278-281.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (2012).** *Türkiye bitkileri listesi (damarlı bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul. 1. Baskı, ISBN: 978-605-60425-7-7, 1290 s., 488-500.
- Güzel, M.E. (2018).** *Çeşitlilik merkezi GB Asya olan Lactucinae (Asteraceae) alt tribusunun Türkiye odaklı biyosistemik revizyonu*. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 355s.
- Haymes, K.M. (1996).** Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14(3), 280-284.
- Hekimoğlu, E. (2019).** *Endemik Lathyrus undulatus Boiss. (Fabaceae) türü üzerinde morfolojik, anatomik, palinolojik ve karyolojik araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi. Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye, 59s.
- Işık, G. (2014).** *Rubus L. cinsi Glandulosi subseksiyonunun ekolojik genetiği*. Doktora Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, 182s.
- Koday, Z. & Erhan, K. (2013).** Rize İlinin idari coğrafya analizi. *Atatürk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 50, 39-54.
- Kuyumcu, F. (2020).** *Rize İl Sınırları İçerisindeki Rubus L. (Rosaceae) Türlerinin Morfolojik, Mikromorfolojik ve Moleküler Sistemik Özelliklerinin Analizi*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize. Türkiye, 86s.
- Özler, C. (2017).** *Çamlıhemşin (Rize) yüksek dağ kesimlerindeki Trifolium L. (Fabaceae) cinsine ait bazı taksonların yem değerliliğinin (kaloriliğinin) araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 80 s.
- Polat, İ. & Göçmen, M. (2008).** Karadeniz Bölgesinden seçilen bazı kırmızı ahududu (*Rubus idaeus L.*) tiplerinin genetik farklılığının RAPD tekniği ile belirlenmesi, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2), 185-191.
- Sarıgül, A. (2018).** *Kaçkar Dağları Milli Parkı (Rize) Sınırları İçerisindeki Eğrelti Florası ve Taksonların Morfolojik ve Ekolojik Özellikleri*. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, s. 96, 25-85.
- Süzen, A. (2017).** *Ambarlık Yaylası (Çamlıhemşin / Rize)'nin Florası ve Vegetasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize. Türkiye, s. 160, 23-103.
- Toker, M.C. (2004).** *Bitki morfolojisi*. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, II. Baskı, Ankara, 140 s.
- URL-1, (2020).** <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>. (7 Ocak 2020).
- URL-2, (2020).** <http://www.endmemo.com/bio/gc.php>(7 Ocak 2020).
- Vural, M., 1996.** Rize'nin Yüksek Dağ Vegetasyonu. *Turkish Journal of Botany*, 20, 83-102.



Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı'nda Tespit Edilmiş Endemik Bitkiler ^[*]

Ömer EYÜBOĞLU*

Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, 40100, Kırşehir, Türkiye

Geliş Tarihi: 17.02.2022

Kabul Tarihi: 09.03.2022

Basım Tarihi: 31.03.2022

Atıf yapmak için: Eyüboğlu, Ö. (2022). Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı'nda Tespit Edilmiş Endemik Bitkiler. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 84-87.
How to cite: Eyüboğlu, Ö. (2022). Endemic Plants Detected in Kızılcahamam Soğuksu National Park. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 84-87.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4893-916X>

*Sorumlu yazarın:
Ömer EYÜBOĞLU
Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir Eğitim
Fakültesi, 40100, Kırşehir, Türkiye
✉: oeyuboglu@ahievran.edu.tr

Öz: Bu araştırma Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkının Florasını kapsamaktadır. Araştırma alanında toplanan 1064 bitki örneğinin değerlendirilmesi ile 74 familya, 276 cins, 474 tür, 4 alt tür, 3 varyete tespit edilmiştir. Toplam takson sayısı 481'dir. 49 tür Türkiye için endemiktir. Flora kayıtları ile ve daha sonraki yayınlara göre Ülkemizdeki endemik bitki sayısı 3000 civarında olup bunların bütün bitkilere oranı %33'tür. Türkiye endemik bitkilerin zenginliği açısından dünyanın önemli ülkelerinden birisidir. Mevcut flora ve faunayı korumanın en önemli yöntemi; Milli Park ve Tabiatı Koruma Alanlarının sayısını artırmaktır. Çünkü aşırı otlatma, tarla açma, çarpık kentleşme, turizm, erozyon vb. nedenlerle birçok endemik bitkilerimiz yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı'nda tespit edilen endemik bitkiler ülkemiz için Endemik bitkilerdir. Bu çalışma ile listesi oluşturulan endemik bitkiler ilerde ülkemiz için oluşturulacak endemik bitki haritasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Endemik bitki, kızılcahamam soğuksu milli parkı, koruma alanı.

Endemic Plants Detected in Kızılcahamam Soğuksu National Park

Abstract: This study covers the flora of Soğuksu National Park (Kızılcahamam). By evaluating 1064 plant samples collected in the research area, 74 families, 276 genera, 474 species, 4 subspecies and 3 varieties were determined. Total numbers of taxa are 481. 49 species are endemic for Turkey. According to the flora records and later publications, the number of endemic plants in our country is around 3000 and their ratio to all plants is 33%. Turkey is one of the most important countries in the world in terms of the richness of endemic plants. The most important method of preserving the existing flora and fauna; To increase the number of National Parks and Nature Protection Areas. Because overgrazing, field clearing, unplanned urbanization, tourism, erosion etc. For many reasons, many of our endemic plants are in danger of extinction. Kızılcahamam The endemic plants detected in Kızılcahamam Soğuksu National Park are endemic plants for our country. The endemic plants, the list of which was created with this study, will contribute to the endemic plant map that will be created for our country in the future.

*Corresponding author's:
Ömer EYÜBOĞLU
Ahi Evran University, Kırşehir Faculty of
Education, 40100, Kırşehir, Turkey
✉: oeyuboglu@ahievran.edu.tr

Keywords: Endemic plant, kızılcahamam soğuksu national park, protected area.

GİRİŞ

Türkiye floristik açıdan zengin ülkeler arasında yer almaktadır. Bu zenginliğin temelinde, coğrafi özelliklerin çeşitliliği ve üç floristik bölgenin de temsil edilmesi yatmaktadır. Bu bölgeler Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibirya flora bölgeleridir. Her flora bölgesi farklı iklim tiplerinin etkisi altında bulunduğu için farklı

vegetasyon tiplerine sahiptir. Araştırma alanı Avrupa-Sibirya ve İran-Turan fitocoğrafik bölgeleri arasında bir geçit zonu durumundadır. Alanın 800 hektarı ormanlık saha, 250 hektarı ise orman açıklıklarıdır.

Araştırma alanının florası hakkında yazar tarafından yapılan 'Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkının Florası' yüksek lisans tez çalışması yapılmıyaya kadar ayrıntılı bir araştırma yapılmamıştır (Eyüboğlu, 1991).

[*] Bu makale, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This manuscript was produced from master thesis..

Çalışma alanından toplanan bitki örnekleri Davis'in "Flora of Turkey" (Davis, 1965-88) adlı eserinde kullandığı grid sistemine göre A4 karesi içinde yer almaktadır. Bu çalışmada A4 karesi için yeni olan 37 bitki türü saptanmıştır. Araştırma alanı olarak seçilen Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı ormanlarının tamamı Ankara İli hudutları içerisinde olup 1050 hektarlık bir alanı kaplar. Bölge ormanlarının bulunduğu saha volkanik bir arazi parçası olup, civarında sıcak su kaplıcaları ile soğuksu kaynakları mevcuttur. Soğuksu Milli Parkı, 19.2.1959 tarih ve 6.KS.11-6885/13 sayılı yazısıyla, Orman Genel Müdürlüğü'nün teklifi ve Tarım Bakanlığının onayı ile kurulmuştur (OGM, 1989). Ankara ili Kızılcahamam ilçesi mülki hudutları dahilinde olup, 1050 hektarlık bir alanı kaplar. Ankara iline 80 km, Ankara – İstanbul asfaltına ise 3 km mesafede bulunmaktadır. Milli Park'ın 800 hektarı ormanlık, 250 hektarı ise açıklık sahadır. Milli Park sahasının 1/3'ü kullanma, 2/3'ü ise koruma sahası olarak ayrılmıştır.

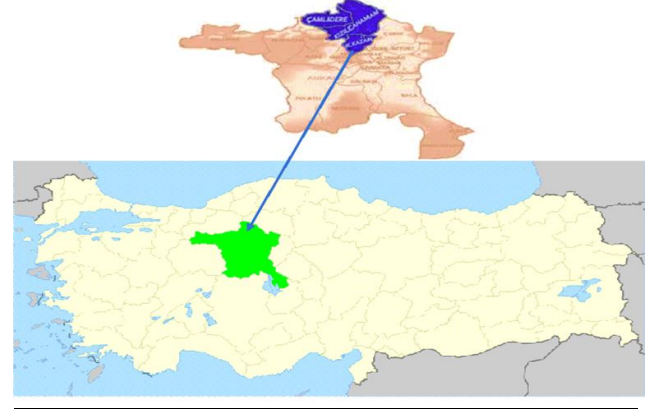
MATERYAL VE METOT

Araştırma materyali Yüksek Lisans Tezi kapsamında 1989-1990 yıllarında Mart ve Ekim ayları arasında 2 ve 3'er günlük gezilerle toplanmıştır. Alanın vejetasyonunu, topoğrafik yapısını belirleyen ve ilginç bazı bitkilere ait 36 renkli slayt filmi çekilmiştir. Arazi çalışmasında, bitkiyi tanımak, bitkinin varlığını kanıtlamak (bitkinin nerede ve ne zaman yetiştiğini öğrenmek), daha sonraki bitkilerle ilgili konularda çalışmak, bitkiye ulaşılmasının mümkün olmadığı zamanlarda elde hazır materyal bulunmasını sağlamak amacıyla toplanan bitkiler herbaryum tekniğine uygun olarak preslenerek kurutulmuştur.

