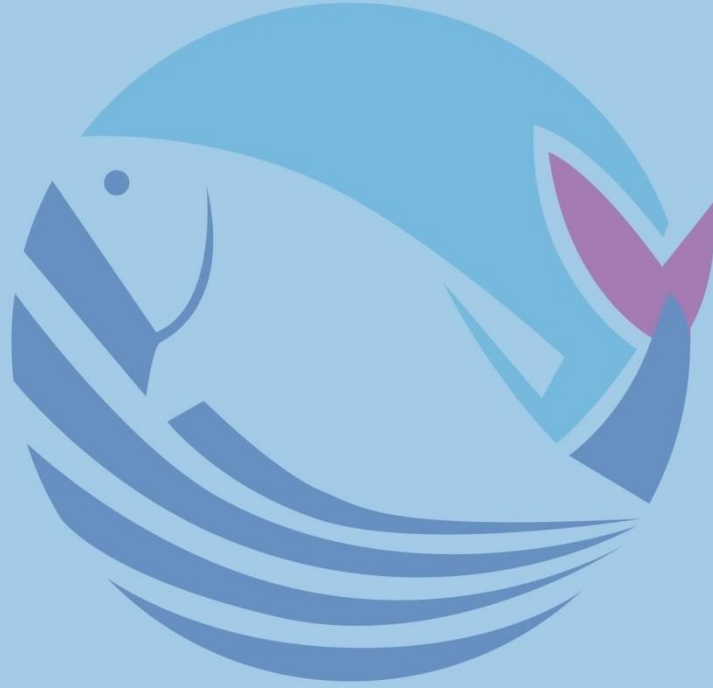


Acta Aquatica Turcica

**Türk Su Bilimleri
Dergisi**



2022

Vol:18

Number:2 | Cilt:18

Sayı:2

e-ISSN: 2651-5474

Yayın Tarihi: Haziran - 2022

ACTA AQUATICA TURCICA

TÜRK SU BİLİMLERİ DERGİSİ

E-ISSN: 2651-5474

(YIL: 2022 – CİLT: 18 – SAYI: 2)

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi

Adına Sahibi /

Owner of Behalf of Isparta University of Applied Sciences, Eğirdir Fisheries Faculty

Ayşegül KUBİLAY

Baş Editör / Editor in Chief

Yunus Ömer BOYACI

Editörler / Editors

Şengül BİLGİN

Nalan Özgür YİĞİT

Seçil METİN

Mustafa CEYLAN

Viktoras LIORANČAS

Tom WIKLUND

Aynur LÖK

Ercüment GENÇ

Selda TEKİN ÖZAN

Hüseyin SEVGİLİ

Mehmet CİLBİZ

Mehmet Arif ZORAL

Yayın Tarihi: Haziran - 2022

Mizanpaj Editörleri / Layout Editors

Deniz KARA

Ergi BAHRİOĞLU

İngilizce Editörü / English Editor

Arda ÖZEN

İletişim / Contact

Acta Aquatica Turcica

Yayın Komisyonu Başkanlığı,

32260 Doğu Yerleşkesi-İSPARTA

Tel: 0 246 2146401 Faks: 0 246 2146445

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

E-Posta: actaquatr@isparta.edu.tr

E-ISSN: 2651-5474

Yayın Tarihi: Haziran - 2022

ACTA AQUATICA TURCICA
E-ISSN: 2651-5474
(YIL: 2022 – CİLT: 18– SAYI: 2)

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD*

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

* Liste akademik unvan ve isme göre alfabetik sırayla hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DÜZELTME YAZILARI / ERRATUM:

Erratum to: Small-Scale Rainbow Trout Cage Farm in the Inland Waters of Turkey is Sustainable in terms of Carbon Footprint (kg CO ₂ e) Gürkan Diken, Hayati Köknaroğlu, İsmail Can	146-146
--	---------

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES:

Karanfil Yağının Japon Balığının (<i>Carassius auratus</i>) Anestezisinde Optimal Konsantrasyonu ve Balığın Taşınmasında Stoklama Yoğunluğuna Etkisi Mahmut Yanar, Kazım Ergin Gürkan, Ece Evliyaoglu.....	147-158
Evaluation of the nutritional quality of farmed common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) based on fatty and amino acids profile Arafat R. Ahmed	159-167
Antalya'da bir deniz akvaryumu su temini sisteminin çevresinde gözlenen bentik Makrofauna örnekleri Kemal Gökoğlu, Mete Kuşat.....	168-178
Tiazolidin'in Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>) Solungaç ve karaciğer dokusunda AChE enzim aktivitesi ve toplam protein seviyesi üzerine etkileri Figen Esin Kayhan, Harika Eylül Esmer Duruel, Şeyma Kızılkaya, Güllü Kaymak, Cansu Akbulut, Hayriye Genç, Mustafa Zengin, Nazan Deniz Yön Ertuğ.....	179-186
Kocaeli (Türkiye)'deki bazı akarsuların (Dilderesi, Yalakdere, Kirazdere) taban Makroomurgasız faunası Ahmet Bayköse, Halim Aytekin Ergül, Deniz Anıl Odabaşı, Nurcan Özkan, Serpil Sağır Odabaşı, Yunus Ömer Boyacı.....	187-207
Heavy metal concentrations and health risk assessment in <i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793) caught in the Turkish Black Sea coasts Bülent Verep, Tanju Mutlu.....	208-216
The impact of hyme, rosemary and basil extracts on the chemical, sensory and microbiological quality of mackerel balls stored at -18°C Esra Balıkcı, Yeşim Özoğul, Mustafa Durmuş, Yılmaz Uçar, Saadet Gökdoğan Tekin....	217-235
Monitoring of enzymatic activity in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon (<i>Salmo labrax</i> Pallas, 1814) Osman Tolga Özel, Selin Ertürk Gürkan.....	236-246
Orta Ege Denizi'nde yüzer ağ kafes sistemlerinde yerleşen makro alg ve makro omurgasız türler üzerine bir ön araştırma Ali Ulaş, Serpil Serdar, Şükrü Yıldırım, Didem Göktürk.....	247-258
Avrupa Deniz Levreği (<i>Dicentrarchus labrax</i>) pilorik sekasından Tripsin enziminin saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu Nihat Karasu, Ali Günlü	259-272
İzmir Körfezi'nde Yabani Mercan Balığı (<i>Pagellus acarne</i> Risso, 1827)'nin üreme özellikleri Dilek İlhan, Sencer Akalın, Tuncay Murat Sever	273-282
Novel utilization of fish by-products and wastes: Protein hydrolysates Gülsüm Balçık Mısır.....	283-294

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

DERLEME MAKALELER / REVIEWS:

Novel utilization of fish by-products and wastes: Protein hydrolysates Gülsüm Balçık Mısıır.....	283-294
---	---------

Erratum to: “Small-Scale Rainbow Trout Cage Farm in the Inland Waters of Turkey is Sustainable in Terms of Carbon Footprint (kg CO_{2e})”

Düzeltilme: “Türkiye İç Sularında Küçük Kapasiteli Gökkuşuğu Alabalığı Kafes Yetiştiriciliği Karbon Ayak İzi Bakımından Sürdürülebilirdir”

Gürkan Diken^{1,*}, Hayati Köknaroğlu², İsmail Can³

¹Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Eğirdir Fisheries, Isparta 32260, Türkiye.

²Isparta University of Applied Sciences, Department of Animal Science, Isparta 32260, Türkiye.

³Canlar Alabalık, Çandır, Sütçüler, Isparta, 32950, Türkiye.

*Corresponding author: gurkandiken@isparta.edu.tr

Note: The present Erratum is related to the paper published in Acta Aquatica Turcica, 2022, 18(1), 131-145. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1005447>

The authors regret it. The calculations in Table 5 are correct, but there are typos in the text.

Statement -1:

CF expended per gram of protein deposited in harvested fish, carcass, and fillet expressions are expressed in grams, although the calculations were made in kg. These statements should be corrected in Table 5 and in the text as follows:

The expression “CF expended per gram of protein deposited in harvested fish” should be corrected as “CF expended per kg of protein deposited in harvested fish”.

The expression “CF expended per gram of protein deposited in carcass” should be corrected as “CF expended per kg of protein deposited in carcass”.

The expression “CF expended per gram of protein deposited in fillet” should be corrected as “CF expended per kg of protein deposited in fillet”.

Statement -2:

The values reported in the text for CF expended for a kg of carcass and fillet (1.69 and 2.39) should be corrected as 1.40 and 1.97.



Karanfil Yağının Japon Balığının (*Carassius auratus*) Anestezisinde Optimal Konsantrasyonu ve Balığın Taşınmasında Stoklama Yoğunluğuna Etkisi

Optimal Concentration of Clove Oil in Anesthetization of Goldfish (*Carassius auratus*) and its Effect on Stocking Density for Fish Transportation

Mahmut Yanar^{1*}, Kazım Ergin Gürkan¹, Ece Evliyaoğlu¹

¹Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Adana

*Sorumlu yazar: myanar@cu.edu.tr

Geliş: 22.04.2021

Kabul: 02.11.2021

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Yanar, M., Gürkan, K. E. & Evliyaoğlu, E. (2022). Karanfil Yağının Japon Balığının (*Carassius auratus*) Anestezisinde Optimal Konsantrasyonu ve Balığın Taşınmasında Stoklama Yoğunluğuna Etkisi. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 147-158. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.923939>

Özet: Bu çalışmada, karanfil yağının ortalama ağırlığı 4,16±0,61 g olan japon balığının (*Carassius auratus*) derin anestezisi (30 dk) ve taşınması (15 s) için etkili olan konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca karanfil yağının balıkların 15 s süreli taşınmasında stoklama yoğunluğu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Karanfil yağının konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak anesteziyeye giriş süresi 2 ile 11 dk, kendine gelme süresi ise 5 ile 17 dk arasında değişmiştir. Balıkların solunum sayısı anestezisi içermeyen suda 73/dk iken, karanfil yağı uygulanmış olanlarda konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak 104/dk'ya kadar çıkmıştır. Karanfil yağının 30 dk sürede hafif anestezisi için 6-12 µL/L, derin anestezisi için 18-24 µL/L; 15 s sürede hafif anestezisi için 6-9 µL/L, derin anestezisi için 12-18 µL/L konsantrasyonları güvenle kullanılabilir. Karanfil yağının toksik konsantrasyonları 30 dk uygulama için 42 µL/L, 15 s uygulama için 21 µL/L olarak saptanmıştır. Balıkların 15 s süreli taşınmasında taşıma suyuna karanfil yağı ilavesinin balığın yaşama oranı üzerine bir etkisi olmamıştır. Juvenil japon balıklarının 3/4 oksijen basılmış naylon torbalarda 15 s süre ile taşınmasında, %98-99 yaşama oranı ile en uygun stoklama oranları 80 veya 100 adet/L'dir.

Anahtar kelimeler

- Japon balığı
- Karanfil yağı
- Anestezisi
- Stoklama yoğunluğu
- Taşıma

Abstract: In this study, the effective concentrations of clove oil for deep anesthesia (30 min) and transportation (15 h) of goldfish (*Carassius auratus*) with an average weight of 4.16±0.61g were determined. Besides, the effect of clove oil on stocking density in transporting fish for 15 hours was determined. Depending on the concentrations and application time of clove oil, induction time ranged from 2 to 11 min while recovery time varied between 5 and 17 min. Depending on the concentrations and application time of clove oil, the respiratory rate of fish increased from 73/min to 104/min with the addition of clove oil in the anesthetic-free water. 6-12 µL/L for light anesthesia and 18-24 µL/L for deep anesthesia at a 30 min period, 6-9 µL/L for light anesthesia and 12-18 µL/L for deep anesthesia at a 15 h period are determined concentrations of clove oil that can be used safely. The toxic concentrations of clove oil were determined as 42 µL/L for 30 min application, 21 µL/L for 15 h application. Adding clove oil to the transport water did not affect the survival rate of the fish during the 15 h transport period. When transporting juvenile goldfish in 3/4 oxygen compressed nylon bags for 15 h, the most suitable stocking rate is 80 or 100 fish/L with a 98-99% survival rate.

Keywords

- Goldfish
- Clove oil
- Anesthesia
- Stocking density
- Transportation



1. GİRİŞ

Akvaryum balıkçılığı popüler bir hobi olmasının yanı sıra, yan sektörleriyle birlikte dünyada 15-30 milyar US \$ ticaret hacmine sahip önemli bir sektördür (Tlusty vd., 2012; Raghavan vd., 2013). Türkiye’de resmi olmayan verilere göre akvaryum balığı ithalatına yılda yaklaşık 10 milyon US \$ döviz harcadığı, yan sektörleriyle birlikte bu rakamın 15-20 milyon US \$’ı bulduğu, satılan yıllık akvaryum balığının ise 30-40 milyon adet olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışmanın balık materyali olan japon balığı (*Carassius auratus*) hem yurdumuzda (Türkmen ve Çelik, 2014) hem küresel ölçekte (Ghosh vd., 2003; FAO, 2014) akvaryum balığı pazarında açık ara en büyük paya sahiptir.

Anestezikler, boylama, aşılama, markalama, sağım ve cerrahi işlemler gibi balıkların hareketsizleştirilmesi gereken durumlarda, ayrıca balıkların uzun süreli taşınmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda popüleritesi artan karanfil yağı, ucuz, kolay bulunan, güzel kokulu, insan ve çevre sağlığı bakımından güvenli olan bitkisel bir anesteziktir (Fischer vd., 1990; Woody vd., 2002). Karanfil bitkisinin (*Eugenia aromatica* / *E.caryophyllata*) gövde, yaprak ve tomurcuklarından damıtma yöntemiyle elde edilir (Soto ve Burhanuddin, 1995; Kolarova vd., 2006). Etken madde olarak %70-90 fenol bileşiği olan öjenol (4-allil-2-metoksifenol), %17’nin üzerinde öjenol asetat ve %12 nin üzerinde karyofilen içerir (Briozzo vd., 1989; Keene vd., 1998). Antioksidan (Kramer, 1985), antiviral (Siddiqui, 1996) antibakteriyel (Stecchini vd., 1993) ve antifungal (Bullerman vd., 1977) özellikleri olduğu rapor edilmiştir. Kanserojenik ve mutajenik olmayan (Maura vd., 1989) karanfil yağı, FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından da güvenli kabul edilen bir anesteziktir. İdeal bir anesteziye aranan çoğu kriteri karşılamaktadır (Marking ve Meyer 1985; Keene vd., 1998; Grush vd., 2004). Dezavantajı ise terapik endeksi yani güven aralığının dar olmasıdır (Velisek vd., 2005a; Kaiser vd., 2006).