Toplanan örnekler Flora of Turkey and the East Aegean Islands adlı eserden yararlanılarak adlandırılmıştır. Adlandırılmasında güçlük çekilen türler ise Flora Europaea (Heywood, vd., 1964-1981), Flora of Iraq (Evan & Townsend, 1968). The Genera of Flowering Plants (Hutchinson, 1964) adlı eserlerden yararlanılarak teşhis edilmiştir. Karakterlerin belirlenmesinde zorluk çekilen bazı türlerde Botanical Latin (Stearn, 1966), Vascular Plant Systematics (Radford, vd., 1974) adlı eserlerden faydalanılmıştır. Karesi için yeni olan türlerin tesbitinde A4 karesi ile ilgili yayınlardan (Donner, 1987; Erik, 1976; Erik v& Demirkuş, 1988; Evan, 1968; Greuter vd., 1989; Heywood, vd., 1964-1981; Heywood, vd., 1978; Hutchinson, 1964; Ketenoğlu & Aydoğdu, 1987) yararlanılmıştır. Bitki örneklerinin toplandığı çalışma alanı Şekil 1 ' de verilmiştir.

Adlandırılan bitki örnekleri daha sonra sırasıyla aileye, cins ve tür düzeyinde sınıflandırılmış ve kartonlara yapıştırılmıştır. Ayrıca varsa eş örnekleri

ayrılmıştır. Bitkiler Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi herbaryumunda saklanmaktadır. Bitki listesi yazılırken sırasıyla önce cins adı, sonra tür adı varsa tür altı takson adları verilmiştir.



Şekil 1. Arazi çalışmasının yapıldığı alan (Ankara İli Kızılcahamam İlçesi, Soğuksu Milli Parkı).

Figure 1. The area where the fieldwork was carried out (Ankara Province Kızılcahamam District, Soğuksu National Park).

BULGULAR

Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı' n da tespit edilen endemikler, Ülkemiz için endemik olan türlerdir (Tablo 1). Lokalite yazılırken, alanın tamamı A4 Karesi, Ankara İli Kızılcahamam İlçesi, Soğuksu Milli Parkı dahilinde olduğu için tekrardan kaçınmak amacı ile bu bilgiler yazılmamıştır. Ancak mevkii veya yer adı, habitat, yükseklik, toplama tarihi, toplayıcının isminin baş harfleri ve numarası yazılmıştır.

Tablo 1. Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkı' nda tespit edilen endemikler
Table 1. Endemics detected in Kızılcahamam Soğuksu National Park

<i>Divisio</i> : SPERMATOPHYTA	
<i>Subdivisio</i> : GYMNOSPERMAE	
1	PINACEAE
<i>I-ABIES</i> Miller	
1. A.nordmanniana (Stev.) Spach.	
Subsp. bornmuelleriana (Mattf.) Coode et Cullen	
Göllü civarı, 1600 m, I.VIII.1989, Ö.E. 1134, Endemik, öksin element.	
<i>Subdivisio</i> : ANGIOSPERMAE	
<i>Classis</i> : DICOTYLEDONES	
2.	PAPAVERACEAE
<i>I-PAPAVER</i> L.	
1. P.apokrinomenon Fedde	
Göllü civarı, ca. 1600 m, 15.VIII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1808,	
3.	BRASSICACEAE(=CRUCIFERAE)
<i>I-ISATIS</i> L.	
1. Subsp. Alyssifolia (Boiss.) Davis Çakmaklı civarı yol kenarı, 1400-1450 m, 14.VII.1990, Ö.E. 1725	
2. <i>BARBAREA</i> R.Br.	
1. B.trichopoda Hausskn. Soğuksu deresi civarı, 1050 m, 23.V.1990, Ö.E. 1391.	
3. <i>ERYSIMUM</i> L.	
1. E.eginense Hausskn. Ex Bormm.Tensil sahası, ca. 1500 m, 15.VII.1990, Ö.E. 1812 (Det. H.Duman).	
4.	CISTACEAE
<i>I-HELIANTHEMUM</i> Adams.	
1. H. Nummularium (L.) Miller subsp. lycanicum Coode et Cullen	
Kara tepe, sü deposu civarı, 1150 m, 10.VI.1990, Ö.E. 1593; Göl deresi civarı, ca. 1350 m, 11.VI.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1614; Tensil sahası, ca. 1500 m, 9.VII.1990 Ö.E. 1941.	
5.	CARYOPHYLLACEAE

1.	ARENARIA L. 1. A.ledebouriana Fenzl. var. Ledebouriana Yanık sırtı civarı, 1300 m, 25.VIII.1989, meşelikler, Ö.E. 1232; İncegeliş civarı, 1600 m, 25.VIII.1989, orman açıklıkları, Ö.E. 1235; Tensil sahası, ca. 1500 m, 15.VII.1990, Ö.E. 1816, 2. DIANTHUS L. 1. D.ancyrensis Hausskn. Et Bornm. Kaya beleni tepe, 1350 m, 15.VII.1990, kayalık yamaçlar, Ö.E. 1845; Göllü mevki, 1630 m, 31.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1891; Çakmaklıın Doruk tepe, 1530 m, 31.VII.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1069. 2. D.lydus Boiss. Yanık sırtı, 1200 m, 11.VI.1990, meşelik, Ö.E. 1642. Endemik 3. SAPONARIA L. 1. S.chlorifolia Kunze Belediye kaplıcaları, üst yamaçları, 1300 m, 30.V.1990, 1533; Tensil sahası, 1500 m, 19.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1937; Cehennem deresi, 1050 m, 1.VIII.1990, taşlı yerler, Ö.E. 2007.
6.	HYPERICACEAE (GUTTIFERAE) 1. HYPERICUM 1. H.heterophyllum Vent. Kal tepe, ca. 1250 m, 18.VII.1990, kayalık yamaçlar, Ö.E. 1890; Yanık sırtı, 1300 m, 25.VIII.1989, step, ö.E. 1221
7.	FABACEAE (LEGUMINOSAE) 1. ASTRAGALUS L. 1. A.coodei Chamb. & Matthews Tolubelen, 1630 m, 23.V.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1386, Çakmaklı, ca. 1500 m, 2.6.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1564 (Det. Z.Aytaç). 2. A.brachypterus Fischer Göllü, 1600 m, 1.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1107; İncegeliş, ca. 1500 m, 15.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1795. Endemik. Ir.-Tur. element. 3. A.mitcheliani Boiss. İncegeliş, ca. 1500 m, 15.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1799. Endemik. Kare için yeni. 2. VICIA L. 1. V.caesarea Boiss. et Bal.Kel tepe, 1350 m, 30.V.1990, hareketli-taşlı yamaçlar, Ö.E. 1462; Cehennem deresi, ca. 1050 m, 18.VII.1990, hareketli-taşlı yamaçlar, Ö.E. 1878. 3. LATHYRUS L. 1. L.czeczzotianus Bässler, anık sırtı, ca. 1200 m, 12.V.1990, orman açıklıkları, Ö.E. 1307; Göl deresi, ca. 1200 m, 26.VI.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1708. 4. TRIFOLIUM L. 1. T.caudatum Boiss. Belediye kaplıcaları civarı, ca. 1250 m, 30.V.1990, taşlık-çalılık yamaçlar, Ö.E. 512; Göl deresi, ca. 1350 m, 11.VI.1990, P.nigra ormanlığı, Ö.E. 1613. 2. T.pannonicum Jacq. subsp. elongatum (Willd.) Zoh. Tolubelen, ca. 1650 m, 23.V.1990, orman açıklıkları, Ö.E. 1399; Çakmaklı, su deposu civarı, ca. 1400 m, 14.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1772. 5. MELILOTUS L. 1. M.bicolor Boiss. et Bal. Yanık sırtı, ca. 1250 m, 12.V.1990, orman açıklıkları, Ö.E.1313.
8.	ROSACEAE 1. CRATAEGUS L. 1. C. x bornmuelleri Zabel, Kuzucapınar, ca. 1250 m, 3.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E.1143; Tolubelen sırtı, ca. 1770 m, 13.X.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1262; Yanık sırtı, 1050 m, 26.VI.1990, kayalık yerler, Ö.E. 1687.
9.	CRASSULACEAE 1. SENPERVIVUM L. 1. S.armenum Boiss. et Huet var. insigne Muirhead Cehennem deresi, 1050 m, 18.VU.1990, kaya üzeri, Ö.E. 1869. İncegeliş sırtı, ca. 1570, 9.VIU.1990, orman açıklığı, Ö.E. 2043,
10.	APIACEAE (UMBELLIFERAE) 1. PRANGOS Lindl. 1. P.meliocarpoides Boiss. var. Meliocarpoides Yanık sırtı, ca. 1400 m, 12.V.1990, orman açıklığı, taşlı yerler, Ö.E. 1354. 2. HERACLEUM L. 1. H.platytaenium Boiss. Yanık sırtı civarı, 1150-1200 m, 14.VII.1990, yol kenarı, Ö.E. 1741
11.	CAPRIFOLIACEAE 1. LONICERA L. 1. L.caucasica Pallas subsp. orientalis (Lam.) Chamb. et Long. Çakmaklı tepe, 1530 m, 31.VII.1990, yol kenarı, Ö.E. 1098; Göllü, 1600 m, 1.VIII.1989, yol kenarı, Ö.E. 1128.
12.	ASTERACEAE (COMPOSITAE) 1. ANTHEMIS L. 1. A. wiedemanniana Fisch. et Mey. Kel tepe, ca. 1350-1400 m, 30.V.1990, orman açıklığı, Ö.E.1478. Endemik. 2. ACHILLEA L. 1. A.teretifolia Willd. Kel tepe civarı, ca. 1300-1350 m, 18.VII.1990, kayalık yamaçlar, Ö.E. 1892; Tensil sahası, 1500 m, 19.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1936. 3. JURINEA Cass. 1. J.pontica Hausskn. et Freyn İncegeliş-Göl deresi arası, 1400-1450 m, 9.VIII.1990, yol kenarı, Ö.E. 2047. 4. HERACIUM L. 1. H.paphlagonicum Freyn et Sint. Tensil sahası, 1500 m, 19.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E.1930.
13.	CAMPANULACEAE 1. CAMPANULA L. 1. C.lyrata Lam. subsp. lyrata Kel tepe civarı, ca. 1350-1400 m, 29.V.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1414. 2. C.argaea Boiss. et Bal. Kayabeleni tepe civarı, 1350 m, 15.VII.1990, kaya üzeri, Ö.E. 1848; Kel tepe

	civarı, ca. 1200-1250 m, 18.VII.1990, kayalıklar, Ö.E. 1901. 3. C.pteroaula Hausskn. Yanık sırtı, 1100 m, 14.VII.1990, ö.E. 1730, yol kenarı.
14.	BORAGINACEAE 1. PARACARYUM (DC.) Boiss. 1. P.calycinum Boiss. & Bal. Kel tepe civarı, ca. 1350-1390 m, 29.V.1990, orman Ö.E. 1416; Yanık sırtı, ca. 1250-1300 m, 11.VL1990, yamaçlar, Ö.E. 1639 2. P.ancyritanum Boiss. Yanık sırtı, ca. 1350-1400 m, 12.V.1990, yol kenarı, Ö.E.1316. 2. ONOSMA L. 1. O.isauricum Boiss. et Heldr. Yanık sırtı ca. 1350-1400 m, 12.V.1990, yol kenarı, Ö.E.1315; Kel tepe civarı, ca. 1350-1400 m, 29.V.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1418; Göllü civarı, ca. 600-1630 m, 15.VII.1990; yol kenarı, Ö.E. 1793.
15.	SCROPHULARIACEAE 1. VERBASCUM L. 1. var. occidentale Hub.-Mor. Göllü civarı, 1600-1630 m, 1.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E.1110. Ir.-Tur. element. Endemik 2. V.insulare Boiss. et Heldr. Çakmaklı civarı, 1500-1530 m, 2.VI.1990, yol kenarı, Ö.E.1560. 2. LINARIA Miller 1. L.genistifolia (L.) Miller subsp. confertiflora (Boiss.) Davis Çakmaklıın Doruk tepe, 1500-1530 m, 31.VII.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1062; İncegeliş-Göllü arası, 1600-1650 m, 13.X.1989. Yol kenarı, Ö.E. 1246; Milli Park girişi yol kenarı 1060-1060 m, 1.VIII.1989, Ö.E. 2012. 3. DIGITALIS L. 1. D.lamarckii Ivan İncegeliş civarı, 1600 m, 25.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E.1241; Tensil sahası, 1500-1530 m, 15.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1810; 1050-1070 m, 1.VIII.1990, yol kenarı, Ö.E. 2014. 4. VERONICA L. 1. V.multifida L. Yanık sırtı, 1300-1400 m, 12.V.1990, yol kenarı, Ö.E.1319; Tensil sahası, 1450-1500 m, 19.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E.1955.
16.	LAMIACEAE (LABIATAE) 1. PHLOMIS L. 1. P.armeniaca Willd. İncegeliş civarı, 1500-1600 m, 15.VII.1990, yol kenarı, Ö.E. 1827 2. BALLOTA L. 1. B.nigra L. subsp. anatolica P.H. Davis Soğuksu deresi, ca. 1060 m, 3.VIII.1989, taşlı yerler, Ö.E.1192. 3. SIDERITIS L. 1. S.germanicopolitana Bornm. subsp. germanicopolitana Kayabeleni tepe civarı, 1250-1300 m, 15.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1841; Tensil sahası, 1450-1500 m, 19.VII.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1929.
17.	RUBIACEAE 1. CALIAM L. 1. G.fissurense Ehrend. et Schönb. Göllü civarı, 1600-1630 m, 1.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1127. 2. G.penduliflorum Boiss. Kara tepe, 1200-1250 m, 30.V.1990, tel örgü civarındaki çalılıklar, Ö.E. 1546. Classis: MONOCOTYLEDONES
18.	LILIACEAE 1. LILIAM L. 1. A.huber-morathii Kollmann, N.Özhatay & Koyuncu İncegeliş civarı, 1550-1600 m, 25.VIII.1989, orman açıklığı, Ö.E. 1242; Kel tepe civarı, 1350-1400 m, 30.V.1990, orman açıklığı, Ö.E. 1470 (Det. H.Koyuncu). 2. MUSCARI Miller 1. M.aucherii (Boiss.) Baker Yanık sırtı civarı, 1200-1250 m, 31.III.1990, orman açıklığı, taşlı yamaçlar, Ö.E. 1295, Kara tepe, 1100-1150 m, 30.V.1990, açık alanlar, Ö.E. 1536. 3. TULIPA L. 1. T.sintensis Baker Çakmaklı civarı, 1400-1450 m, 12.V.1990, orman açıklıkları, yamaçlar, Ö.E. 1359
19.	IRIDACEAE 1. CROCUS L. 1. C.ancyrensis (Herbert) Maw. Yanık sırtı, 1350-1400 m, 18.III.1990, P.nigra açıklıkları, çalılıklar, Ö.E. 1282. 2. C.biflorus Miller subsp. pulchricolor (Herbert) Mathew İncegeliş civarı, 1400-1450 m, 18.III.1990, P.nigra açıklıkları, Ö.E. 1283
20.	POACEAE (GRAMINEAE) 1. FESTUCA L. 1. F.callieri (Hackel) F.Markgraf subsp. zederbaueri Markgr.-Dannenb. Soğuksu Milli Parkı, 1050-1100 m, 14.VII.1990, yol kenarı, Ö.E. 1765.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu araştırmanın sonuçları, toplanan 1064 bitki örneğinin incelenmesine, arazi gözlemlerine, konuyla ilgili literatür bilgisinin derlenmesine dayanmaktadır. Bitki örneklerinin adlandırılması sonucu 74 familyaya ait 276 cins, 474 tür, 4 alttür, 3 varyete olmak üzere toplam 481 takson tespit edilmiştir. 474 türün 49'u (%10,6) endemiktir. Toplanan bitkilerden 2 tür *PTERIDOPHYTA*, 472 tür ise *SPERMATOPHYTA*, Divisio'suna aittir. Alanımızda en

yaygın türe sahip bitki coğrafyası bölgesi Avrupa-Sibirya (82 tür) diğerleri de sırasıyla İran-Turan (76 tür) ve Akdeniz (31 tür) bölgesidir. 292 tür ise ya geniş yayıllı veya bölgesi belli olmayanlardır. Türlerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımı Tablo 2' de, çalışma alanımızda en çok tür içeren ilk 10 familya Tablo 3' te verilmiştir.

Tablo 2. Türlerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımı.

Table 2. Distribution of species according to phytogeographic regions.

Fitocoğrafik Bölge	Tür Sayısı	Oran %
Avrupa-Sibirya	71	14,8
Karadeniz	11	2,3
İran-Turan	76	15,8
Akdeniz	31	6,5
Çok bölgeli ve bilinmeyenler	292	60,6

Tablo 3. En çok tür içeren ilk 10 familya.

Table 3. Top 10 families with the most species.

Familya Adı	Tür sayısı	Toplam Tür Sayısının Oranı %
Asteraceae	55	11,6
Fabaceae	50	10,6
Poaceae	31	6,6
Lamiaceae	27	5,7
Brassicaceae	24	5,0
Rosaceae	24	5,0
Caryophyllaceae	23	4,9
Apiaceae	26	4,9
Boraginaceae	16	3,4
Scrophulariaceae	16	3,4
Toplam	289	61,1
Kalan 63 Familya	185	38,9

Araştırılan alandan elde edilen sonuçlarla, alana yakın yerlerde daha evvel yapılan araştırma sonuçlarının (Akman,1974;Akman &Aydoğdu, 1986) karşılaştırılmasında en zengin türe sahip familya Asteraceae familyasıdır. *Fabaceae*, *Poaceae*, *Lamiaceae* ve *Brassicaceae* tür sayısı açısından zengin ilk 5 familya olup alanda en çok türe sahip cins 11 tür ile *Vicia'dir*. İkinci *Trifalium*, üçüncü *Silene*, dördüncü *Sedum*, besinci sırayı da *Campanula* almaktadır. İlk 10 sıraya giren familyalarda alanımızla diğer alanlar arasında sıralama değişmekle birlikte, isimler uygunluk göstermektedir. İlk 5 sırayı alan familya isimleri genellikle birbirinin aynı olmakla birlikte sıralamada bazı değişiklikler olabilmektedir. Ancak Gerede-Aktas civarı ile Kızılcahamam-Kargasekmez'de yapılan araştırmalarda *Scrophulariaceae* familyası sırasıyla 3 ve 5. sırayı almıştır. Bu familya alanımızda 10. sıradadır. Alanımızda en çok türe sahip cins 11 tür ile *Vicia'dir*. Alanımızda orman açıklıkları ve tensil sahası bulunması, bu tip ortamlarda yaygın olan bu cinsin zenginliğinin sebebidir. Zengin cinsler açısından ilgi çekici bir durum da *Sedum'da* görülmektedir. Bu cins hem alanımız da hem de alana hemen yakın benzer olan Gerede-Aktas'da 4. sırada yer almıştır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile bir Milli Parkımızdaki endemik bitki türleri tespit edilmiş olup