Karanfil yağı bir anestezik olarak sazan (Otay vd., 2014), gökkuşuğu alabalığı (Keene vd., 1998; Tort vd., 2002; Perdikaris vd., 2010), çipura (Tort vd., 2002; Mylonas vd., 2005), levrek (Mylonas vd., 2005; Kamacı vd., 2009), Nil tilapiası (Simoes vd., 2011), dil balığı (Weber vd., 2009), mersin balığı (Akbulut vd., 2011), karabalık (Öğretmen ve Gökçek, 2013), ayrıca akvaryum balıklarından melek balığı (Hekimoğlu ve Ergun, 2012; Chellapan vd., 2013), zebra çiklid (Han vd., 2016), yunus (Han vd., 2016), sarı prenses (Han vd., 2016) ve japon balığı (Perdikaris vd., 2010; Abdolazizi vd., 2011) üzerinde test edilmiştir. Ancak bu çalışmalar, tartım, aşılama veya sağım gibi balıkların kısa süreli hareketsizleştirilmesine yönelik olup, balıkların uzun süreli taşınmasında stok yoğunluğu üzerindeki etkileri araştırılmamıştır. Diğer yandan anestezik madde uygulansın veya uygulanmasın, balıkların oksijen basılmış naylon torbalarda birim hacimde kaç adet veya biomasta taşınması gerektiği konusunda literatür bilgileri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada karanfil yağının juvenil japon balığında 30 dk (dakika) ve 15 s (saat) süre uygulanmasında optimal konsantrasyonu, ayrıca balıkların oksijen basılmış naylon torbalarda 15 s taşınmasında optimal stoklama oranı ve stoklama oranına karanfil yağı ilavesinin etkisi belirlenmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Denemede akvaryum balıkçılığı sektöründe “SM” (Small medium) olarak tanımlanan ve ortalama ağırlığı $4,16 \pm 0,61$ g olan juvenil japon balıklarının düz kırmızı varyeteleri kullanılmıştır. Çalışma, karanfil yağının (Sigma-Aldrich, USA) japon balığında kısa ve uzun süreli uygulanmasında optimal konsantrasyonun belirlenmesi (I. Deneme), ayrıca balıkların oksijen basılmış naylon torbalarda uzun süreli taşınmasında optimal stoklama oranı ve stoklama oranına karanfil yağı ilavesinin etkisinin test edilmesi (II. Deneme) amaçlanarak iki deneme halinde yürütülmüştür. Balıkların sağım, tartım ve aşılama gibi operasyonlar için 30 dk, şehirlerarası taşımada ise 15 saat süre gerektiğinden denemede bu süreler dikkate alınmıştır. İkinci denemde kullanılacak anestezi seviyesi, birinci denemede belirlenen optimal konsantrasyona göre belirlenmiştir.

2.1. Karanfil yağının japon balığında kısa ve uzun süreli uygulanmasında optimal konsantrasyonun belirlenmesi (I. Deneme)

Karanfil yağının Japon balığında 30 dk (dakika) ve 15 s (saat) uygulanmasında anestezi etkisi ve yanıtını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonları test edilmiştir. Karanfil yağının balıklara 30 dk uygulamada 6 µL/L aralıklarla 0 ile 48 µL/L arasındaki konsantrasyonları; 15 s uygulamada ise 3 µL/L'lik aralıklarla 0 ile 24 µL/L arasındaki konsantrasyonları denenmiştir. Karanfil yağı 1/10 oranında %99 saflıktaki etil alkolde çözündürülerek stok solusyon hazırlanmıştır (Ross ve Ross, 2008).

Laboratuvara getirilen balıklar yeni ortamlarında 2 hafta sürede adapte edildikten sonra denemeye alınmışlardır. Her bir muamele grubu 3 tekrardan oluşturulmuş ve her bir tekrar için 10 adet balık kullanılmıştır. Denemeler 100 L'lik cam akvaryumlarda gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince su sıcaklığı 22°C dolayında sabit tutulmuş ve akvaryumlar sürekli havalandırılmıştır. Deneme sonunda balıklar ayrı akvaryumlara alınarak 96 s süre boyunca olası ölümler kaydedilmiştir. Deneme süresince balıkların anestezisiye giriş ve kendine gelme süresi, anestezisi düzeyi, solunum sayıları ve ölüm oranları kaydedilmiştir. Akvaryumdaki balıkların yarıdan fazlasının anestezisi olması, grubun anestezisi için yeterli kabul edilmiştir. Anestezisi seviyesinin belirlenmesinde genelde balığın yüzme aktivitesi, denge, fiziksel veya görsel dış uyaranlara karşı vermiş olduğu yanıtlar dikkate alınmaktadır.

Ancak bu parametreler metrik olmadığı için, çalışmamızda nispeten daha ölçülebilir olan LOE (loss of equilibrium) esas alınmıştır. LOE, balıkların sıcaklık toleransı çalışmalarında denge kaybının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan standart bir kriterdir. Düşük ve yüksek sıcaklık nedeniyle balığın motor aktivitesi ve koordinasyonunu yitirdiği ve 1 dakikadan fazla dorsa-ventral oryantasyon pozisyonunu sürdürememesi olarak tanımlanmaktadır (Bennett ve Beitinger, 1997). Pek çok araştırmacı balıklarda 4 ile 6 anestezisi seviyesi ve nispeten farklı kriterler üzerinden değerlendirme yapmıştır (Yoshikawa vd., 1988; Summerfelt ve Smith, 1990; Stoskopf, 1993; Keene vd., 1998). Bu araştırmacıların önerileri ve sıcaklık tolerans çalışmasında standardize edilen LOE başta olmak üzere önerilen diğer kriterler dikkate alınarak dört anestezisi seviyesi üzerinden değerlendirme yapılmıştır:

1. Seviye (*): *Hafif sedasyon*: Hafif denge kaybı, normal yüzme, dış fiziksel veya görsel uyaranlara karşı hafif tepki kaybı.

2. Seviye (**): *Derin sedasyon*: Denge kaybı, hafif yüzme kaybı ve yüzmede koordinasyonsuzluk, dış fiziksel veya görsel uyaranlara karşı tepki kaybı.

3. Seviye (***): *Hareketsizlik*: Tam denge kaybı, ağır yüzme kaybı, dış fiziksel veya görsel uyaranlara karşı tam tepki kaybı.

4. Seviye (****): *Çöküntü*: Tam denge kaybı ve tam hareketsizlik, dış fiziksel uyaranlara karşı tam tepki kaybı, solungaç hareketlerinde duraksama ve ona bağlı oksijensizlik (hypoxia), ileri safhalarda ölüm.

2.2. Japon balığının naylon torbalarda uzun süreli taşınmasında optimal stoklama oranı ve stoklamada karanfil yağı ilavesinin balığın yaşama oranına etkisi (II. Deneme)

Stoklamada 105x21 cm boyutunda naylon torbalar kullanılmıştır. Bağlanınca toplam hacmi 7 litre olan naylon torbalara 2 L su ilave edilmiş ve geri kalan kısmına saf oksijen gazı basılmıştır. Balıklar torbalara stoklanmadan 3 gün önce aç bırakılmıştır. Juvenil japon balıklarında stoklama ile ilgili yapılan ön çalışmalardan elde edilen verilerden hareket edilerek balıklar torbalara 80, 100 ve 120 adet/L stoklanmıştır. Taşımacılıkta genellikle anestezinin 1. veya 2. seviyeleri önerilmektedir (Prince ve Powel., 2000; Cooke vd., 2004). Dolayısıyla, I. Denemede karanfil yağının japon balığında 15 s uygulanmasında 2. anestezisi seviyesini veren 12 µL/L konsantrasyonu esas alınmıştır. Özet olarak japon balığının 3 stok grubundan (80, 100 120 adet/L) ve karanfil yağının iki konsantrasyonundan (0 ve 12 µL/L) oluşan iki faktörlü 6 deneme grubu oluşturulmuştur. Deneme grupları 3 tekerrürlü düzenlenmiştir. Torbalardaki su sıcaklığı 22°C' de sabit tutulmuştur. 15 saat deneme süresi sonunda balıklar anestezik içermeyen taze suya alınmış ve 96 saat gözlem sonunda ölüm oranları kaydedilmiştir. En uygun deneme grubunun tespitinde, en yüksek stoklama oranını ve en yüksek yaşama oranını veren grup dikkate alınmıştır.

Denemelerdeki bütün verilerin istatistik analizlerinde SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır. Stok yoğunluğunun ve karanfil yağı ilavesinin birbirlerinden bağımsız olarak yaşama oranı üzerindeki etkileri tek yönlü varyans analizini (one-way ANOVA) takiben Tukey testi ile 0,05 önem düzeyinde; ayrıca stok yoğunluğu ve karanfil yağı faktörlerinin yaşama oranı üzerindeki kombine etkisinin belirlenmesinde çok yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Çalışmanın yapılabilmesi için Çukurova Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (12.11.2020 tarih ve 8 sayılı toplantı) gerekli izin alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Karanfil yağının japon balığında kısa süre uygulanmasında optimal konsantrasyonun belirlenmesi

Karanfil yağının japon balıklarında 30 dk süre ile uygulanmasında anestezi etkisi ve yanıtları Tablo 1'de verilmiştir. Balıkların anesteziye giriş süresi konsantrasyonla ters orantılı, kendine gelme süresi ise dozla doğru orantılı olarak değişmiştir. Anesteziye giriş süresi 6 µL/L'de 11 dk iken, 48 µL/L'de 2 dk'ya düşmüştür. Bununla birlikte, kendine gelme süresi 6 µL/L'de 5 dk iken, 48 µL/L'de 13 dk'ya yükselmiştir. Diğer yandan, balıkların solunum sayısı, anestezinin konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır. Anestezi içermeyen suda balığın 73/dk olan solunum sayısı 36 µL/L'de 99/dk seviyesine kadar çıkmıştır. Ancak ölümlerin başladığı 42 ve 48 µL/L'de solunum sayısı aniden düşerek sırasıyla 27 ve 18/dk seviyesine inmiştir.

Karanfil yağının 6 ile 36 µL/L aralığındaki konsantrasyonları balıklarda hafif sedasyondan derin anesteziye kadar tüm anestezi seviyelerini oluşturmuştur. Karanfil yağının 36 µL/L konsantrasyonuna kadar balıklarda herhangi bir ölüm gözlenmezken, 42 ve 48 µL/L'de sırasıyla %13 ve %60 ölüm oranı gözlenmiştir. Ölümler dikkate alındığında, karanfil yağının japon balığında 30 dk sürede kullanılabilir güvenli konsantrasyonları amaca bağlı olarak 6 ile 36 µL/L arasında değişmektedir.

Tablo 1. Karanfil yağının farklı konsantrasyonlarının japon balığında kısa süreli (30 dk) anestezi etkisi ve yanıtları.

Karanfil yağı konsantrasyonu (µL/L)	Anesteziye giriş süresi (dk)	Kendine gelme süresi (dk)	Anestezi düzeyi	Solunum Sayısı (dk)	Ölüm oranı (%)
0	-	-	-	73±3,28 ^d	-
6	10,67±0,58 ^a	5,17±0,29 ^e	*	76±4,33 ^d	-
12	8,17±0,29 ^b	6,00±0,00 ^{de}	**	80±3,34 ^{cd}	-
18	6,33±0,29 ^c	6,17±0,29 ^{de}	**/**	87±3,40 ^{bc}	-
24	4,83±0,29 ^d	6,83±0,29 ^d	***	93±1,78 ^{ab}	-
30	4,17±0,29 ^d	8,33±0,58 ^c	***/**	98±3,63 ^a	-
36	3,00±0,00 ^e	9,17±0,29 ^c	****	99±6,32 ^a	-
42	1,83±0,29 ^f	10,83±0,58 ^b	****	27±7,12 ^e	13
48	1,50±0,00 ^f	13,00±0,50 ^a	****	18±5,96 ^f	60

*: 1.anestezi seviyesi, **: 2.anestezi seviyesi, ***: 3.anestezi seviyesi, ****: 4.anestezi seviyesi

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3). Her sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (P<0,05).

3.2. Karanfil yağının japon balığında uzun süre uygulamasında optimal konsantrasyonun belirlenmesi

Karanfil yağının 15 s sürede japon balığı üzerindeki anestezi etkisi ve yanıtları Tablo 2'de verilmiştir. Birinci denemede olduğu gibi, anestezinin konsantrasyonu arttıkça anesteziye giriş süresi kısalmış, kendine gelme süresi ise uzamıştır. Anestezi etkisinin görülmeye başladığı 6 µL/L'de anesteziye giriş süresi 11 dk iken, 24 µL/L'de 5 dk'ya düşmüştür. Balıkların kendine gelme süresi ise 6 µL/L'de 7 dk iken, konsantrasyonun artmasına paralel olarak artmış ve 24 µL/L'de 17 dk'ya

yükselmiştir. Diğer yandan, balıkların solunum sayısı, anestezinin konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır. Anestezi içermeyen suda balığın 74/dk olan solunum sayısı 18 $\mu\text{L/L}$ 'de 104/dk seviyesine kadar yükselmiştir. Ancak ölümlerin görülmeye başladığı 21 ve 24 $\mu\text{L/L}$ 'de solunum sayısı aniden düşerek 35 ve 16/d seviyesine inmiştir.