Ankara İlimiz için ileri de tüm endemik bitki türlerinin belirlenmesine katkı sağlayacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akman, Y. (1974).** Contribution a l'étude de la flore de la region de Beypazarı Karaşar et de Nallıhan Comm. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, **18**, 8-9.
- Akman, Y. & Aydoğdu, M. (1986).** A phytosociological study in the vicinities of Çamlıdere Çamkoru and Peçenek. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, **4**, 9-19 .
- Davis, P.H. (1965-1988).** Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh, Univ.Press, Vol:1, 1-10.
- Donner, J. (1987).** Verbreitungskarten zu P.H. Davis, Flora of Turkey, 9. *Linzer Biologische Beiträge*, **19**(1), 3-16
- Erik, S. (1976).** New Plant Species in A4 Grid Determined in Ankara, Karagöl (Çubuk) Environs and Central Anatolia Region, *Bitki*, **3**(3), 270-276 .
- Erik, S. & Demirkuş, N. (1988).** New Distribution Areas of Some Plants in Flora of Turkey. *Nature, Botany*, **12** (3), 224-233.
- Evan, G. (1968).** *Flora of Iraq*. Gramineae, Vol. 9, 588 pp.
- Evan, G. & Townsend, C.C. (1968).** *Flora of Iraq*. Baghdad, Vol. 9.
- Eyüboğlu, Ö. (1991).** Kızılcahamam Soğuksu Milli Parkının florası. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 69s.
- Greuter, W., Burdet, H.M. & Long, G. (eds.) (1989).** Med-checklist. *Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève*, **4**, 1-458.
- Heywood, V.H. & Tutin, G.T. (ed.) (1964-1981).** *Flora Europaea*, Cambridge Univ. Press, Vol: I-V .
- Heywood, V.H. (Ed.). (1978).** *Flowering Plants of The World*. London: Oxford Univ. Press.
- Hutchinson, J. (1964).** The Genere Of Flowering Plants (Angiospermae). *Dicotyledones*, Vol. 1.
- Ketenöglü, O. & Aydoğdu, M. (1987).** Anadolu'dan (A3, A4, A5) yeni floristik kayıtlar. *Doğa Türk Botanik Dergisi*, **11**(1), 87-93.
- OGM. (1989).** Ankara Orman Bölge Müdürlüğü, Kızılcahamam Orman İşletme Müdürlüğü "Soğuksu Milli Parkı Bölge Şefliği Milli Park özel Amenajman Planı" Ankara
- Radford, A.E., Dickison, W.C., Massey, J.R. & Bell, C.R. (1974).** *Vascular plant systematics*. Harper & Row. New York, NY.
- Stearn, T.W. (1966).** *Botanical Latin*. Edinburg London, 566pp.



Molecular Phylogeny and Historical Biogeography of *Petroleuciscus* (Teleostei: Leuciscidae) Species in Turkey

Gökhan KALAYCI*

Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of Fisheries, Department of Basic Sciences, 53100, Rize.

Received: 28.02.2021

Accepted: 24.03.2022

Published: 31.03.2022

How to cite: Kalayci, G. (2022). Molecular Phylogeny and Historical Biogeography of *Petroleuciscus* (Teleostei: Leuciscidae) Species in Turkey. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 7(1), 88-95.

Atf yapmak için: Kalayci, G. (2022). Türkiye'deki *Petroleuciscus* (Teleostei: Leuciscidae) Türlerinin Moleküler Filogenisi ve Tarihsel Biyocoğrafyası. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 7(1), 88-95.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1255-496X>

***Corresponding author:**

Gökhan KALAYCI
Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of
Fisheries, Department of Basic Sciences,
53100, Rize.
✉: kalayci@okhan@gmail.com

Abstract: Palaearctic leuciscid genus *Petroleuciscus* is a poorly known genus and molecular phylogeny and historical biogeography is not known well. In this study, phylogenetic relationships of *Petroleuciscus* species in Turkey were investigated by analyzing mitochondrial cytochrome b (cyt b) gene sequences (1140 bp). For this purpose, cyt b gene of 84 samples from 13 populations of the species were sequenced. Twenty-one haplotypes were identified and overall average haplotype diversity (Hd) was calculated as 0.921 ± 0.011 . The result of phylogenetic analysis of *Petroleuciscus* species shows the presence of two clades and four haplogroups. First clade includes *Petroleuciscus smyrneaus* and *P. ninae* from the Western Anatolia. Second clade indicated that *P. borysthenicus* consists of the Black Sea and the Marmara Sea drainages and northern part of the Aegean Sea drainages. Haplotype network analysis, phylogenetic and phylogeographic inference show that *Petroleuciscus* genus was monophyletic in Turkey, and its species scattered in the Miocene era.

Keywords: cyt b, genetic diversity, leuciscids, mtDNA, phylogeography.

Türkiye'deki *Petroleuciscus* (Teleostei: Leuciscidae) Türlerinin Moleküler Filogenisi ve Tarihsel Biyocoğrafyası

Öz: Palaearktik leuciscid cinsi *Petroleuciscus*, az bilinen bir cins olup moleküler filogenisi ve tarihi biyocoğrafyası iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada, Türkiye'deki *Petroleuciscus* türlerinin filogenetik ilişkileri mitokondriyal sitokrom b (cyt b) (1140 bp) geni kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, 13 populasyondan 84 örneğin cyt b geni dizilenmiştir. Genetik analizler sonucunda 21 haplotip tanımlanmış ve haplotip çeşitliliği Hd: 0.921 ± 0.011 olarak hesaplanmıştır. *Petroleuciscus* türlerinin filogenetik analizinin sonucunda ise, iki klad ve dört haplogrup varlığı ortaya çıkmaktadır. Birinci klad, Batı Anadolu'dan *Petroleuciscus smyrneaus* ve *P. ninae*'den oluşmaktadır. İkinci klad ise, *P. borysthenicus*'un Karadeniz ve Marmara Denizi havzasından ve Ege Denizi'nin kuzey sularından oluştuğunu ortaya çıkarmaktadır. Haplotype ağ analizi, filogenetik ve filocoğrafik çıkarım, Türkiye'deki *Petroleuciscus* cinsinin monofiletik olduğunu ve türlerinin Miyosen çağında dağıldığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: cyt b, filocoğrafya, genetik çeşitlilik, leuciscidler, mtDNA.

***Sorumlu yazar:**

Gökhan KALAYCI
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su
Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü,
53100, Rize.
✉: kalayci@okhan@gmail.com

INTRODUCTION

The members of genus *Petroleuciscus* are widely distributed in European rivers, having highest diversity particularly in the Balkan area and the southern European region. Their adults exist in lowland rivers, lakes, limans,

deltas, lower parts of montane rivers, and backwaters. They can tolerate low oxygen concentrations and slightly brackish water. Nowadays, some populations are exposed to sharp decline due to river beds channelization and flood-

plains drainage. Palaearctic leuciscid genus *Petroleuciscus* was described by Bogutskaya, (2002). This genus is phenotypically and genetically distinct from sister group *Squalius* (Perea et al. 2010; Schönhuth et al. 2018). Up to now from its identification, *Petroleuciscus* genus is exposed to some taxonomic revisions, which are summarized by Freyhof et al., (2018). Now the genus *Petroleuciscus* consists of six species as *P. borysthenticus* (Kessler, 1859); *P. smyrnaeus* (Boulenger, 1896), *P. ninae* Turan, Kalaycı, Kaya, Bektaş & Küçük, 2018, *P. squaliusculus* (Kessler, 1872), *P. ulanus* (Günther, 1899) and *P. ahipsi* Aleksandrov, 1927.

Petroleuciscus borysthenticus is distributed in Eurasia: Eastern, northern, and western, Black Sea and Azov Sea basins, from eastward in Europe to northwestern Turkey. *P. smyrnaeus* is distributed in Asia and Europe: Lesbos Island in Greece and Aegean drainages of southwestern Turkey, Gediz River drainages (the northern Aegean Sea basin). *P. ninae* is distributed in Büyük Menderes drainage (the southern Aegean Sea basins). *P. squaliusculus* is distributed in Syr Darya drainage, Kyrgyzstan, Kazakhstan, and Tajikistan. *P. ulanus* is distributed from Orumeyeh Lake in Iran. Lastly, *Petroleuciscus ahipsi* is found in Kuban drainage, Russia (Bogutskaya, 1996; Froese & Pauly 2022; Turan et al., 2018).

Main factor of Leuciscinae distribution in the Europe is Pleistocene glaciations and Danube basin, which is glacial refuge that is origin of some leuciscine taxa after colonization. Additionally, in the formation of freshwater ichthyofauna, Black sea rivers also could have behaved as glacial refuge (Kotlík et al. 2004; Perea et al. 2010). Sanjur et al., (2003) pointed out that *Squalius borysthenticus* and *Squalius smyrnaeus* are paratethyan origin and distributed around the ancient Paratethys Sea cohort to Doadrio and Carmona, (1998) and Zardoya et al., (1999).

Some phylogenetic and taxonomic studies were carried on the leuciscids in Turkey. Phylogenetic relationships of 190 European leuciscid species were investigated based on cytochrome b (cyt b) sequences and dispersal of species base Messinian period (Levy et al. 2009). Phylogenetic relationships between *Alburnoides* species revealed by Bektas et al. (2019) indicate that Turkish populations dispersed tectonic faulting and uplift Miocene aged as well as climatic variation and change in sea-level during late Miocene-middle Pleistocene. Namely, cyt b gene has been proven as an useful DNA markers for studying the systematics and phylogenetic of Leuciscidae and its congeners (Aksu & Bektaş 2019; Bektas et al. 2017; Durand et al. 2000; Durand, et al. 2002; Bektas et al. 2017; Durand et al. 2000; Durand, et al. 2002; Kuyumcu et al. 2021; Levin et al. 2012; Tsigenopoulos et al. 2002; Zardoya & Doadrio 1999).

Some *Petroleuciscus* samples were studied by Durand et al. (2000), Perea et al. (2010), Geiger et al. (2014), Freyhof et al. (2018) and Turan et al. (2018), but only one of these studies (Turan et al., 2018) is included limited COI barcoding data for all *Petroleuciscus* species distributed in Turkey for genetic assignment of species. Hence, as stated by Perea et al. (2010) *Petroleuciscus* genus is a still poorly known genus and real taxonomy is not known well.

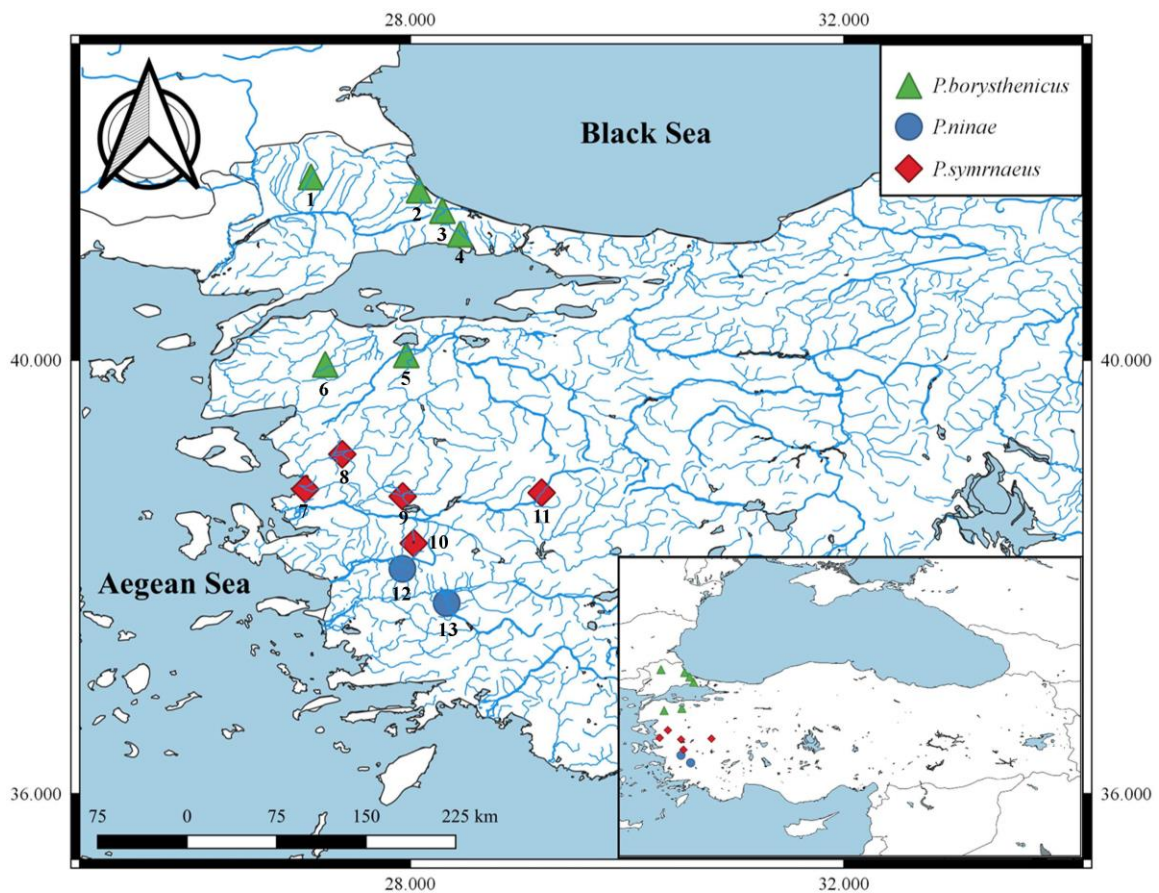
Considering that three of the six species of the genus *Petroleuciscus* are distributed in Turkey, to reveal the phylogenetic relationships of species distributed in Turkey is very important to determine systematic position and phylogeographic history of the *Petroleuciscus*. Unfortunately, previous studies were not adequate to reveal the phylogenetic, phylogeographic relationships and specification of *Petroleuciscus* distributed in Turkey. For this reason, in this study, we aimed to investigate phylogenetic relationships and delineate phylogeographic history of *Petroleuciscus* genus in Turkey.

MATERIAL AND METHOD

Sample collection, DNA Extraction and Sequencing: Three *Petroleuciscus* species of Turkey were collected from 13 sampling sites and 84 specimens from drainages of the Black Sea, the Aegean Sea, and the Marmara Sea basin (Table 1, Figure 1). Note that some samples were also used Turan et al., (2018). The care of experimental animals was consistent with Republic of Turkey animal welfare laws, and guidelines. Fishes were collected, surgical procedures were only performed for excision of fin clips after anaesthesia by using MS222, and then the fin clips preserved in 70% ethanol for DNA extraction. Total DNA was extracted from fin clips via Qiacube automated DNA/RNA purification system using Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Germany). The quality and quantity of DNA were checked on both the NanoDrop 2000/c spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and 0.8% agarose gel electrophoresis. Mitochondrial cytochrome b (cyt b) gene (1141 bp) was amplified by primer set B-cytbF (5'-GAAGAACCACCGTTGTWVTTCAAC-3') and the B-cytbR (5'-CGGATTACAAGACCGATGC-3') following the protocol and conditions described in Kalaycı, (2022). The PCR products were run 1% agarose gel electrophoresis and visualized under UV Quantum-Capt ST4 system (Vilber Lourmat, France). PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and bidirectional sequencing of PCR products was performed with an ABI PRISM 3730XL Genetic Analyser at MacroGen Europe Inc. (Amsterdam, Netherlands).

Table 1. Locality no, species, locality, and coordinates of *Petroleuciscus* species in Turkey.

Locality no	Species, Locality	Coordinates
<i>P. borysthenicus</i>		
1	İnece stream, Northern Aegean sea slope, Edirne	41°41'34.0"N, 27°04'59.0"E
2	Bahçeköy stream, Black sea drainage, Kırklareli	41°34'09.0"N, 28°04'46.0"E
3	Binkılıç stream, Black sea drainage, İstanbul	41°22'48.3"N, 28°17'46.0"E
4	Çamaşır stream, Marmara sea slope (Northern), İstanbul	41°09'48.6"N, 28°27'33.3"E
5	Sakan stream, Marmara sea slope (Southern), Balıkesir	40°03'00.0"N, 27°57'46.0"E
6	Balıklı stream, Marmara sea slope (Southern), Çanakkale	39°57'42.2"N, 27°12'53.9"E
<i>P. smyrnaeus</i>		
7	Kocaçayı stream, Gediz drainage, İzmir	38°48'36.5"N, 27°01'48.3"E
8	Bakırçay stream, Gediz drainage, İzmir	39°07'57.0"N, 27°22'18.0"E
9	Gördes stream, Gediz drainage, Manisa	38°44'34.4"N, 27°55'47.0"E
10	Gölcük lake, Gediz drainage, İzmir	38°18'39.5"N, 28°01'52.2"E
11	Gediz River, Uşak	38°46'37.2"N, 29°12'40.4"E
<i>P. ninae</i>		
12	Yenişehir pond, Küçük Menderes drainage, İzmir	38°04'30.0"N, 27°55'37.2"E
13	Akçay stream, Büyük Menderes drainage, Aydın	37°45'34.0"N, 28°20'07.0"E

**Figure 1.** Map showing sampling area and stations.**Genetic Structure and Phylogenetic Analysis:**

The nucleotide sequences of cyt b gene was aligned using Clustal W algorithm (Thompson et al., 1994) implemented in Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) software. Haplotype number (H), haplotype diversity (Hd), and nucleotide diversity (π) were computed for each species using DnaSP version 6.12.03 (Rozas et al., 2017) program. Sequences of haplotypes were submitted to the NCBI GenBank with accession numbers MN877324- MN877344. Nucleotide frequencies, variable and polymorphic nucleotides, and transition/transversion rate were calculated using MEGA

X (Kumar et al. 2018). To calculate genetic variation among groups and within the groups analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted using the Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) software. According to Bayesian information criterion (BIC) and Akaike information criterion (AIC) implemented in jModeltest v. 0.0.1 (Posada, 2008), the TrN+I model: $-\ln = 2427.5947$ (Tamura K & Nei, 1993) was used as best-fit nucleotide substitution model for phylogenetic analysis. Median-joining (MJ) algorithm (Bandelt et al., 1999) implemented in Network 5.0.0.1 software (www.fluxus-

engineering.com) was used to construct the haplotype network. Phylogenetic relationships among haplotypes and species were estimated using maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) analysis using MEGA X (Kumar et al. 2018), PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) and MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) softwares, respectively. At the BI analysis, Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm was used for one million generations and sampled every 1000 generations. Sampled in each MCMC run, initial 25% of saved trees discarded as burn-in. *Ladigesocypris irideus* (HM560096 for cyt b) was selected as outgroup taxa for all phylogenetic analyses. Pairwise genetic distance estimation among the species was calculated by MEGA X (Kumar et al., 2018) software using the Kimura 2-parameter substitution model (Kimura, 1980).

The Bayesian MCMC coalescent method implemented in BEAST v1.8.2 (Drummond et al., 2012) was used to divergence time estimation. The molecular clock calibration was used 0.4% per lineage per million years based on divergence rate of cyt b gene in Leuciscinae concluded by Perea et al. (2010) and this rate was also used by (Buj et al., 2019). Branch rates were determined from an uncorrelated lognormal distribution and a Yule speciation prior with random starting tree. Nucleotide substitution model, TrN was applied with Gamma site heterogeneity model. The MCMC steps number was three million with parameters logged every 1000 generations. The remaining parameters in the software were chosen as default. Produced trees were summarized by TreeAnnotator v.1.8.2 to obtain a maximum clade credibility tree with 25% burn-in. The tree displayed with FigTree v. 1.4.4. node labels height_95% HPD and height median. Effective sample size and convergence of parameters was evaluated using Tracer v.1.6. The effective sample sizes for all parameters of interest were greater than 200.