Karanfil yağının 3 $\mu\text{L/L}$ 'lik konsantrasyonu balıklarda herhangi bir anestezi etkisi göstermezken, 6 ile 24 $\mu\text{L/L}$ aralığındaki konsantrasyonları hafif sedasyondan derin anesteziye kadar tüm anestezi seviyelerini üretmiştir. Anesteziğin 18 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonlarına kadar herhangi bir ölüm olgusu görülmezken, 21 ve 24 $\mu\text{L/L}$ 'de sırasıyla %20 ve %87 ölüm oranı kaydedilmiştir. Mevcut ölümler dikkate alındığında, 15 s sürede karanfil yağının güvenli kullanılabilir konsantrasyonları amaca bağlı olarak 6 ile 18 $\mu\text{L/L}$ aralığında gözükmektedir.

Tablo 2. Karanfil yağının farklı konsantrasyonlarının japon balığında uzun süreli (15 s) anestezik etki ve yanıtları.

Karanfil yağı konsantrasyonu ($\mu\text{L/L}$)	Anesteziye giriş süresi (dk)	Kendine gelme süresi (dk)	Anestezi düzeyi	Solunum Sayısı (dk)	Ölüm oranı (%)
0	-	-	-	74 \pm 6,29 ^c	-
3	-	-	-	75 \pm 6,13 ^c	-
6	11,17 \pm 0,29 ^a	6,83 \pm 0,29 ^e	*	81 \pm 6,54 ^{bc}	-
9	9,50 \pm 0,50 ^b	9,17 \pm 0,29 ^d	*/**	85 \pm 6,54 ^{bc}	-
12	8,17 \pm 0,58 ^c	10,00 \pm 0,00 ^d	**	93 \pm 2,90 ^{ab}	-
15	6,83 \pm 0,29 ^d	12,00 \pm 0,50 ^c	***	101 \pm 6,07 ^a	-
18	6,17 \pm 0,29 ^{de}	14,33 \pm 0,58 ^b	***/*	104 \pm 10,02 ^a	-
21	5,50 \pm 0,00 ^{ef}	16,17 \pm 0,29 ^a	****	35 \pm 10,00 ^d	20
24	4,83 \pm 0,29 ^f	16,67 \pm 0,58 ^a	****	16 \pm 7,13 ^e	87

Veriler ortalama \pm Standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3). Her sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (P<0,05).

3.3. Japon balığının naylon torbalarda uzun süre taşınmasında optimal stoklama oranı ve stoklamada karanfil yağı ilavesinin balığın yaşama oranına etkisi

80, 100 ve 120 adet/L oranında stoklanıp karanfil yağına maruz bırakılan (12 $\mu\text{L/L}$) ve bırakılmayan (0 $\mu\text{L/L}$) japon balıklarının 15 s sürede naylon torbalarda taşınmasında, birbirlerinden bağımsız olarak stok yoğunluğunun balıkların yaşama oranı üzerine etkisi olmuş (P<0,05), ancak karanfil yağının bir etkisi olmamıştır (P>0,05). Diğer yandan, stok yoğunluğu ve karanfil yağının kombine olarak balıkların yaşama oranı üzerinde bir etkisi olmamıştır (P>0,05)(Tablo 3).

Tablo 3. Stok yoğunluğu ve anestezinin yaşama oranı üzerindeki kombine etkisinin iki yönlü varyans analiz sonuçları.

Varyasyon kaynağı	Tip III Kareler toplamı	Df	Kareler ortalaması	F	Sig.
Düzeltilmiş model	144,13	5	28,83	116,03	0,00
Intercept	168530,57	1	168530,57	678351,42	0,00
Doz	0,95	1	0,95	3,81	0,08
Stok	141,55	2	70,78	284,88	0,00
Doz*Stok	1,63	2	0,82	3,28	0,07
Hata	2,98	12	0,25	-	-
Toplam	168677,68	18	-	-	-
Düzeltilmiş toplam	147,11	17	-	-	-

R²=0,980 (Düzeltilmiş R²=0,971)

Karanfil yağı ilave edilmiş ve edilmemiş balıklarda yaşama oranı 80 adet/L stoklamada sırasıyla %99,17 ve 99,37; 100 adet/L stoklamada %98,33 ve 98,00; 120 adet/L stoklamada ise %93,47 ve 92,22 olarak belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Japon balıklarının naylon torbalarda 15 s taşınmasında stok yoğunluğu ve karanfil yağı ilavesine bağlı yaşama oranları.

Stok oranları (adet/L)	Karanfil yağı ilavesine bağlı yaşama oranları (%)	
	0 µl/L	12 µl/L
80	99,17±0,36 ^a	99,38±0,63 ^a
100	98,33±0,29 ^a	98,00±0,50 ^a
120	93,47±0,48 ^b	92,22±0,64 ^b

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3). Farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır (P<0,05).

Yaşama oranı bakımından 80 ile 100 adet/L stoklama arasında anlamlı bir fark görülmezken (P>0,05), 120 adet/L stoklama, 80 ve 100 adet/L stoklamaya göre daha düşük bir yaşama oranı göstermiştir (P<0,05). Özetle, balıkların 15 saat taşınmasında yaklaşık %7-8 oranında bir ölüme neden olduğu için 120 adet/L stoklama uygun değildir. Ancak %1 ve 2 ölümün görüldüğü 80 ve 100 adet/L stoklama grupları, balıkların 15 saat sürede taşınmaları için uygun gözükmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Balıkların bayılma ve ayılma süreleri ile solunum sayısı

Karanfil yağının konsantrasyonuna paralel olarak balıkların anesteziye giriş süresi 2 dk ile 11 dk arasında, kendine gelme süresi ise 5 dk ile 17 dk arasında değişmiş olup, anesteziye giriş süresi kendine gelme süresinden daha uzun zaman almıştır. Anesteziye maruz kalma süresinin anesteziye giriş süresine olan etkisi ise sınırlı olmuştur. Küçükosman (2019), aynı balık türünde karanfil yağının (80 µL/L), tarafımızdan belirlenen değerlerden daha düşük olarak anesteziye giriş ve kendine gelme sürelerini 1-5 dk aralığında bildirmiştir. Yapılan çalışmalarda karanfil yağının balıklarda anesteziye giriş ve kendine gelme süreleri, balık türüne göre oldukça değişkenlik göstermiştir. Örneğin gökkuşacağı alabalığında hafif anestezi seviyelerinde anesteziye giriş ve kendine gelme süresi sırasıyla 1,6 dk ve 4,9 dk; ağır anestezi seviyelerinde ise 3,7 dk ve 4,9 dk (Prince ve Powel, 2000), *Oncorhynchus nerka*' da 3 dk ve 10 dk (Woody vd., 2002); Sazan'da 3 dk ve 4 dk (Hajek vd., 2006); inci kefalinde (*Chalcalburnus tarichi*) 1-4 dk ve 3-8 dk (Şahin vd., 2019) olarak bildirilmiştir. Akvaryum balıklarından *Cichlosoma nigrofasciatum*, *Cyrtocara moorii*, *Labidochromis caeruleus*'da anesteziye giriş süreleri sırasıyla 2,97 dk, 3,16 dk ve 2,65 dk iken, kendine gelme süreleri 9,76 dk, 9,86 dk ve 9,96 dk olarak rapor edilmiştir (Han vd., 2016). Japon balıkları için tarafımızdan belirlenen kendine gelme süresi, yukarıda bahsedilen farklı balık türlerinde bildirilen sürelerden kısmen daha uzun gözükmektedir. Akbulut vd. (2011) tarafından bildirilen karanfil yağı konsantrasyonu ile anesteziye giriş süresi arasında negatif, anestezi konsantrasyonu ile kendine gelme süresi arasında pozitif bir ilişkinin olduğu, tarafımızdan yapılan çalışmada da gözlenmiştir. Ancak Waterstrat (1999), çalışmasında böyle bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüştür. Gerek tarafımızdan yapılan çalışmada, gerekse önceki çalışmalarda görüldüğü gibi, karanfil yağının balıklarda kendine gelme süresi, diğer anesteziyelere göre daha uzundur. Bu bir dezavantaj olarak ileri sürülse de (Munday ve Wilson, 1997), ölçüm, aşılama ve cerrahi uygulama gibi elle yapılan operasyonlarda daha uzun bir süreye olanak sağladığından bir avantaj olarak ta kabul edilebilir.

Balıkların solunum sayısı anestezi içermeyen suda 73/dk iken, karanfil yağı uygulanmış olanlarda anestezi konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak 104/dk'ya kadar yükselmiştir. Ancak ölümlerin başladığı konsantrasyonlarda solunum sayısı aniden düşerek 16-35 dk'ya kadar inmiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyonlardaki karanfil yağının balığın solunum sistemini felç ettiği ve mevcut

ölümlerin de olasılıkla bundan meydana geldiğini düşündürmektedir. Anestezik maddelerin genellikle balığın metabolizmasını yavaşlatacağı, dolayısıyla amonyak salınımı ve oksijen talebini düşüreceği varsayılır (McFarland, 1959; Pattanasiri ve Taparhudee, 2017). Ancak bunun aksine, çalışmamızda, balıkta metabolizmanın artmasının bir göstergesi olan solunum sayısında bir yükselme olmuştur. Diğer yandan, anestezik madde ilave edilmiş naylon torbaların suları anestezik içermeyenlere göre dışkıdan dolayı daha fazla bulanıklaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum, fenoksietanolün japon balıklarında uygulanmasında da bildirilmiştir (Yanar vd., 2020). Diğer yandan Kaiser vd. (2006), karanfil yağı ile anestezi edilen *Haplochromis obliquoidens* 'in sularında kontrol gurubuna göre daha fazla NH_4^+ ve NH_3 bulunduğunu rapor etmişlerdir. Molinero ve Gonzalez (1995) ise, bazı anesteziklerin, beklenenin aksine bazı balık türlerinde kimyasal strese neden olduğunu ileri sürmüştür. Sonuç olarak anesteziğin balığın solunum sayısını azaltıp, stok yoğunluğu üzerinde olumlu etki yapacağı hipotezi karanfil yağı ve japon balığı özelinde doğrulanmamıştır.

4.2. Karanfil yağının optimal konsantrasyonu

Karanfil yağının gerek 30 dk, gerekse 15 s uygulanmasında balıklardaki anestezik etkisi 6 $\mu\text{L/L}$ 'den itibaren başlamıştır. Herhangi bir yaşama kaybı olmadan, karanfil yağının 30 dk sürede 6 ile 30 $\mu\text{L/L}$ aralığındaki konsantrasyonları, 15 s sürede ise 6 ile 18 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonları balıklarda en hafiften en ağırına kadar tüm anestezi seviyelerini üretmiştir. Hangi konsantrasyonların seçileceği ise uygulamacının hangi anestezi seviyesini amaçladığına göre değişecektir. Küçükosman (2019), karanfil yağının juvenil japon balıklarında kısa süreli uygulanmasında en uygun konsantrasyonunu 80 $\mu\text{L/L}$ olarak tespit etmiştir. Bu konsantrasyon, tarafımızdan kısa sürede derin anestezi için tespit edilen optimal konsantrasyonun (30 $\mu\text{L/L}$) çok üzerindedir. Bu fark, su kalitesi veya araştırmada kullanılan karanfil yağının saflık derecesiyle ilgili olabilir. Japon balığı ile aynı aileden olan sazanda ise karanfil yağının önerilen konsantrasyonu, uygulama süresine bağlı olarak 15 ile 100 $\mu\text{L/L}$ arasında değişmektedir (Hikasa vd., 1986; Hamackova vd., 2002; Velisek vd., 2005b). Diğer balık türleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise önerilen konsantrasyon 9 ile 80 $\mu\text{L/L}$ arasında bildirilmiştir (Keene vd., 1998; Taylor, 1999; Waterstrat, 1999; Soto ve Burhanuddin, 1995; Grush vd., 2004; Velisek vd., 2005a; Kaiser vd., 2006; Dolezelova vd., 2011; Koçak ve Can, 2019; Şahin vd., 2019). Literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi, karanfil yağının önerilen konsantrasyonları, balık türüne, uygulama süresine, su kalitesine (özellikle sıcaklık) göre değişmektedir. Dolayısıyla karanfil yağının önerilen konsantrasyonları yaklaşık bir seviye verir. Geniş balık kitlelerine uygulanmadan önce ise bunun az sayıda balıklara test edilerek revize edilmesi gerekir. Diğer yandan, konsantrasyon arzu edilen anestezi seviyesine göre değişir. Genellikle ölçme, aşılama ve sağım ve gibi balıkların hareketsizleştirilmesi gereken durumlarda 1. veya 2. anestezi seviyesi amaçlanmalıdır. Bulgularımıza göre, bunun için süreye bağlı olarak karanfil yağının 6 ile 12 $\mu\text{L/L}$ arası konsantrasyonları kullanılabilir. Cerrahi operasyonlar gibi daha derin anestezi gerektiren durumlarda ise 3. anestezi seviyesinin amaçlanması daha doğru olur. Bunun için ise karanfil yağının süreye bağlı olarak 15 ile 24 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonları kullanılabilir.

Karanfil yağının 30 dk uygulanmasında 42 ve 48 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonları sırasıyla %13 ve %60; 15 s uygulanmasında ise 21 ve 24 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonları sırasıyla %20 ve %87 ölüme neden olduğu için, karanfil yağı bu konsantrasyonların altında kullanılmalıdır. Kaiser vd. (2006), karanfil yağının güven aralığının dar olduğuna işaret etmiştir. Velisek vd. (2005a), karanfil yağının terapötik indeksini (toksik konsantrasyon/terapötik konsantrasyon) alabalıkta 2,7 gibi oldukça düşük bir değerde hesaplamıştır. Tarafımızdan yapılan çalışmada LC50 değerine odaklanılmadığı için güven aralığı hesaplanmamıştır. Ancak eldeki bulgulardan, etkili konsantrasyon ile ölümlerin başladığı letal konsantrasyon arasındaki bandın dar olması dikkat çekicidir. Özet olarak, karanfil yağı pek çok üstün özellikleri nedeniyle su ürünleri yetiştiriciliğinde veya balıkçılık faaliyetlerinde kullanılabilir nitelikte bir anestezik maddedir. Ayrıca organik balık yetiştiriciliği için de güçlü bir seçenektir.

4.3. Balıkların taşınmasında optimal stoklama yoğunluğu

Stok yoğunluğu balığın yaşama oranı üzerinde beklenildiği gibi önemli bir etki yapmış, ancak taşıma suyuna karanfil yağı ilavesinin bir etkisi olmamıştır. Diğer yandan bu iki faktör balığın yaşama oranı üzerinde kombine olarak anlamlı bir etki yapmamıştır ($P>0.05$). Japon balıklarının 15 s naylon torbalarda taşınmasında, 80 ve 100 adet/L stoklama oldukça düşük bir ölüm oranı (%1-2) verdiği için, en uygun stoklama olarak gözükmektedir. 120 adet/L grup daha yüksek bir stoklama olanağı sağlasa da, kayda değer bir ölüm oranına (%7-8) neden olduğu için kullanılması uygun görünmemektedir. Karanfil yağı ilavesi ise taşımada olumlu bir etki yaratmamıştır. Bunun olası nedenleri, daha önceki alt başlıklarda da değinildiği gibi, anesteziğin balığın solunum sayısını arttırması ve buna bağlı olarak suyun bulanıklaşmasından (dışkılamadan) dolayı su kalitesinin kötüleşmesidir. Sonuç olarak japon balıklarının oksijen gazı basılmış naylon torbalarda 15 s süreli taşınmasında maksimum stoklama yoğunluğu 80 veya 100 adet/L olmalıdır. Karanfil yağının ise taşımada balığın stoklama yoğunluğu üzerinde bir etkisi olmadığı için kullanılması gerekli değildir. Yanar vd. (2020) tarafından japon balıklarının 15 s süreli taşınmasında en uygun stoklama yoğunluğu 60 adet/L, biyomas olarak ise 232 g/L olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise uygun stoklama 80 ve 100 adet/L veya biyomas olarak 332 ve 416 g/L'dir. Dolayısıyla aynı türde ve aynı sürede yukarıda anılan çalışmada uygun stoklama 232 g/L olarak bildirilirken, çalışmamızda bu değer 332-416 g/L seviyesindedir. Aradaki bu farkın nedeni, olasılıkla sıcaklık koşullarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Çalışmamızda taşıma su sıcaklığı 22 °C'de, anılan çalışmada ise 24 °C'de tutulmuştur. Sonuç olarak, bu deneme koşullarına göre, karanfil yağı kullanmaksızın 3/4 oksijen gazı basılmış naylon torbalarda, balıkların 3 gün aç bırakılması durumunda 15 saat sürecek taşımada litreye 80-100 adet (veya 332-416 g) SM boy büyüklüğünde (4,16 g) japon balığı stoklamak, %98-99 yaşama oranıyla en uygun stoklama olarak gözükmektedir.

FİNANS

Bu çalışma yüksek lisans tezinden üretilmiş ve FYL-2019-12032 no ile Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

YAZAR KATKILARI

Kurgu: MY; Metodoloji: MY; Deneyin gerçekleştirilmesi: KG, EE; Veri analizi: KG, EE; Makale yazımı: MY, KG, EE; Denetleme: MY. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

ETİK ONAY BEYANI

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (SABİDAM) 09.09.2020 tarihli, 6 nolu toplantısındaki onayı doğrultusunda yürütülmüştür.

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

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

KAYNAKLAR

Abdolazizi, S., Ghaderi, E., Naghdi, N., & Kamangar, B. (2011). Effects of clove oil as an anesthetic on some hematological parameters of *Carassius auratus*. *Aquaculture Research and Development*, 2 (1), 1-3. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000108>

- Akbulut, B., Çakmak, E., Aksungur, N., & Çavdar, Y. (2011). Effect of exposure duration on time to recovery from anaesthesia of clove oil in juvenile of russian sturgeon. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(3), 463-467. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v11_3_17
- Bennett, W. A., & Beitinger, T. L. (1997). Temperature tolerance of the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Copeia*, (1), 77-87. <https://doi.org/1447842>
- Briozzo, J., Nuncez, L., Chirife, J., Herzage, L., & D'Aquino, M. (1989). Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 69-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02456.x>
- Bullerman, L. B., Lieu, F. Y., & Seier, S. A. (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, 42(4), 1107-1116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb12677.x>
- Chellapan, A., Rajagopalsamy, C. B. T., & Jasmine, G. I. (2013). Effect of clove oil and benzocaine on the respiratory metabolism of angel fish *Pterophyllum scalare*. *Indian Journal Science Technology*, 6(7), 4853-4861.
- Cooke, S. J., Suski, C. D., Ostrand, K. G., Tufts, B. L., & Wahl, D. H. (2004). Behavioral and physiological assessment of low concentrations and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 239, 509-529. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.028>
- Dolezelova, P., Macova, S., Plhalova, L., Pistekova, V., & Svobodova, Z. (2011). The acute toxicity of clove oil to fish *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Acta Veterinaria Brno*, 80, 305-308. <https://doi.org/10.2754/avb201180030305>
- FAO, (2014). Ornamental fish. Food and agriculture organization of the United Nations. Fisheries and aquaculture department. www.fao.org/fishery/topic/13611/en (accessed 18 December 2014)
- Fischer, I. U., Unruh, G. E., & Dengler, H. J. (1990). The metabolism of eugenol in man. *Xenobiotica*, 20, 209-222. <https://doi.org/10.3109/00498259009047156>
- Ghosh, A., Mahapatra, B. K., & Datta, N. C. (2003). Ornamental fish farming-successful small scale aqua business in India. *Aquaculture Asia*, 8(3), 14-16.
- Grush, J., Noakes, D. L. G., & Moccia, R. D. (2004). The Efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1), 46 - 53. <https://doi.org/10.1089/154585404774101671>
- Hajek, G. J., Klyszejko, B., & Dziaman, R. (2006). The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica Piscatoria*, 36(2), 93-97.
- Hamackova, J., Sedova J. M., Pjanova S. V., & Lepicova, A. (2002). The effect 2-phenoxyethanol, clove oil and propiscin anaesthetics on perch (*Perca fluviatilis*) in relation to water temperature. *Czech Journal of Animal Science*, 46(11), 469-473.
- Han, M. C., Sağlıyan, A., & Polat, E. (2016). Akvaryum balıklarında karanfil yağının anestezi etkisinin araştırılması, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5(1), 12-17.
- Hekimoğlu, M. A., & Ergun, M. (2012). Evaluation of clove oil as anaesthetic agent in fresh water angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Pakistan Journal Zoology*, 44(5), 1297-1300.
- Hikasa, Y., Takase, K., Ogasawara, T., & Ogasawara, S. (1986). Anaesthesia and recovery with tricain methansulfonate, eugenol and thiopental sodium in carp, *Cyprinus carpio*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 48(2), 341-351. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.48.341>
- Kaiser, H., Brill, G., Cahill, J., Collett, P., Czypionka, K., Green, A., Orr, K., Patrick, P., Scheepers, R., Stonier, T., Whitehead, M. A., & Yearsley, R. (2006). Testing clove oil as an anaesthetic for long-distance transport of live fish: the case of the Lake Victoria cichlid *Haplochromis obliquidens*. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 510-514. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00786.x>

- Kamacı, H. O., Süzer, C., Çoban, D., Özdilek, G., Saka, Ş., & Fırat, K. (2009). *Levrek (D. labrax) juvenillerinde tuzluluk değişimlerinin anestezi uygulamalarına olan etkileri: Karanfil yağı örneği*. 15. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Rize, Türkiye.
- Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29, 89-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x>
- Koçak, V., & Can, E. (2019). 2-Fenoksietanol ve karanfil esansiyel yağının sarı prenses (*Labidochromis caeruleus*) ve ahli (*Sciaenochromis fryeri*) balıkları üzerine anestetik etkileri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 12 (2), 13-21.
- Kolarova, J., Svobodova, Z., Nepechalova, L., Velisek, J., & Piackova, V. (2006). Anaesthesia of fish in Czech Republic. *Bulletin VURH Vodnany*, 42, 105-108.
- Kramer, R. E. (1985). Antioxidants in clove. *Journal of American Oil Chemist Society*, 62, 111-113. <https://doi.org/10.1007/BF02541505>
- Küçükosman, N. (2019). *Karanfil (Eugenia caryophyllata), nane (Menta piperita) ve lavanta (Lavandula angustifolia) bitkilerinden elde edilen esansiyel yağların japon balıklarında (Carassius auratus, linnaeus, 1758) anestetik etkilerinin araştırılması ve uygun dozun belirlenmesi*. [Yüksek lisans tezi, Ordu üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü].
- Marking, L. L., & Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10(6): 2-5. [https://doi.org/10.1577/1548-8446\(1985\)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8446(1985)010<0002:ABANIF>2.0.CO;2)
- Maura, A., Pino, A., & Ricci, R. (1989). Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. *Mutation Research Letters*, 227(2), 125-129. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(89\)90008-0](https://doi.org/10.1016/0165-7992(89)90008-0)
- McFarland, W. N. (1959). A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes. Publication of the Institute of Marine Science, University of Texas at Austin, 6, 23-55.
- Moliner, A., & Gonzalez, J. (1995). Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111, 405-414. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)00037-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00037-8)
- Munday, P. L., & Wilson, S. K. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Biology*, 51, 931-938. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01532.x>
- Mylonas, C. C., Cardinaletta, G., Sigelaki, I., & Polzonetti-Magni, A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of european sea bass *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream *Sparus aurata* at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1-4), 467-481. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.046>
- Otay, T., Küçükgül, A., Pala, A., & Şeker, E. (2014). Sazan balıklarının anesteziinde karanfil kullanımı. *Bilim ve Gençlik Dergisi*, 2(1), 43-50.
- Öğretmen, F., & Gökçek, K. (2013). Comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 51-56. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13_1_07
- Pattanasiri, T., & Taparhudee, W. (2017). Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquaculture International*, 25, 163-175. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0020-2>
- Perdikaris, C., Nathanailides, C., Gouva, E., Gabriel, U. U., Bitchava, K., Athanasopoulou, F., Paschou, A., & Paschos, I. (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). *Acta Veterinaria Brno*, 79, 481-490. <https://doi.org/10.2754/avb201079030481>

- Prince, A., & Powell, C. (2000). Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 20, 1029-1032. [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(2000\)020<1029:COAAAF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8675(2000)020<1029:COAAAF>2.0.CO;2)
- Raghavan, R., Dahanukar, N., Tlustý, M. F., Rhyne, A. L., Kumar, K. K., Molur, S., & Rosser, A. M. (2013). Uncovering an obscure trade: Threatened freshwater fishes and the aquarium pet markets. *Biological Conservation*, 164, 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.04.019>
- Ross, L. G., & Ross, B. R. (2008). *Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Blackwell, Oxford, 218 s.
- Siddiqui, Y. M. (1996). Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type I and Newcastle disease virus. *Medical Sciences Research*, 24, 185-186.
- Simoës, L. N., Lombardi, D. C., Gomide, A. T. M., & Gomes, L. C. (2011). Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. *Zoologica*, 28, 285-290. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702011000300001>
- Soto, C. G., & Burhanuddin (1995). Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136, 149-152. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01051-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01051-3)
- Stecchini, M. L., Sarais, I., & Giavedoni, P. (1993). Effects of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection*, 56(5), 406-409. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.5.406>
- Stoskopf, M. (1993). Anaesthesia. In Brown, L., (Eds.), *Aquaculture for Veterinarians* (pp. 161-167), Oxford: Pergamon Press.
- Summerfelt, R. C., & Smith L. S. (1990). Anesthesia, surgery and related techniques. In C.B. Schreck & P.B. Moyle (Eds.), *Methods for Fish Biology* (pp. 213-272), American Fisheries Society, Bethesda, MD, USA.
- Şahin, A., Kankaya, E., Yılmaz, O., Türel, İ., & Öner, A. C. (2019). Anesthetic activity of clove oil (Eugenol) on the Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811). *Van Veterinary Journal*, 30(3), 175-176. <https://doi.org/10.36483/vanvetj.598527>
- Taylor, S. D. (1999). Clove Oil: An alternative anaesthetic for aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, 61, 150-155. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(1999\)061<0150:COAAAF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(1999)061<0150:COAAAF>2.0.CO;2)
- Tlustý, M. F., Rhyne, A. L., Kaufman, L., Hutchins, M., Reid, G. M., Andrews, C., Boyle, P., Hemdal, J., Mcgilvray, F., & Dowd, S. (2012). Opportunities for public aquariums to increase the sustainability of the aquatic animal trade. *Zoo Biology*, 32, 1-12. <https://doi.org/10.1002/zoo.21019>
- Tort, L., Puigcever, M., Crespo, S., & Padros, F. (2002). Cortisol and haematological response in eel bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, 33, 907-910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00741.x>
- Türkmen, G., & Çelik, İ. (2014). Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan akvaryum balık türleri konusunda ön çalışma, Ulusal Akvaryum Balıkçılığı ve Sorunları Çalıştayı, 44-51 s. 30-31 Ekim 2015, Antalya.
- Velisek, J., Svobodova, Z., & Piackova, V. (2005a). Effect of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 74, 139-146.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., & Nepejchalova, L. (2005b). Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 50(6), 269-275.