RESULTS

Genetic Diversity and Species Divergence:

Nucleotide sequences of the cyt b gene region (1140 bp) were examined in 84 specimens belonging to three species of *Petroleuciscus* in Western Anatolia and Thrace region (Table 2). The overall average nucleotide frequencies were determined as 26.09% A, 28.60% T, 28.43% C, and 16.88% G. The transition/transversion rate $k1 = 42.723$ (purines), $k2 = 14.786$ (pyrimidines) and the overall transition/transversion bias were calculated as $R=12.584$. Haplotype number was determined as 21; eight from *P. borysthenticus* (N=31), ten from *P. smyrnaeus* (N=32) and three from *P. ninae* (N=21) (Table 2).

Table 2. Frequency, distribution, and Genbank accession numbers of Cyt b and haplotypes of *Petroleuciscus* in Turkey (the locality number is in parentheses).

Haplotypes	Genbank Accession Number	<i>P. borysthenticus</i>			<i>P. smyrnaeus</i>					<i>P. ninae</i>				
		İncece S. (1)	Salkan S. (5)	Balıktlı S. (6)	Çamaşır S. (4)	Bahçelköy S. (2)	Binkılıç S. (3)	Gediz R. (11)	Gördes S. (9)	Kocaçay S. (7)	Bakırçay S. (8)	Gölcük L. (10)	Akçay S. (13)	Yenişehir P. (12)
H1	MN877324	6												
H2	MN877325	1												
H3	MN877326		4											
H4	MN877327		4	2										
H5	MN877328		1											
H6	MN877329			2										
H7	MN877330				3									
H8	MN877331					8	2							
H9	MN877332							6	5					
H10	MN877333								2					
H11	MN877334								1					
H12	MN877335									3	8			
H13	MN877336									1				
H14	MN877337									1				
H15	MN877338									1				
H16	MN877339										1			
H17	MN877340											2		
H18	MN877341											1		
H19	MN877342												2	5
H20	MN877343												11	1
H21	MN877344													2
		7	9	4	3	8	2	6	8	6	9	3	13	8

Totally, 77 variable sites were identified and 71 of them were polymorphic. Haplotype and nucleotide diversity are *P. borysthenticus*, *P. smyrnaeus* and *P. ninae* ($Hd=0.837\pm0.040$ and $\pi=0.00584\pm0.00032$), ($Hd=0.774\pm0.052$ and $\pi=0.00273\pm0.00032$), ($Hd=0.581\pm0.075$ and $\pi=0.00569\pm0.00029$), respectively. Overall haplotype and nucleotide diversity are $Hd=0.921\pm0.011$ and $\pi=0.02603\pm0.00126$. The AMOVA suggested that almost all observed genetic variations occur among groups determined as 91.76% for three species. Haplotype network analysis contains 21 unique haplotypes and no haplotype shared between species, which are clearly separated species from each other by at least 9 mutational steps. The most common haplotype was H20, and it was shared by Akçay Stream and Yenişehir Pond populations belonging to *P. ninae* (Figure 2). Pairwise genetic distances between species were calculated as 0.011 (*P. ninae* and *P. smyrnaeus*), 0.054 (*P. borysthenticus* and *P. smyrnaeus*) and 0.049 (*P. borysthenticus* and *P. ninae*).

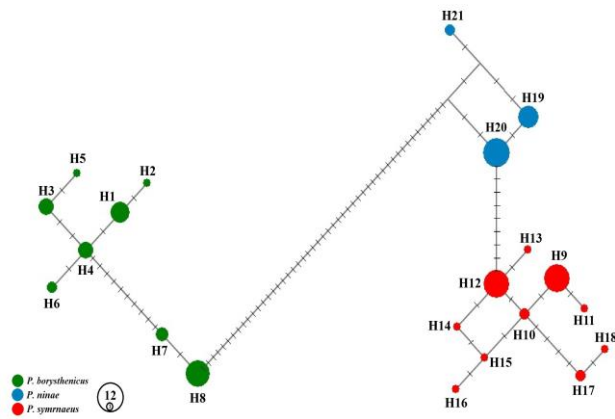


Figure 2. Median-joining network of the cytb haplotypes. Circle size corresponds to sample size; one bar indicates an additional mutational step. Each small lines represent one nucleotide difference.

Phylogenetic Relationships and Divergence Times:

The phylogenetic inferences suggest that *Petroleuciscus* species in Turkey are clustered into two main clades. The first clade consists of *P. borysthencus* while the other clade contains *P. smyrnaeus* and *P. ninae*. Maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian inference analyses of mitochondrial cyt b (Figure 3) gene resulted in trees congruent with each other and were supported by high bootstrap values (>75) for the distinction of species.

The divergence time between the two main clades indicates that the disperse of *Petroleuciscus* species in Turkey starts in 6.09 (10.8-3.36) mya Miocene (late Messinian stage) (Figure 4).

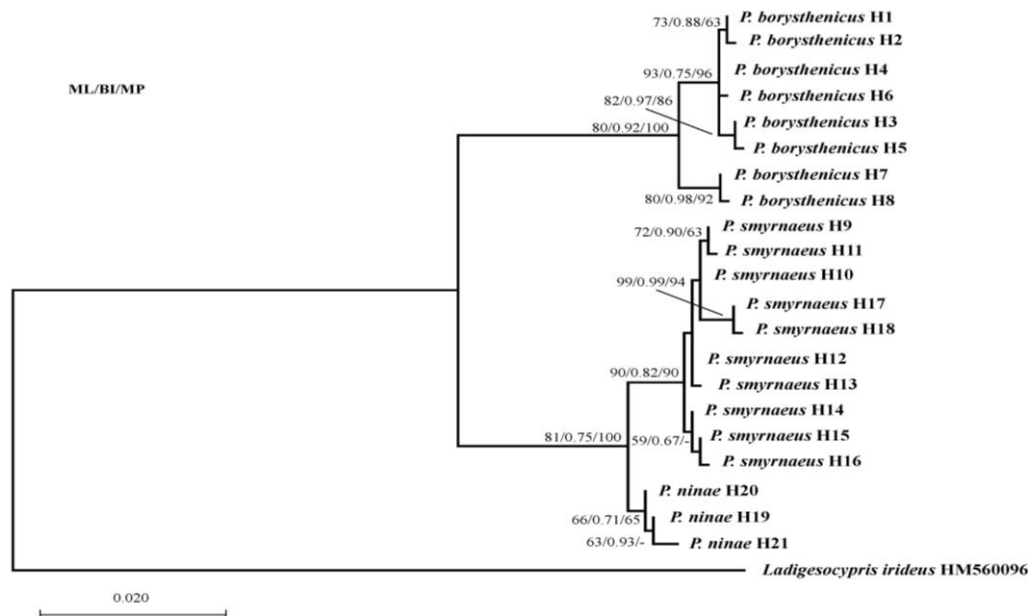


Figure 3. Maximum likelihood tree based on mitochondrial cytb gene sequences of *Petroleuciscus* species in Turkey. Maximum likelihood, Bayesian inference and Maximum Parsimony analyses resulted in congruent trees. Bootstrap and posterior probability values are shown above nodes on tree if 50% or higher

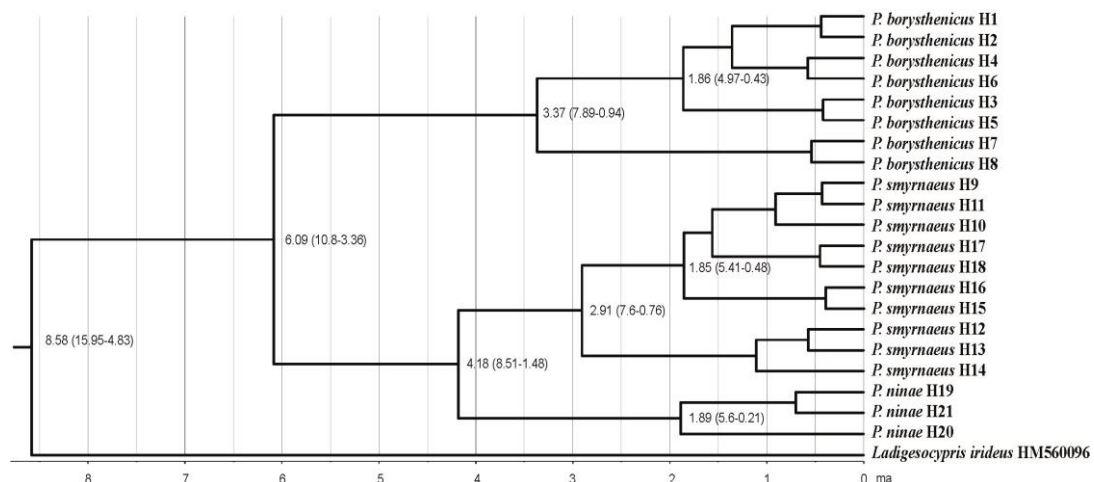


Figure 4. Divergence timescale for the *Petroleuciscus* species inferred under Bayesian uncorrelated relaxed clock method from mitochondrial cyt b genes. Numbers front the node represent divergence times in million years (Ma) and their HPD 95% credibility intervals.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Phylogeny of two *Petroleuciscus* species distributed in Turkey (*P. borysthenicus* and *P. smyrnaeus*) was studied by Perea et al. (2010) and it was indicated that the genus was not known sufficiently. In this study, the phylogeny constructed by ML, MP and BI approaches is based on mtDNA cyt b sequences of three *Petroleuciscus* species, which are clustered in two clades and four haplogroups with high bootstrap values and posterior probabilities. Our construction based on the mitochondrial cyt b gene lead to a remarkable topology, which places first lineage *P. borysthenicus*, and other lineage consists of *P. smyrnaeus* and *P. ninae*. This result was also coherent by Turan et al., (2018) using a more conserved mt DNA gene, COI barcoding gene. First clade includes two haplogroups. The first one “H1, H2, H3, H4, H5, and H6” is found in Sakan, Balıklı stream (drainages of southern Marmara Sea) and İnce stream (a drainage of northern of Aegean Sea). The second one “H7 and H8” is found in Bahçeköy, Binkılıç streams (drainages of Black Sea and Thrace) and Çamaşır stream (drainage of northern of Marmara Sea). Second clade consists of two valid species which are identified before *P. smyrnaeus* and *P. ninae*. Battalgiç (1940) described *Leuciscus heterandrius* from the Lake İznik (southern Marmara Sea coast) but later it was synonymized with *L. borysthenicus* (Battalgiç, 1942). Haplogroup H1-H6 in this phylogenetic tree may refer to *Petroleuciscus heterandrius*. The results of this study may suggest that four *Petroleuciscus* species may exist in Turkey based on the comparison of genetic distance for cyt b gene (0.011–0.054). Undoubtedly, validation studies should be done to clarify this inference, and especially morphological characters should be examined. AMOVA also supports this inference because of almost all observed genetic variations (>86 %) occur among haplogroups. In addition, the median joining network analyses of *Petroleuciscus* species indicates the presence of three haplogroups divided as north and south of Marmara Sea.