- Waterstrat, P. R. (1999). Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), 250-255. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00872.x>
- Weber, R. A., Peleteiro, J. B., Garcia Martin, L. O., & Aldegunde, M. (2009). The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, 288, 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.024>
- Woody, C. A., Nelson, J., & Ramstad, K. (2002). Clove oil as anaesthetic for adult Sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, 60, 340-347. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00284.x>
- Yanar, M., Öter, H. H., & Evliyaoğlu, E. (2020). Fenoksietanol ve açlık süresinin japon balığının (*Carassius auratus*) taşınmasında stok miktarına etkisi. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6), 1554-1560. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.658550>
- Yoshikawa, H., Ishida, Y., Ueno, S., & Mitsuda, H. (1988). Changes in depth of anesthesia of the carp anesthetized with a constant level of CO₂. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(3), 457-462. <https://doi.org/10.2331/suisan.54.457>
-

Evaluation of the Nutritional Quality of Farmed Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Based on Fatty and Amino Acids Profile

Çiftlikte Yetiştirilen Sazan Balığının (*Cyprinus Carpio* L.) Besinsel Kalitesinin Yağ ve Amino Asit Profiline Göre Değerlendirilmesi

Arafat R. Ahmed^{1,*} 

¹Department of Biological Development, Marine Science Centre, University of Basrah, Iraq

*Corresponding author: arafat.ahmed@uobasrah.edu.iq

Received: 13.07.2021

Accepted: 11.03.2022

Published: 01.06.2022

How to Cite: Ahmed, R. A. (2022). Evaluation of the nutritional quality of farmed common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on fatty and amino acids profile. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 159-167. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.971039>

Abstract: The common carp (*Cyprinus carpio*) is the main species of carp being cultured in mid and southern Iraq. The consumer believes that the farmed fish is less nutritious than the wild fish, which affects its market value. The current study was designed to investigate the nutritional value of the common carp cultivated in the Basrah province based on the fatty and amino acid profile. Fatty acids were determined by Gas chromatography (GC), while an Amino Acid Analyzer was used for the determination of amino acids. The results revealed that the tested fish is rich in polyunsaturated fatty acids (especially essential omega-3 fatty acids), including α -linolenic acid (14.08±3.92%), docosahexaenoic acids (7.98 ±2.82 %), and eicosapentaenoic acid (2.81 ±0.34 %). Seven essential amino acids which are significant for the human body and the other ten non-essential amino acids were identified in the samples tested. Thus, it was established that the nutritional value of the farmed *Cyprinus carpio* is not less than the wild fish of the same species or family.

Özet: Sazan (*Cyprinus carpio*), orta ve güney Irak'ta yetiştirilen başlıca sazan türüdür. Tüketici, pazar değerini etkileyen çiftlik balıklarının, yabani balıklardan daha az besleyici olduğunu düşünmektedir. Çalışma, Basra İli'nde yetiştirilen sazan balığının besin değerini yağ ve amino asit profiline dayalı olarak araştırmak için tasarlanmıştır. Yağ asitleri, gaz kromatografisi (GC) ile belirlenirken, amino asitlerin belirlenmesi için bir Amino Asit Analizörü kullanıldı. Sonuçlar, test edilen balığın α -linolenik asit (%14.08±3.92), dekosahexaenoik asitler (%7,98 ±2.82) ve eikosapentaenoik asit (2.81 ±) dahil olmak üzere çoklu doymamış yağ asitleri (özellikle esansiyel omega-3 yağ asitleri) açısından zengin olduğunu ortaya koydu. %0.34). Test edilen örneklerde insan vücudu için önemli olan yedi esansiyel amino asit ve diğer on esansiyel olmayan amino asit tespit edildi. Böylece çiftlikte yetiştirilen *Cyprinus carpio*'nun besin değerinin aynı tür veya familyaya ait yabani balıklardan daha az olmadığı tespit edilmiştir.

Keywords

- Common carp
- Farmed fish
- Fatty acid
- Amino acids

Anahtar kelimeler

- Sazan
- Çiftlik balıkları
- Yağ asidi
- Amino asitler

1. INTRODUCTION

The content of fatty acids, amino acids, vitamins, and minerals in meat reflects its nutritional value and its impact on human health (Sarma et al., 2013). Fishes are the primary source of polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic (DHA) (an essential omega-3 fatty acid) in humans (Vannice and Rasmussen, 2014). Omega-3 is necessary for cardiovascular and brain health



(Bennett et al., 2018). Besides, omega-3 plays a beneficial role in a few human pathologies, such as obesity and type-2 diabetes (Sokoła-Wysocza'nska et al., 2018).

It has been reported that fish protein intake is useful in regulating blood cholesterol levels and positively influences patients with hypercholesterolemia (Hosomi et al., 2011). Dale et al. (2019) suggested that fish proteins may enhance the gut microbiota composition, and affect body weight, and lipid status in humans. The amino acid composition is one of the most important nutritional qualities of the protein (FAO/WHO, 1990).

In general, common carp (*C. carpio*) is a good source of fat-soluble vitamins and n-3 polyunsaturated fatty acid (Stancheva et al., 2014), and can be recommended for consumers as a high-quality protein diet (Mohanty et al., 2014)

The aquaculture industry has become an essential and rapidly growing industry providing fish for human consumption. Carp is the most important fish species cultured worldwide, and 97.3% of its global production is originated from aquaculture (Karnai and Szűcs, 2018). Farmed carp species contributed (26 percent) to total Near East and North Africa aquaculture output in 2014 (FAO, 2015). Iraq is considered a medium-scale producer, with an annual production of 5.000 to 35.000 tonnes (El-Sayed, 2015). The common carp (*C. carpio*) is the major species currently cultured in mid and southern Iraq. In Basrah, the number of licensed fish farms increased to 327 farms in 2016 to provide protein to the growing community (Ahmed et al., 2020). However, there is a preference among some consumers for wild fish (Runge et al., 2021). This is because the nutritional value of wild fish is thought to be higher than that of farm-raised fish (López-Mas et al., 2021). In Basrah, the consumer has the same perception about the farm-raised carp, which affects its market value. Therefore, the current study was designed to investigate the quality of farmed carp meat depending on fatty and amino acid profile compared to the wild fish caught from the local or external water bodies.

2. MATERIALS and METHODS

In the present study, fishes were reared in (12× 3× 2) m³ tanks made from an iron frame, lined on the inside with thick fabrics made from a waterproof material. The farming process started by placing 3000 fish in each tank with an initial weight of 100 g per fish, and fishes were fed on processed imported feed (floating pellets). The feed ingredients include fish meal, amino acids, vitamins, minerals, antioxidants, and fungicide. The calculated analysis (crude protein = 28%, crude fat = 4.0%, crude fiber = 4.0%) was as recorded on the feed package. The fish were fed to satiation daily during the rearing period.

2.1. Samples Collection

A total of 15 adults fresh common carp (*C. carpio*) samples were obtained from a local farm in Basrah Province, southern Iraq. The fish samples were stored in an icebox and brought to the laboratory at the Marine Science Center, University of Basrah, Iraq. The length of the fish was measured from tip to tail using a measuring board. The weight was measured using a QUA electronic scale (China), and the individual data of the fish were recorded. The fish samples were divided into three groups (five fish in each group). Samples were cleaned using a stainless-steel knife; the edible part of fish tissue from the body's dorsal side was taken without skin and cut into small pieces. Muscle samples of each group (five fish) were mixed and stored in plastic containers, labeled, and kept in a refrigerator at -20 °C until further analyses.

2.2. Proximate Composition Analyses

The proximate composition of the fish meat was determined according to the AOAC protocol (AOAC, 1990). Moisture content was determined by drying the sample in an oven at 105 °C until a constant weight

was obtained. Crude ash was determined by incineration in a muffle furnace at 550 °C for 24 hrs. Crude protein content was determined by the Kjeldahl method, and a conversion factor of 6.25 was used to convert the total nitrogen to crude protein. Crude fat was determined by the Soxhlet extraction method.

2.3. Fatty Acids Analysis

Total lipids in fish meat were determined by the ISO standard method (2000). After acid hydrolysis of the sample with hydrochloric acid, lipids were extracted from the fish meat with petroleum ether. Fatty acids were extracted with a mixture of n-hexane and isopropanol (60, 40, v/v). The extracts were collected, and the solvent was removed. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared by dissolving lipid extract with tertbutyl methyl ether. Transesterification was performed by 0.25 M trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH) in methanol. FAMES were analyzed by Gas chromatography (GC)-17 A- Shimadzu/Class GC 10, (column: 30 m ×0.25 mm I.D., 0.5 µm film thickness. Flame ionization was detected at 210 °C; carrier gas nitrogen at a flow rate of 1.0 ml/min; injector temperature at 210 °C; oven temperature programmed from 180 to 250 °C). Quantitative data were calculated using the peak area ratio (% total fatty acids).

2.4. Amino Acids Analysis

The amino acids were analyzed depending on the method described by Osibona et al., (2009). Briefly, 0.5 g of sample was weighed into a 100 ml flask. Norleucine standard solution (1ml) and 5 ml of performic acid were added to the sample in an ice bath. Sodium metabisulphite (0.84g) and 6N HCl (30 ml) with anti-bumping granules were added, and the oxidation process was carried out in a fridge for 16 hrs. The mixture was allowed to cool, 30 ml of 4 M lithium hydroxide was added, and the mixture was left to hydrolyze for 24 hrs in a bath set at 130°C. The pH was adjusted to 2.1, and the combination was made up of 100 ml of deionized water. About 5 ml of the sample was filtered through a 2 µm filter, and the product was run through an Amino Acid Analyzer LC3000 (Eppendorf-Bio-tronik; Germany). Replicate determinations were carried out on each sample.

2.5. Statistical Analysis

Data are the mean values of two replicates ±SD. Microsoft Excel 2019 for Windows was used to calculate the mean and standard deviation.

3. RESULTS

The mean length of the tested fish is 29.5 ± 2.8 cm, and the mean weight is 750 ± 63 g. The proximate composition of the farmed common carp muscle is shown in Table 1. Crude protein, crude fat, moisture, and crude ash contents of the carp muscle were 22.08 %, 3.24%, 70.2%, and 2.12%, respectively.

Table 1. Proximate composition of the common carp muscle. Values are mean ±SE from duplicate determination.

Crude protein (%)	Crude fat (%)	Moisture (%)	Crude ash (%)
22.08±0.64	3.24±0.31	70.2±0.32	2.12±0.04

The fatty acid composition as a percentage of the common carp's total fatty acids is summarized in Table 2.

Table 2. Fatty acids quality indices in the muscles of farmed common carp (*C. carpio*) and their comparison with the results of other studies (% of total fatty acids). Values for the current study are mean SD from duplicate determination.

	Fatty Acid Name	Chemical Formula	This Study	1	2	3	4	5	6	7
SFA	Myristic acid	C14:0	3.64±1.05	2.02	1.23	1.69	1.07	2.27	2.87	-
	Palmitic acid	C16:0	17.38±2.13	16.18	29.03	14.97	17.11	35.19	19.4	16.98
MUFA	Oleic acid	ω-9/C18:1	21.66±3.05	25.11	36.53	22.23	32.35	14.84	30.2	34.45
n-3 PUFA	α-Linolenic acid (ALA)	ω-3/C18:2	14.08±3.92	3.9	11.34	2.95	15.1	10.04	8.79	22.57
	Eicosapentaenoic acid (EPA)	C20:5	2.81±0.34	4.75	0.93	4.36	1.93	ND	1.36	0.93
	Docosahexaenoic acid (DHA)	C22:6	7.98±2.82	11.6	1.63	8.37	2.89	5.13	0.87	1.86
n-6 PUFA	Linoleic acid	ω-6/C18:3	3.66±0.76	0.33	1.8	0.53	2.64	0.24	0.23	2.12
	Arachidonic acid	C20:4	8.45±2.17	5.5	0.75	5	3.09	3.62	2.42	1.44
ΣSFA			21.02±2.11	18.2	30.26	16.66	18.18	37.46	22.27	16.98
ΣMUFA			21.66±3.05	25.11	36.53	22.23	32.35	14.84	30.2	34.45
ΣPUFA			36.98±2.00	26.08	16.45	21.21	25.65	19.03	13.67	28.92
ΣPUFA/ΣSFA			1.75±2.05	1.43	0.54	1.27	1.41	0.50	0.61	1.70
Σn-3			24.87±2.36	20.25	13.9	15.68	19.92	15.17	11.02	25.36
Σn-6			12.11±1.46	5.83	2.55	5.53	5.73	3.86	2.65	3.56
n-3/ n-6			2.04±1.09	3.47	5.45	2.83	3.47	3.93	4.15	7.12
EPA+ DHA			10.79±1.72	16.35	2.56	12.73	4.32	5.13	2.23	2.79
Total fatty acids			79.66±2.38	69.39	83.24	60.1	76.18	71.33	66.14	80.35
Unidentified			20.34	30.61	16.76	39.9	23.82	28.67	33.86	19.65

Saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA).

Swapna et al., 2010 (the tested fish were purchased from the market).

1-Stancheva and Merdzhanova (2011) source of fish/ Dam Lake –Bulgaria (wild fish).

2-Yeganeh et al., 2012 wild fish from the Caspian Sea (values are the mean of 4 seasons).

3-Yeganeh et al., 2012 farmed fish (values are the mean of 4 seasons).

Note: Yeganeh et al., 2012 tested wild and farmed fish in the same study.

4-Sarma et al., 2013 wild fish from Bhimtal lake, India.

5-Ljubojević et al., 2013 wild fish from Danube River.

6-Ljubojević et al., 2017 farmed fish fed on feed mixture.

The amino acid composition (% of total protein) is presented in Table 3. Seventeen different amino acids were determined in the edible parts of the common carp (*C. carpio*). Seven essential amino acids that are very important for the human body and ten other non-essential amino acids were detected in the samples tested, as presented in Table 3.

Common carp protein contained a high amount of essential amino acids Tryptophan = 4.64 ± 0.98 g/100g of crude protein, followed by threonine, valine, phenylalanine, leucine, histidine, isoleucine in decreasing level.

Table 3. Amino acid profile of common carp (*C. carpio*) g/100g of crude protein (mean value \pm SD).

Amino acids	Results of the current study	Sarma et al., 2013	Mohanty et al., 2014	Pyz-Łukasik & Kowalczyk-Pecka, 2017	Pyz-Łukasik & Kowalczyk-Pecka, 2017
Essential amino acid	Common carp Farmed	Common carp Wild	Common carp Wild	Grass carp Wild	Bighead carp Wild
Tryptophan	4.64 ± 0.98	0.06	0.8	3.02	3.04
Threonine	4.57 ± 1.66	0.41	0.9	4.75	4.71
Valine	4.44 ± 0.97	0.52	1.30	4.91	4.93
Phenylalanine	3.83 ± 1.09	0.33	0.7	3.97	4.02
Leucine	3.51 ± 0.41	0.76	1.6	7.81	7.89
Histidine	3.39 ± 1.07	0.29	0.4	2.69	2.67
Isoleucine	3.38 ± 0.83	0.42	0.8	4.28	4.24
Σ EAA	27.76	2.79	6.5	31.43	31.5
Non-essential amino acid					
Aspartic acid	12.23 ± 2.68	2.72	6.2	10.30	10.28
Glycine	5.84 ± 0.93	1.49	3.2	5.45	5.67
Glutamic acid	5.01 ± 0.77	1.90	4.2	15.06	15.11
Serine	4.54 ± 1.39	2.44	5.5	4.17	4.21
Glutamine	4.82 ± 0.96	2.44	4.2	-	-
Arginine	4.58 ± 0.63	1.01	2.1	6.59	6.63
Alanine	2.91 ± 0.73	1.55	3.70	6.09	6.20
Asparagine	0.96 ± 0.02	0.13	-	-	-
Serine	4.54 ± 1.76	2.44	5.5	4.17	4.21
Tyrosine	5.10 ± 1.14	0.33	0.8	3.26	3.35
Σ NEAA	50.53	16.45	35.4	55.09	55.66
Σ EAA / Σ NEAA	0.48	0.47	0.47	0.48	0.48

4. DISCUSSION

In the present study with farmed common carp, the results of the body composition are close to those recorded by Al-Humairi et al. (2019) on the wild common carp caught from the Iraqi waters. Hossain (2011) reported that farmed fish can provide the consumers with a nutritional composition that is at least as beneficial as that provided by the wild fish when those fishes were raised under appropriate conditions and dietary regimes.

The current study included measuring the essential fatty acids in the muscles of the common carp, which play a positive role in improving human health. Due to the absence of local studies related to the nutritional value of the *C. carpio*, the results of the current research (fatty and amino acids values) were compared with the results of other studies that were conducted on farmed or wild *Cyprinus carpio* caught from natural waters in different areas around the world.

In the current study, the myristic acid recorded a high value, while the palmitic and oleic acid values were within the levels recorded in the fish tested in other studies (Table 2). The fatty acid composition varies even among fish belonging to the same species or family due to the differences in age, season, different environmental factors, geographic location, reproductive status, culture systems, and diet composition (Alasalvar et al., 2002; Memon et al., 2011; Ljubojević et al., 2013). The percentage of α -linolenic acid in the tested samples (mean value = 14.08 ± 3.92) was within the values recorded by studies mentioned in Table 2. All freshwater fish use α -linolenic acid as a precursor to producing EPA and DHA acid (Sargent et al., 2002). The common carp from the present study was a good source of EPA (2.81 ± 0.34) and DHA (7.98 ± 2.82).

Since terrestrial plants and animals have relatively low levels of EPA and DHA, this index (EPA+DHA) is usually used to evaluate the nutritional value of seafood, mainly fish. In this study, the EPA+DHA index (10.79%) was within the range reported by other researchers (Table 2). The ratio of ω -3 to ω -6 fatty acids in the current study was lower than in other studies. However, daily intake (about 500 mg) of EPA+DHA/day is enough to meet an adult requirement, according to ISSFAL, (2004).

This investigation has indicated that the farmed common carp was rich in linoleic acid which is in line with the findings of (Yeganeh et al., 2012) and (Ljubojević et al., 2017) on farmed fish. All freshwater fish can convert linoleic acid to arachidonic acid (Sargent et al., 2002). The percentage of arachidonic acid in our tested fish was high compared to the values recorded by other studies. The current results indicate that humans can consider the farmed common carp as a good source of polyunsaturated fatty acids, which may originate from the feed (Memon et al., 2011).

A PUFA/SFA index is normally used to assess the effect of diet on cardiovascular health. It has been reported that all PUFAs can lower low-density lipoprotein cholesterol and lower serum cholesterol levels, while all SFAs can increase serum cholesterol levels. Therefore, the higher this ratio, the greater the effect (Chen and Liu, 2020). The present study found that PUFA/SFA (1.75 %) is similar to the value previously reported for farmed fish fed on feed mixture (Ljubojević et al., 2017).

The levels of amino acids tested in the edible part of the farmed *Cyprinus carpio* were higher than that of the wild fish recorded by Mohanty et al., (2014) and Sarma et al., (2013) (Table 3). Many studies reported that the formulated feed, which contained animal and vegetable ingredients, showed an apparent positive influence on fish meat quality (Ljubojević et al., 2013). The levels of the essential amino acids are close to the results reported by (Pyz-Lukasik and Kowalczyk-Pecka., 2017) for grass carp and bighead carp, which belong to the same family (Cyprinidae).

Regarding the non-essential amino acids, the results suggested that aspartic acid is the most abundant compared to the other non-essential amino acids, and the mean value was (12.23 ± 2.68). At the same time, the asparagine recorded the lowest value (0.96 ± 0.02). Aspartic acid is the antecedent of methionine, threonine, isoleucine, and lysine and has a crucial role in regulating the secretion of essential hormones (Mohanty et al., 2014). Compared with some studies conducted on wild carp

presented in Table 3, the farmed carp tested in the present study had high amounts of the non-essential amino acids, which may again reflect the quality of the formulated feed. Table 3 presents the high variation in the amount of amino acids in fish samples belonging to the same family and even the same species. The protein composition of the fish is affected by different factors such as sexual changes and environmental conditions, but the amount and quality of feed consumed by the fish are fundamental (Kasozi et al., 2019). In the present study, the ratio of essential/non-essential amino acid (EAA/NEAA) was observed to be 0.48, which is the same value recorded in other studies on wild common carp, Grass carp, and Bighead carp (Table 3). Compared to the wild fish, the muscles of the farmed *Cyprinus carpio* had high-quality protein and were considered a good source of fatty acids that have a positive effect on human health. Nevertheless, these results cannot be generalized to all the farmed fish in the province. Some farms depend on fodder rich in carbohydrates (barley, wheat bran, and maize powder) with a low-quality fish meal to reduce production costs (Ahmed et al., 2020). The reduction of fish meal in the diet of farmed fish would diminish the Omega-3 content of cultivated fish and, thereby, the fish's dietary benefits (Sokoła-Wysoczańska et al., 2018).

In conclusion, this research indicated that cultured common carp is a good source of PUFA (especially DHA, and EPA) that have beneficial health effects. In addition, farmed carp is a valuable food containing the majority of essential amino acids. Thus, it was established that the nutritional value of the farmed *Cyprinus carpio* is not less than the wild fish of the same species or family. Further, the demand for high-protein food such as fish is increasing, and aquaculture presents an enormous opportunity for any country's economy. Therefore, further studies are recommended on farmed fish meat to provide the consumers with scientific data related to these aquaculture products.

FUNDING

This work was funded by the Marine Science Centre, the University of Basrah, Iraq.

ETHICAL STATEMENTS

All applicable international, national, and/ or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Ethical approval for this study (Document NO. 8/13 January/ 2020) was obtained from the MSC ethics committee/ Marine Science Center, University of Basrah, Iraq.

CONFLICT of INTEREST

The author declares that there are no financial interests or personal relationships that may affect this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Single author.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data used to support the findings of this study are included within the article.

REFERENCES

- Ahmed, A. R., Al-Zewar, M. J., Al-Mudaffar, F., & Abulhasan, A. A. (2020). Culture of common carp (*C. carpio* L.) in Basrah governorate, southern Iraq; Current status and suggestions for development. *Ecology, Environment and Conservation*, 26(2), 824-831.
- Al-Humairi, K. O. M., Al-Agidi, H. G., & Al-Haider, S. M. (2019). Evaluation of Amino Acid Profile for Freshwater Fishes Yellow Barbell (*Carasobarbus luteus*) and Common Carp (*Cyprinus Carpio*) of Euphrates River, Iraq. *Indian Journal of Ecology*, 46(8), 229-232.

- AOAC (1990). Official methods of analyses of association of analytical chemist (15th ed.). Washington, DC: AOAC.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D. A, Zubcov, E., Shahidi, F., & Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 79(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00122-X)
- Bennett, A., Patil, P., Kleisner, K., Rader, D., Viridin, J. & Basurto, X. (2018). *Contribution of fisheries to food and nutrition security: Current knowledge, policy, and research*. NI Report. 18–02. Durham, NC: Duke University.
- Chen, J., & Liu, H. (2020). Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5695. <https://doi.org/10.3390/ijms21165695>
- Dale, H. F., Madsen, L., & Lied, G. A. (2019). Fish-derived proteins and their potential to improve human health. *Nutrition Review*, 77(8), 572–583. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz016>
- El-Sayed, A. M. (2015). *Regional review on status and trends in aquaculture development in the Near East and North Africa*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1135/6. Rome, Italy.
- FAO/WHO (1990). *Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation*. Bethesda, MD
- Hosomi, R., Fukunaga, K., Arai, H., Kanda, S., Nishiyama, T., & Yoshida M. (2011). Fish protein decreases serum cholesterol in rats by inhibition of cholesterol and bile acid absorption. *Journal of Food Science*, 76(4), 116–121. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02130.x>
- Hossain, M.A. (2011). Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild? *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(6), 455-466.
- ISO (2000). *ISO 5509: Animal and vegetable fats and oils-preparation of methyl esters of fatty acids*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISSFAL (2004). *Report of the Sub-Committee on Recommendations for Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults*. Available at: <http://www.issfal.org/news-links/resources/publications/PUFAIntakeReccomdFinalReport.pdf>
- Karnai, L. and Szucs, I. (2018). Outlooks and perspectives of the common carp production. *Annals of the Polish Association of Agricultural and Agribusiness Economists*, (1), 64–72.
- Kasozi, N., Iwea, G., Sadik, K., Asizua, D., & Namulawab, V. (2019). Dietary amino acid requirements of pebbly fish, *Alestes baremoze* (Joannis, 1835) based on whole body amino acid composition. *Aquaculture Report*, 14, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100197>
- López-Mas, L., Claret, A., Reinders, M. J., Banovic, M., Krystallis, A., & Guerrero, L. (2021). Farmed or wild fish? Segmenting European consumers based on their beliefs. *Aquaculture*, 532, 735992. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735992>
- Ljubojević, D., Trbović, D., Lujić, J., Bjelić-Čabrilo, O., Kostić, D., Novakov, N., & Ćirković M. (2013). Fatty Acid Composition of Fishes from Inland Waters. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, Supplements, 2;19(1), 62–71.
- Ljubojević, D., Đorđević, V., & Ćirković, M. (2017). Evaluation of nutritive quality of common carp, *Cyprinus carpio* L. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* (85), 012013. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/85/1/012013>
- Memon, N. N., Talpur, F. N., Bhanger, M. I., & Balouch, A. (2011). Changes in fatty acid composition in muscle of three farmed carp fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Catla catla*) raised under the same conditions. *Food Chemistry*, 126(2), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.107>

- Mohanty, B., Mahanty, A., & Ganguly, S. (2014). "Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and Their Importance in Clinical Nutrition," *Journal of Amino Acids*, 2014(2014), 269797. <https://doi.org/10.1155/2014/269797>
- Osibona, A. O., Kusemiju, K., & Akande, G. R. (2009). Fatty acid composition and amino acid profile of two freshwater species, African catfish (*Clarias gariepinus*) and tilapia (*Tilapia zillii*). *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9(1), 609-621. <https://doi.org/10.4314/ajfand.v9i1.19216>
- Pyz-Lukasik, R., & Kowalczyk-Pecka, D. (2017). Fatty acid profile of fat of Grass Carp, Bighead Carp, Siberian Sturgeon, and Wels Catfish. *Journal of Food Quality*, 2017, 5718125. <https://doi.org/10.1155/2017/5718125>
- Runge, K. K., Shaw, B. R., Witzling, L., Hartleb, Ch., Yang, Sh., & Peroff, D. M. (2021). Social license and consumer perceptions of farm-raised fish, *Aquaculture*, 530, 735920. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735920>
- Sarma, D., Akhtar M. S., Das P., Das, P., Shahi, N., Yengkokpam S., Debnath, D., Ciji, A., & Mahanta P. C. (2013). Nutritional quality in terms of amino acid and fatty acid of five coldwater fish species: implications to human health, *National Academy Science Letters*, 36(4), 385-391. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0151-1>
- Sokoła-Wysoczańska, E., Wysoczański, T., Wagner, J., Czyż, K., Bodkowski, R., Lochyński, S., & Patkowska-Sokoła, B. (2018). Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders—A review. *Nutrients*, 10(10), 1561. <https://doi.org/10.3390/nu10101561>
- Stancheva, M., & Merdzhanova, A. (2011). Fatty acid composition of common carp, rainbow trout and grey mullet fish species. *Agricultural Science and Technology*. 3(3) 285– 289.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., & Bell, J. G. The lipids. In Halver, J. E., & Hardy, R. E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier Science, San Diego, California, USA, 2002, 3rd ed.
- Swapna, H. C., Amit, K. R., Bhaskar, N., & Sachindra, N. M. (2010). Lipid classes and fatty acid profile of selected Indian freshwater fishes. *Journal of Food Science and Technology*. 47, 394–400. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0065-6>
- Vannice, G., & Rasmussen, H. (2014). Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *Journal of Academy of Nutrition and Dietetics*, 114, 136–53. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.11.001>
- Yeganeh, S., Shabanpour, B., Hosseini, H., Imanpour, M. R., & Shabani A. (2012). Comparison of farmed and wild common carp (*Cyprinus carpio*): Seasonal variations in chemical composition and fatty acid profile. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, 503–511. <https://doi.org/10.17221/455/2011-CJFS>

Antalya'da Bir Deniz Akvaryumu Su Temini Sisteminin Çevresinde Gözlenen Bentik Makrofauna Örnekleri

Examples of Benthic Macrofauna Observed Around a Marine Aquarium Water Supply System in Antalya

Kemal Gökoğlu¹, Mete Kuşat^{1*}

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

*Sorumlu Yazar: metekusat@gmail.com

Geliş: 03.09.2021

Kabul: 17.01.2022

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Gökoğlu, M. & Kuşat, M. (2022). Antalya'da bir deniz akvaryumu su temini sisteminin çevresinde gözlenen bentik Makrofauna örnekleri. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 168-178. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.990402>