Bektas et al. (2017) and Hrbek et al. (2004) previously reported that, with a general opinion Anatolian freshwater fish species have low nucleotide diversity and high haplotype diversity and this implies a smaller founder population and the population is in the expansion period. Similarly, it was determined that the population structure of *Petroleuciscus* species in terms of haplotype and nucleotide diversity is in accordance with this general opinion.

Popov et al., (2004) refer that Central Europe and Anatolia were connecting from the late Oligocene to late Miocene (23-5.33 mya). Estimated dates of divergence time of *Petroleuciscus* from sister genus *Ladigesocypris* was estimated as 8.58 (15.95-4.83) mya and it might be

dispersed from the Danube basin to Anatolia via river capture during this period. Similar to this result, (Levy et al., 2009) also calculated that divergence time of *Petroleuciscus* genus was about 13 mya. Divergence time between two main clades indicates that the divergence among the *Petroleuciscus* species starts in 6.09 (10.8-3.36) mya Miocene (late Messinian stage).

Divergence time between *P. smyrnaeus* and *P. ninae* was estimated as 4.18 (8.51-1.48) mya. Por (1989) indicate that a line drawn from west to east in the middle of Turkey can be considered as a major suture, and this lead to species differentials of *Petroleuciscus* between Büyük Menderes and Gediz River basin. *P. borysthenicus* clade divided into two haplogroups dated 1.86 mya (early Pleistocene). Durand et al. (2000) suggest that the most important component of Chub's evolutionary history is the Danube particularly during the Pleistocene glaciations since it was a refugium for the chub. Our molecular data confirm this influence speciation of *P. borysthenicus* and *P. heterandrius*, and it shows a reasonable geographical model.

Consequently, *Petroleuciscus* species in Turkey were analyzed based mt DNA cyt b gene and determined as monophyletic and differentiated from the sister group at Miocene era. Also, it is estimated that the divergence time of the two main clades which are the first clade including *P. borysthenicus*, and the second clade including *P. smyrnaeus*, *P. ninae* starts in Miocene (late Messinian stage). Speciation dynamics of *Petroleuciscus* species in Turkey have been determined and controlled by biogeographical processes after Miocene.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am pleased to thank Dr. Davut Turan and Dr. Cüneyt Kaya for providing samples. I also thank Dr. Yusuf Bektaş for genetic analysis, Dr. İsmail Aksu for laboratory studies, and Dr. Esra Bayçelebi for drawing the map. This study was supported by the Scientific Research Project Coordination Unit of Recep Tayyip Erdogan University (Project No: FBA-2018-773).

REFERENCES

- Aksu, I. & Bektaş, Y. (2019). Mitochondrial phylogeny and biogeography of the genus *Gobio* (Teleostei: Cyprinidae) in Turkey. *Zoology in the Middle East*, 65(2), 128-141. DOI: [10.1080/09397140.2019.1586126](https://doi.org/10.1080/09397140.2019.1586126)
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036)

- Battalgil, F. (1940).** Yeni bir Cyprinid nevi. *İstanbul Üniv. Fen Fak. Mec., Serie B(5)*, 74-77. <http://files/422/Battalgil - 1940- Yeni bir Cyprinid nevi.pdf>
- Battalgil, F. (1942).** Türkiye tatlı su balıkları hakkında. Contribution à la connaissance des poissons des eaux douces de la Turquie. *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, B, 7(4)*, 287-306.
- Bektas, Y., Aksu, I., Kaya, C., Baycelebi, E., Atasaral, S., Ekmekci, F. G. & Turan, D. (2019).** Phylogeny and phylogeography of the genus *Alburnoides* (Teleostei, Cyprinidae) in Turkey based on mitochondrial DNA sequences. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, **30(7)**, 794-805. DOI: [10.1080/24701394.2019.1664493](https://doi.org/10.1080/24701394.2019.1664493)
- Bektas, Y., Turan, D., Aksu, I., Ciftci, Y., Eroglu, O., Kalayci, G. & Belduz, A.O. (2017).** Molecular phylogeny of the genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae) in Anatolia, Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, **70**, 80-94. DOI: [10.1016/j.bse.2016.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.11.005)
- Bogutskaya, N.G. (1996).** Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 1. Morphology and taxonomic relationships of *Leuciscus borysthenticus* (Kessler, 1859), *Leuciscus smyrnaeus* Boulenger, 1896 and *Ladigesocypris ghigii* (Gianferrari, 1927) (Cyprinidae, Pis. *Publ. Espec. Ins. Esp. Oceanogr*, **21**, 25-44.
- Bogutskaya, N.G. (2002).** *Petroleusciscus*. a new genus for the *Leuciscus borysthenticus* species group (Teleostei: Cyprinidae). *Zoosyst. Rossica*, **11(1)**, 235-237.
- Buj, I., Šanda, R., Zogaris, S., Freyhof, J., Geiger, M.F. & Vukić, J. (2019).** Cryptic diversity in *Telestes pleurobipunctatus* (Actinopterygii; Leuciscidae) as a consequence of historical biogeography in the Ionian Freshwater Ecoregion (Greece, Albania). *Hydrobiologia*, **835(1)**, 147-163. DOI: [10.1007/s10750-019-3935-6](https://doi.org/10.1007/s10750-019-3935-6)
- Doadrio, I. & Carmona, J. A. (1998).** Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. *Journal of Fish Biology*, **53(3)**, 591-613. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1998.tb01004.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01004.x)
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012).** Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*. DOI: [10.1093/molbev/mss075](https://doi.org/10.1093/molbev/mss075)
- Durand, J.D., Tsigenopoulos, C.S., Ünlü, E. & Berrebi, P. (2002).** Phylogeny and biogeography of the family cyprinidae in the Middle East inferred from cytochrome b DNA-Evolutionary significance of this region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **22(1)**, 91-100. DOI: [10.1006/mpev.2001.1040](https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1040)
- Durand, J.D., Unlu, E., Doadrio, I., Pipoyan, S. & Templeton, A.R. (2000).** Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub *Leuciscus cephalus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **267(1453)**, 1687-1697. DOI: [10.1098/rspb.2000.1196](https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1196)
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010).** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10(3)**, 564-567. DOI: [10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x)
- Freyhof, J., Kaya, C., Baycelebi, E., Geiger, M. & Turan, D. (2018).** Generic assignment of *Leuciscus kurui* Bogutskaya from the upper Tigris drainage, and a replacement name for *Alburnus kurui* Mangit & Yerli (Teleostei: Leuciscidae). *Zootaxa*, **4410(1)**, 113-135. DOI: [10.11646/zootaxa.4410.1.6](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4410.1.6)
- Froese, R. & Pauly, D. (2022).** FishBase. 2022. *World Wide Web Electronic Publication*. Available at: [Http://Www. Fishbase. Org](http://www.fishbase.org) (Accessed on 8 January 2022).
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Kärst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., ...& Freyhof, J. (2014).** Spatial heterogeneity in the mediterranean biodiversity hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, **14(6)**, 1210-1221. DOI: [10.1111/1755-0998.12257](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12257)
- Hall, T.A. (1999).** BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hrbek, T., Stölting, K.N., Bardakci, F., Küçük, F., Wildekamp, R.H. & Meyer, A. (2004).** Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32(1)**, 297-308. DOI: [10.1016/j.ympev.2003.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.12.017)
- Kalayci, G. (2022).** Pliocene-Pleistocene dispersal bring along low inter species diversity between *Vimba* species based on multilocus analysis. *Zoosystematics and Evolution*, **98(1)**, 65-75. DOI: [10.3897/zse.98.76937](https://doi.org/10.3897/zse.98.76937)
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16(2)**, 111-120. DOI: [10.1007/BF01731581](https://doi.org/10.1007/BF01731581)
- Kotlík, P., Bogutskaya, N.G. & Ekmekçi, F.G. (2004).** Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: Divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, **13(1)**, 87-95. DOI: [10.1046/j.1365-294X.2003.02021.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02021.x)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018).** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35(6)**, 1547-1549. DOI: [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)

- Kuyumcu, M., Aksu, İ. & Bektaş, Y. (2021).** Genetic analysis of Aphaniidae Hoedeman, 1949 (Teleostei: Cyprinodontiformes) family in Anatolia. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, **6**(4), 627-634. DOI: [10.35229/jaes.1030422](https://doi.org/10.35229/jaes.1030422)
- Levin, B.A., Freyhof, J., Lajbner, Z., Perea, S., Abdoli, A., Gaffaroğlu, M., Özuluğ, M., Rubenyan, H.R., Salnikov, V.B. & Doadrio, I. (2012).** Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**(1), 542-549. DOI: [10.1016/j.ympev.2011.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.004)
- Levy, A., Doadrio, I. & Almada, V.C. (2009).** Historical biogeography of European leuciscins (Cyprinidae): Evaluating the Lago Mare dispersal hypothesis. *Journal of Biogeography*, **36**(1), 55–65. DOI: [10.1111/j.1365-2699.2008.01969.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01969.x)
- Perea, S., Böhme, M., Zupančič, P., Freyhof, J., Šanda, R., Özulu, M., Abdoli, A. & Doadrio, I. (2010).** Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology*, **10**(1). DOI: [10.1186/1471-2148-10-265](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-265)
- Popov, S., Rögl, F., Rozanov, A., Steininger, F., Shcherba, I. & Kovac, M. (2004).** Lithological-paleogeographic maps of Paratethys. 10 maps Late Eocene to Pliocene. In *CFS Courier Forschungsinstitut Senckenberg*.
- Por, D.F.F. (1989).** *The legacy of Tethys*. DOI: [10.1007/978-94-009-0937-3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0937-3)
- Posada, D. (2008).** jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**(7), 1253-1256. DOI: [10.1093/molbev/msn083](https://doi.org/10.1093/molbev/msn083)
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003).** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**(12), 1572-1574. DOI: [10.1093/bioinformatics/btg180](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180)
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. & Sanchez-Gracia, A. (2017).** DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**(12), 3299-3302. DOI: [10.1093/molbev/msx248](https://doi.org/10.1093/molbev/msx248)
- Sanjur, O.I., Carmona, J.A. & Doadrio, I. (2003).** Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. DOI: [10.1016/S1055-7903\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00088-5)
- Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L. & Mayden, R.L. (2018).** Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **127**, 781-799. DOI: [10.1016/j.ympev.2018.06.026](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.026)
- Swofford, D.L. (2003).** PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10. In *Sinauer Associates*. DOI: [citeulike-article-id:2345226](https://doi.org/citeulike-article-id:2345226)
- Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**(3), 512-526. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023)
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**(22), 4673-4680. DOI: [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673)
- Tsigenopoulos, C.S., Kotlík, P. & Berrebi, P. (2002).** Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**(1), 83-99. DOI: [10.1046/j.1095-8312.2002.00007.x](https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00007.x)
- Turan, D., Kalayci, G., Kaya, C., Bektaş, Y. & Küçük, F. (2018).** A new species of *Petroleuciscus* (Teleostei: Cyprinidae) from the Büyük Menderes River, southwestern Anatolia, Turkey. *Journal of Fish Biology*, **92**(4), 875-887. DOI: [10.1111/jfb.13525](https://doi.org/10.1111/jfb.13525)
- Zardoya, R. & Doadrio, I. (1999).** Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, **49**(2), 227-237. DOI: [10.1007/PL00006545](https://doi.org/10.1007/PL00006545)
- Zardoya, R., Economidis, P.S. & Doadrio, I. (1999).** Phylogenetic Relationships of Greek Cyprinidae: Molecular Evidence for at Least Two Origins of the Greek Cyprinid Fauna. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**(1), 122-131. DOI: [10.1006/mpev.1999.0630](https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0630)



ERRATUMS

Erratum 1. In the original article titled “Antioxidant Potential of Chestnut Shell, Stinging Nettle, Kiwi Fruit and Citrus Fruit Extracts and Antibacterial Effects Against Some Fish Pathogens” published in the *Anatolian Journal of Environmental and Animal Sciences*, 2021, Vol: 6, No: 2, pp: 204-210, the DOI no of article has been corrected the following.

Erratum 2. In the original article titled “Antimicrobial Resistance and Diversity of *Lactococcus garvieae* by Genomic Approaches” published in the *Anatolian Journal of Environmental and Animal Sciences*, 2021, Vol: 6, No: 4, pp: 506-505, the date error in the header has been corrected by adding the following date error.

Erratum 3. In the original article titled “The Fish Fauna of Kuzgun Dam Lake and Its Drainages (Erzurum, Turkey).” published in the *Anatolian Journal of Environmental and Animal Sciences*, 2021, Vol: 6, No: 4, pp: 522-525, the date error in the header has been corrected by adding the following date error.

Erratum 4. In the original article titled “Evaluation of Persimmon (*Diospyros kaki*), Cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) and Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos*) Fruits as a Natural Antioxidant Source.” published in the *Anatolian Journal of Environmental and Animal Sciences*, 2021, Vol: 6, No: 4, pp: 592-598, the date error in the header has been corrected by adding the following date error.

Erratum 5. In the original article titled “Macro and Trace Element Levels of Macroalgae *Cystoseira foeniculacea* and *Gongolaria montagnei* Species from Mediterranean Region (Antalya/ Turkey)” published in the *Anatolian Journal of Environmental and Animal Sciences*, 2021, Vol: 6, No: 4, pp: 757-764, the date error in the header has been corrected by adding the following date error.

It is kindly submitted to your information.

Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences Editorial Board.

Erratum 1. *Kobyas et al., (2021)* DOI: <https://doi.org/10.35229/jaes.863233>

Erratum 2. “*Kumru, (2021)* *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences, Year:6, No:4, (506-513), 2021*”

Erratum 3. “*Bayçelebi & Turan, (2021)* *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences, Year:6, No:4, (522-525), 2021*”

Erratum 4. “Year: 6, No: 4, 2021 (592-598)”

Erratum 5. “Year: 6, No: 4, 2020 (757-764)”

DÜZELTMELER

Düzeltilme 1. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 2021, Cilt: 6, Sayı: 2, s: 204-210*, sayısında yayımlanan “Kestane Kabuğu, Isırgan Otu, Kivi Meyvesi ve Narenciye Özütlülerinin Antioksidan Potansiyelleri ve Bazı Balık Patojenlerine Karşı Antibakteriyel Etkileri” makalenin DOI no aşağıdaki gibi düzeltilmiştir

Düzeltilme 2. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 2021, Cilt: 6, Sayı: 4, s: 506-505*, sayısında yayımlanan “Antimicrobial Resistance and Diversity of *Lactococcus garvieae* by Genomic Approaches” başlıklı özgün makalede üst bilgede tarih hatası aşağıdaki gibi eklenerek düzeltilmiştir.

Düzeltilme 3. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 2021, Cilt: 6, Sayı: 4, s: 522-525*, sayısında yayımlanan “Kuzgun Baraj Gölü ve Drenajlarının Balık Faunası (Erzurum, Türkiye).” başlıklı özgün makalede üst bilgede tarih hatası aşağıdaki gibi eklenerek düzeltilmiştir.

Düzeltilme 4. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 2021, Cilt: 6, Sayı: 4, s: 757-764*, sayısında yayımlanan “Hurma (*Diospyros kaki*), Karayemiş (*Prunus laurocerasus*) ve Mavi Yemiş (*Vaccinium arctostaphylos*) Meyvelerinin Doğal Antioksidan Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi.” başlıklı özgün makalede üst bilgede tarih hatası aşağıdaki gibi eklenerek düzeltilmiştir.

Düzeltilme 5. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 2021, Cilt: 6, Sayı: 4, s: 757-764*, sayısında yayımlanan “Akdeniz Bölgesi’nden (Antalya/ Türkiye) Alınan Makroalg *Cystoseira foeniculacea* ve *Gongolaria montagnei* Türlerinin Makro ve İz Element Seviyeleri” başlıklı özgün makalede üst bilgede tarih hatası aşağıdaki gibi eklenerek düzeltilmiştir.

Bilgilerinize arz olunur.

Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi Yayın Kurulu

Düzeltilme 1. “*Kobyas vd., (2021)*” DOI: <https://doi.org/10.35229/jaes.863233>

Düzeltilme 2. “*Kumru, (2021)* *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences, Year:6, No:4, (506-513), 2021*”

Düzeltilme 3. “*Bayçelebi & Turan, (2021)* *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences, Year:6, No:4, (522-525), 2021*”

Düzeltilme 4. “Yıl: 6, Sayı: 4, 2021 (592-598)”

Düzeltilme 5. “Yıl: 6, Sayı: 4, 2020 (757-764)”

How to cite: Kobyas, O., Kara, B., Uzun-Yaylacı, E. & Çağlak, E. (2021). Antioxidant Potential of Chestnut Shell, Stinging Nettle, Kiwi Fruit and Citrus Fruit Extracts and Antimicrobial Effects Against Some Fish Pathogens. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(2), 204-210. DOI: [10.35229/jaes.863233](https://doi.org/10.35229/jaes.863233)

How to cite: Kumru, S. (2021). Antimicrobial Resistance and Diversity of *Lactococcus garvieae* by Genomic Approaches. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 506-513. DOI: [10.35229/jaes.894280](https://doi.org/10.35229/jaes.894280)

How to cite: Bayçelebi, E. & Turan, D. (2021). The Fish Fauna of Kuzgun Dam Lake and Its Drainages (Erzurum, Turkey). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 522-525. DOI: [10.35229/jaes.989549](https://doi.org/10.35229/jaes.989549)

How to cite: Gürdal, A.A. (2021). Evaluation of Persimmon (*Diospyros kaki*), Cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) and Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos*) Fruits as a Natural Antioxidant Source. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 592-598. DOI: [10.35229/jaes.1016793](https://doi.org/10.35229/jaes.1016793)

How to cite: Aşıkutlu, B. & Okudan, E.Ş. (2021). Macro and Trace Element Levels of Macroalgae *Cystoseira foeniculacea* and *Gongolaria montagnei* Species from Mediterranean Region (Antalya/ Turkey). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 757-764. DOI: [10.35229/jaes.950591](https://doi.org/10.35229/jaes.950591)