Özet: Bu araştırma 2018 yılı içerisinde, Konyaaltı plajı (Antalya) yakınında kurulmuş olan bir deniz akvaryumunun su tedarik ünitesinde yapılmıştır. Çalışmada, su alım ünitesi etrafında bulunan makro omurgasız faunasına ait bazı türlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada Echinodermata (derisidikenliler)'den *Synaptula reciprocans*, *Arbacia lixula* ve *Diadema setosum*, Crustacea (Kabuklular)'dan *Charybdis hellerii*, *Percnon gibbesi*, *Portunus pelagicus*, *Balanus sp.* ve *Scyllarides latus*, Mollusca (Yumuşakçalar) ya ait Bivalvia sınıfından *Pinctada radiata*, *Spondylus spinosimus*, *Chama pacifica*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea glomerata*, *Dendostrea frons*, *Malleus regulus*, *Ostrea edulis*, *Arca noae*, Gastropoda sınıfından ise *Hexaplex trunculus*, *Cerithium sp.*, *Conomurex persicus*, *Ergalatax martensi*, *Coryphellina rubrolineata*, *Flabellina sp.* ve *Felimare picta*'nın su temin ünitesini yaşam alanı olarak kullandığı belirlenmiştir. Ayrıca bölgede tunikatlardan *Phallusia nigra*, *Microcosmus vulgaris* ve *Herdmania momus*'un aynı sistem üzerinde buldukları tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler

- Antalya Körfezi
- Deniz Akvaryumu
- Echinodermata
- Tunicata
- Crustacea

Abstract: This research was carried out in the water supply unit of a marine aquarium established near Konyaaltı beach (Antalya) in 2018. In the study, it was aimed to determine some species belonging to the macroinvertebrate fauna around the water intake unit. In the study *Synaptula reciprocans*, *Arbacia lixula* and *Diadema setosum* from Echinodermata; *Charybdis hellerii*, *Percnon gibbesi*, *Portunus pelagicus*, *Scyllarides latus*, *Balanus sp.*, were determined from Crustacea. *Pinctada radiata*, *Spondylus spinosimus*, *Chama pacifica*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea glomerata*, *Dendostrea frons*, *Malleus regulus*, *Ostrea edulis*, *Arca noae* from the class Bivalvia in phylum Mollusca; *Hexaplex trunculus*, *Cerithium sp.*, *Conomurex persicus*, *Ergalatax martensi*, *Coryphellina rubrolineata*, *Flabellina sp.*, *Felimare picta* from the Gastropoda class used the water supply unit as a habitat. In addition, it was determined that *Phallusia nigra*, *Microcosmus vulgaris*, and *Pyura momus* from Tunicates were found on the same system in the region.

Keywords

- Antalya Gulf
- Marine aquarium
- Echinodermata
- Tunicate
- Crustacea

1. GİRİŞ

Antalya Körfezi, Türkiye'de balıkçılığın yapıldığı önemli bölgelerden birini oluşturmaktadır (Kuşat ve Koca, 2009). Jeolojik açıdan Antalya Körfezi incelendiğinde; Karpuzkaldıran (Lara) ile Side Feneri arasında kalan alanın yaklaşık 2 deniz mili açığında doğal resif alanı yoktur. Bu bölgenin dip yapısı kumlu, kumlu-çamurlu, milli-çamurlu olup düz bir yapı sergilemektedir. Derinliğin kademeli olarak arttığı bu bölge, trol avcılığı için uygun alanları oluşturmaktadır (Yeşilçimen ve Kuşat, 2011).



Körfezde trol avcılığı bu bölgede yapıldığı için alan aşırı şekilde sömürülmektedir. Bölgede avcılık yapan trol teknelerinin yasak ihlali yaparak sığ sularda da avlandığı bilinmektedir. Bu alanların korunması ve güçlendirilmesi ancak yapay resiflerin inşasıyla mümkün olabilir.

Balıklar, kabuklu deniz ürünleri diğer dinlence-eğlence ya da ticari amaçlı türler, genellikle doğal resiflerin eşdeğer alanına eşit ya da daha fazla olarak yapay resifleri kullandıkları bildirilmiştir (Stone, 1985). Tüm yapay resifler, bentik, orta su ve nehir ağzı olmak üzere üç ana kategoride sınıflandırılabilir. Bentik yapay resiflerin üzerinde ve çevresinde büyük miktarlarda yetişkin ve yavru balıkların bulunma nedenleri açıklanamamış ve bunun karmaşık bir yapıdan kaynaklandığı bildirilmiştir. Olası açıklamalar arasında besin bolluğu, yırtıcılardan korunma, barınak, uygun yumurtlama habitatu, gençlerin hayatta kalma oranını yükseltme ve fiziksel yönelim noktası olduğu bildirilmektedir. Dip veya pelajik deniz canlılarına avcılık amacıyla daha kolay ulaşabilmenin ve balık popülasyonlarını artırmanın güvenilir bir yolu, yapay resif veya buna benzer yaşam alanı olabilecek yapılar oluşturmaktır (Rousseau, 2008).

Herhangi bir yapay resif materyalinin kullanımını değerlendirirken dikkate alınması gereken dört ana ölçüt, işlev, uygunluk, kararlılık ve yerleştirme ile dayanıklılık olarak belirtilmiştir (Rousseau, 2008). Bu ölçütler, yerleştirme ve yönetim hususları ile birlikte, bir yapay resif projesinin başarısını veya başarısızlığını belirleyen ana unsurlardır. Çalışmamız su alım ünitesinin çevresinde bulunan makro bentik fauna örneklerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma materyalini, 2012 yılında Antalya Konyaaltı mevkiinde tesis edilen bir deniz akvaryumunun deniz içerisindeki su alım ünitesi oluşturmaktadır. Deniz kıyısına dik bir şekilde yerleştirilen bu ünite deniz içerisine yaklaşık 300 m uzunlukta ve 23 metre derinliğe kadar uzanmaktadır. Bu alan deniz içerisinde deniz canlılarına yeni bir yaşam alanı oluşturmuştur.

Su alım ünitesi 50 cm çapında, yüksek yoğunluklu polietilen boru (HDPE, High Density Polyethylene) ve bu boruya semer şeklinde bindirilen 100 adet beton ağırlıklardan oluşmaktadır. Su alım ünitesi ayrıca 1,5 X 1,5 X 1,5 m boyutlarında biri su ünitesinin tam ortası, diğeri sonunda olmak üzere küp şeklinde iki büyük beton tonozla zemine sabitlenmiştir (Şekil 1). Sistemin su iletimini sağlayan iki dalgıç pompa kıyıdan itibaren yaklaşık 100 m uzaklıkta, deniz içerisinde kapaklı paslanmaz krom metal bir kasa içerisinde yer almaktadır (Şekil 1). Bu pompalara elektrik enerjisi 80 mm'lik HDPE bir boru içerisine yerleştirilen kablolarla sağlanmaktadır.

Hemen kıyı çizgisinde başlayan ve yaklaşık 300 m açıkta ve 23 m derinlikte sona eren su alım ünitesinin yerleştirildiği bölgede doğal bir resif bulunmamaktadır (Şekil 1). Su alım ünitesinin yerleştirildiği yerin dip yapısı çakıllı, kumlu-çakıllı bir özellik göstermektedir.



Şekil 1. Su alım ünitesinin kıyadaki başlangıç kısmı (kalın boru su alımı, ince boru elektrik iletimi)

Su alım ünitesindeki biyolojik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yıpratıcı olmayan SCUBA dalgıçları yapılmış ve görsel sayım, rastgele sayım ve sualtı video ve fotoğraf çekim tekniğinden yararlanılarak türlerin belirlenmesi ve sayımı gerçekleştirilmiştir. Tercih edilen bu yöntem ile ünite üzerindeki makrobentik faunaya ait taksonlar öldürülmeden tanımlanmış ve sayılmıştır. Bu yöntem, biyolojik yaşamın devamı, yapay resiflerin amacına ulaşması ve daha sağlıklı sonuçların alınması için tercih edilmiştir.

Deniz şartları, suda görüş mesafesi, kısıtlı dip zamanı ve hava miktarı görsel sayım tekniklerini sınırlayıcı faktörler olarak ortaya çıkmaktadır (Özgül, 2016). Bu olumsuzlukların yaşanmaması için dalgıçlarımız denizin sakin olduğu sabah ve gece saatlerinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmamızda fotoğraf ve video çekimlerinde, Canon Powershot G-12 fotoğraf makinesinden yararlanılmıştır. Ayrıca gece dalgıçları ve fotoğraf çekimlerimiz için sualtı fenerleri kullanılmıştır. Araştırmada gözlemlenen türlerin geçerli bilimsel isimlerinin belirlenmesinde WoRMS, (2022)'den faydalanılmıştır.

3. BULGULAR

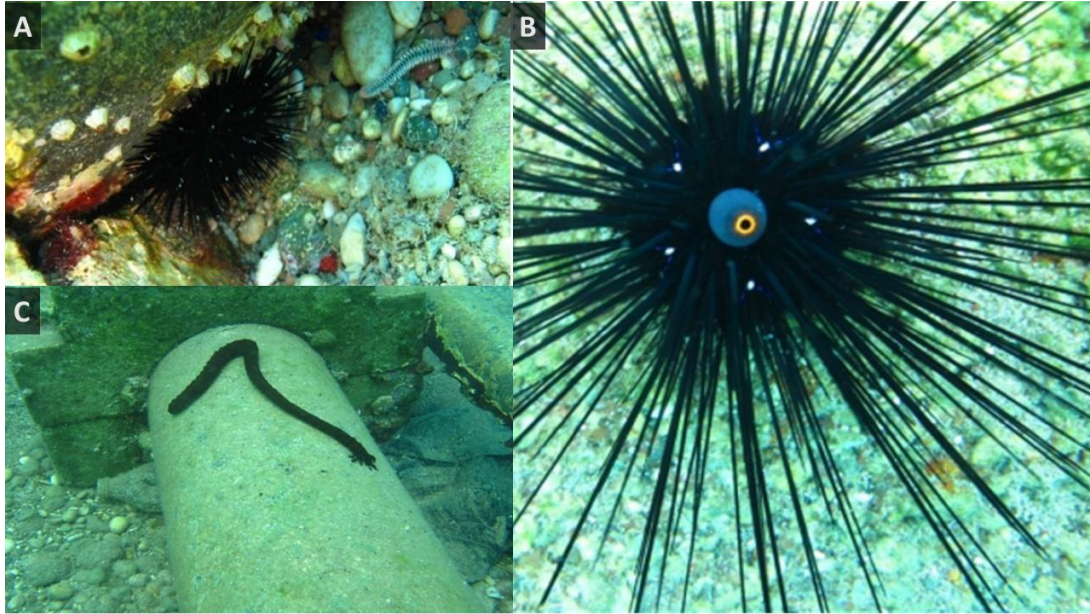
Deniz akvaryumu su alım ünitesinin çevresinde gözlemlenen makrobentik fauna içerisinde belirlenen bazı türler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Su alım ünitesindeki makrobentik fauna içerisinde tespit edilen bazı türler

Kol	Sınıf	Familiya	Tür	Türkçe ismi	
Echinodermata	Echinozoa	Snaptidae	<i>Synaptula reciprocans</i>	Denizhıyarı	
		Arbaciidae	<i>Arbacia lixula</i>	Karadiken	
		Diadematidae	<i>Diadema setosum</i>	Uzundikenli denizkestanesi	
Tunicate	Ascidiacea	Ascidiidae	<i>Phallusia nigra</i>	-	
		Pyuridae	<i>Microcosmus vulgaris</i>	-	
			<i>Herdmania momus</i>	-	
Curustacea	Malacostraca	Portunidae	<i>Charybdis hellerii</i>	Yengeç	
		Percnidae	<i>Percnon gibbesi</i>	-	
		Portunidae	<i>Portunus pelagicus</i>	Kum yengeci	
		Scyllaridea	<i>Scyllarides latus</i>	-	
	Thecostraca	Balanidae	<i>Balanus</i> sp.	Büyükayı İstakozu	
Mollusca	Bivaliva	Margaritidae	<i>Pinctada radiata</i>	İnci istiridyeye	
		Spondylidae	<i>Spondylus spinosus</i>	-	
		Chamidae	<i>Chama pacifica</i>	-	
		Ostreidae	<i>Saccostrea cucullata</i>	Kapşonlu istiridyeye	
			<i>Saccostrea glomerata</i>	-	
			<i>Dendostrea frons</i>	Yaprak istiridyeye	
			<i>Malleus regula</i>	-	
			<i>Ostrea edulis</i>	Avrupa istiridyyesi	
			<i>Arca noae</i>	Nuhun gemisi kabuğu	
		Malleidae			
		Muricidae			
			<i>Ergalatax martensi</i>	-	
			<i>Hexaplex trunculus</i>	-	
			Cerithiidae	<i>Cerithium</i> sp	Deniz kabuğu
			Strombidae	<i>Conomurex persicus</i>	-
	Flabellinidae	<i>Flabellina</i> sp.	Deniztavşanı		
	Chromodorididae	<i>Felimare picta</i>	Deniz salyangozu		
	Flabellinidae	<i>Coryphellina rubrolineata</i>			

3.1. Echinodermata Türleri

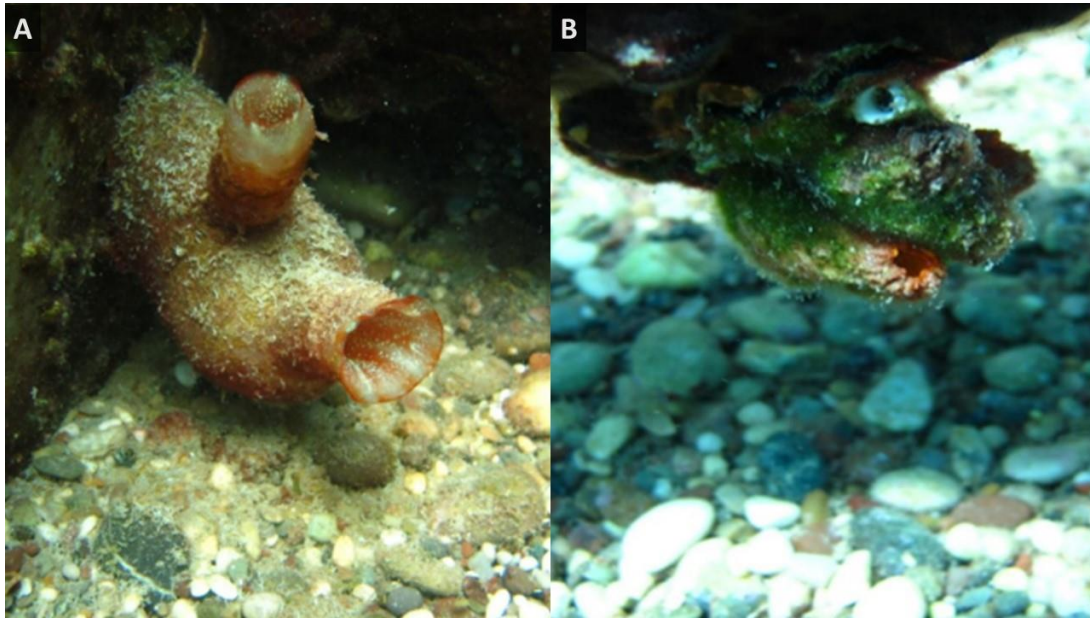
Araştırmamızda su iletim sistemi üzerinde Echinodermata üyelerinden denizhıyarı (*S. reciprocans* Forsskal, 1775) denizkestanesi *A. lixula* (L., 1758) ve *D. setosum* (Leske, 1778) tespit edilmiştir (Şekil 2A,B,C). Bu türlerden Kızıldeniz kökenli olan *D. setosum* zehirli bir denizkestanesi türüdür.



Şekil 2. (A) Beton ağırlık üzerinde Karadiken, *Arbacia lixula*, (B) Beton ağırlık üzerinde uzun dikenli zehirli deniz kestanesi *Diadema setosum*, (C) Boru üzerinde tespit edilen denizhiyarı, *Synaptula reciprocans*

3.2. Tunikat Türleri

Araştırmamız sırasında boru ve beton ağırlıklara tutunmuş halde *Phallusia nigra* (Savigny, 1816), *Microcosmus vulgaris* Heller, 1877 ve *Herdmania momus* (Savigny, 1816) olmak üzere 3 tunikat taksonu belirlenmiştir (Şekil 3A,B).

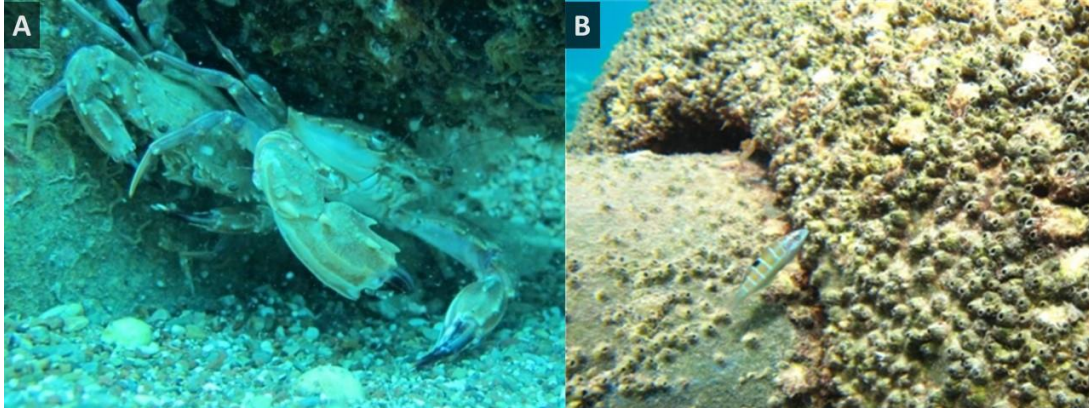


Şekil 3. (A) Beton ağırlığa tutunmuş olan *Herdmania momus*, (B) Boru altına tutunmuş olan *Microcosmus vulgaris*

3.3. Crustacea Türleri

Araştırmamız sırasında su iletim sisteminin altında ve beton ağırlıklar arasında yengeç türleri *Charybdis hellerii* (Milne-Edwards 1867), *Percnon gibbesi* (Milne Edwards, 1853) *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) tespit edilmiştir (Şekil 4A). Yengeçlerindeki doğal habitatlarını kumsal alanların oluşturduğu belirlenmiştir. Boru sistemi ve beton ağırlıklar üzerinde yoğun bir *Balanus* sp.

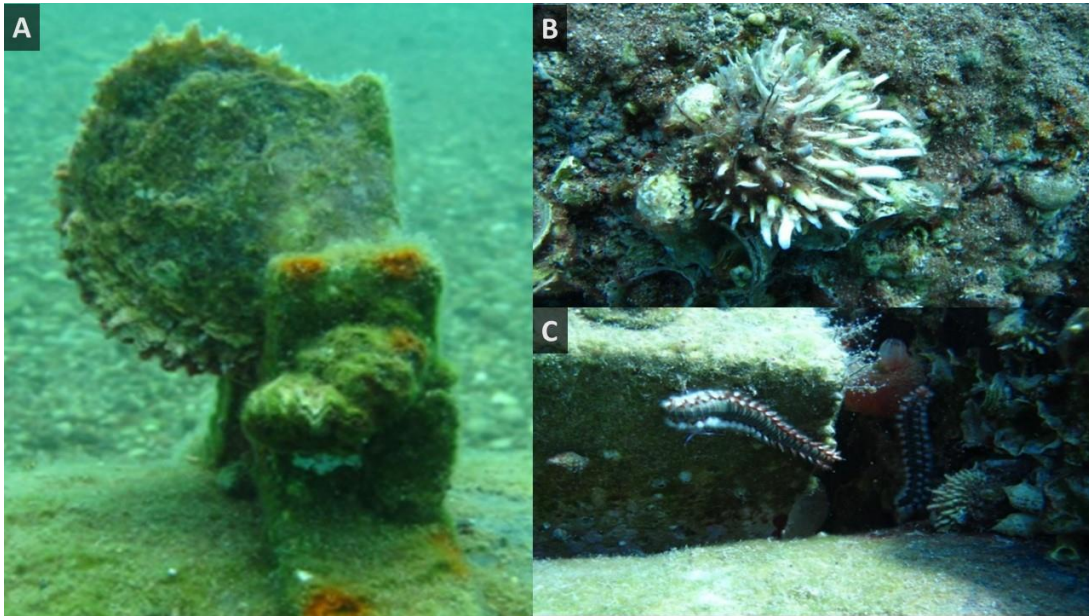
kümeleşmesi tespit edilmiştir (Şekil 4B). Su iletim sisteminin ortasında yer alan sabitleme tonozunun altındaki boşlukta Scyllaridae familyasına ait büyükayı istakozu, *Scyllarides latus* (Latreille, 1803) gözlenmiş, ancak görüntüsü alınamamıştır.



Şekil 4. (A) Su iletim borusu altında yengeçler *Charybdis hellerii*, (B) Beton ağırlık ve boru üzerine kümeleşmiş olan *Balanus sp.*

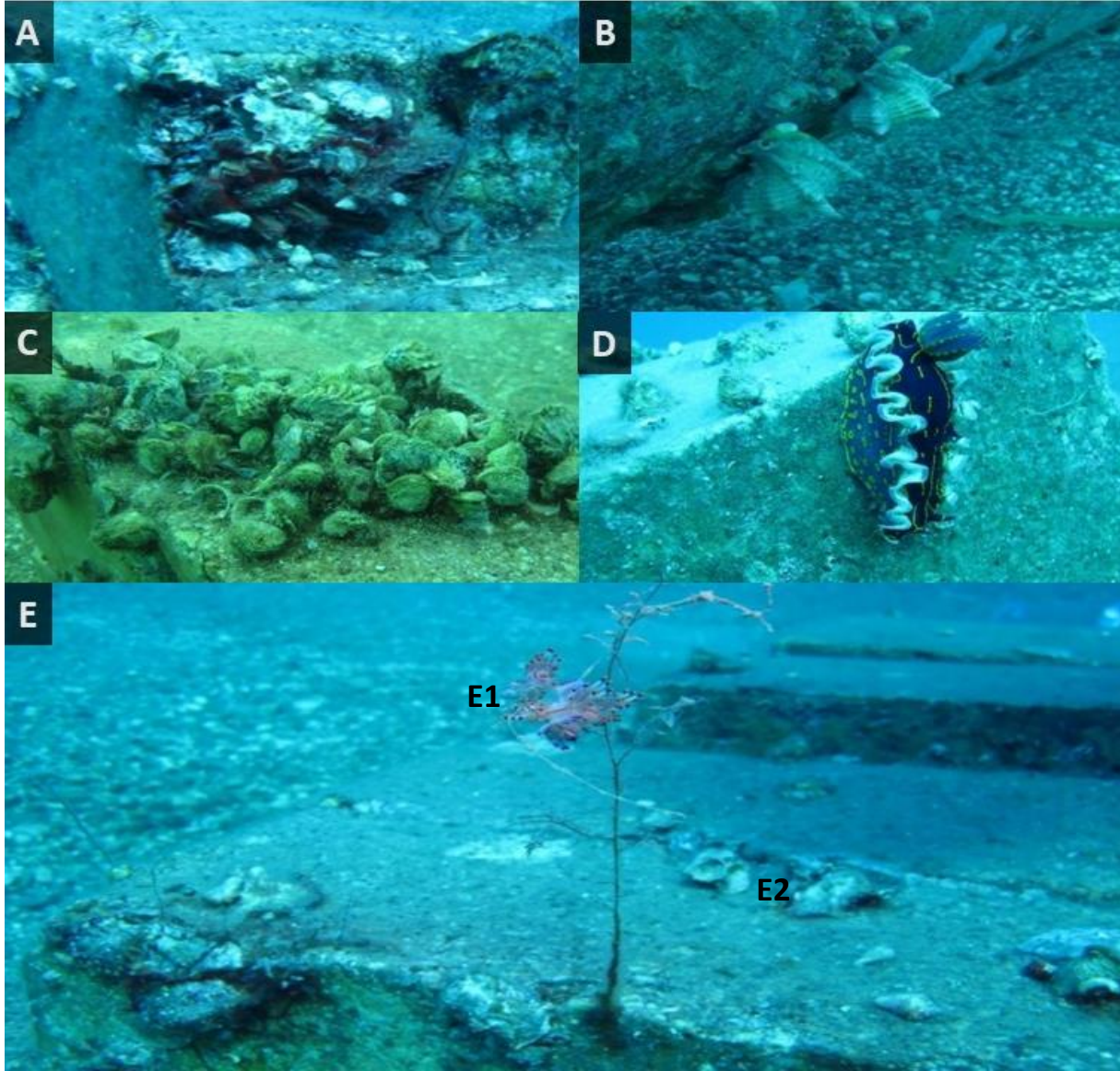
3.4. Gastropoda Türleri

Su iletim sistemindeki boru, beton ve metal aksam üzerine tutunmuş olarak yaşamını sürdüren yoğun bivalvia topluluğu izlenmiştir. Bivalvia'ya ait bazı türler; *Pinctada radiata* (Leach, 1814), *Spondylus spinosimus* (Schreibers, 1793), *Chama pacifica* (Broderip, 1834), *Saccostrea cucullata* (Born, 1778), *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), *Dendostrea frons* (L., 1758), *Malleus regulus* (Forsskal, 1775), *Ostrea edulis* (L., 1758) ve Nuhun gemisi olarak bilinen *Arca noae* (L., 1758)'dir (Şekil 5a,b,c).



Şekil 5. Su alım ünitesi üzerinde tespit edile Gastropod türleri (A: *Pinctada radiata* B: *Spondylus spinosimus* C: *Hermodice carunculata*)

Sistem üzerinde tespit ettiğimiz diğer gastropoda türleri ise *Ergalatax martensi* (Schepman, 1892), *Hexaplex trunculus* (L., 1758), *Cerithium sp.*, deniz kabuğu *Conomurex persicus* (Swainson, 1821) *Flabellina sp.*, deniztavşanı *Felimare picta* (Philippi, 1836) ve *Coryphellina rubrolineata* (O'Donoghue, 1929) Şekil 6. A,B,C,D,E de verilmiştir.



Şekil 6. (A) Beton ağırlık üzerinde bazı gastropod türleri, (B) Boru üzerinde *Hexaplex trunculu*, (C) Beton ağırlık üzerine tutunmuş *Chama pacifica*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea glomerata* ve *Dendostrea frons*'dan oluşmuş bivalvia topluluğu, (D) Beton ağırlık üzerinde bir deniztavşanı, (*Felimare picta*) (E) Beton ağırlık üzerindeki bir hidroide tutunmuş deniztavşanı, *Coryphellina rubrolineata* (E1) deniz kabuğu, *Conomurex persicus* (E2)

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Araştırmamıza konu olan deniz akvaryumu su alım ünitesi 2012 yılında yapılmıştır. Çevresinde hiçbir doğal resif bulunmayan ve konumu itibarıyla bir yapay resif oluşturduğu gözlenen bu ünite Konyaaltı plajının tam ortasında yer almaktadır. Son yıllarda tesis denizden su alımını durdurmuştur. Yapay resiflerde türlerin belirlenmesi ve sayılması çalışmalarında birçok yöntemin kullanıldığı bildirilmektedir (Bortone vd., 1989, Fabi vd., 2015, Özgül, 2016). Bu yöntemler içerisinde yaygın olarak görsel sayım yöntemi kullanılmaktadır. Diğer yöntemler ile ya ekolojik olarak doğaya zarar verilmekte (öldürerek örnekleme) yada sağlıklı sonuçlar alınmamaktadır.

Su alım ünitesine kolayca ulaşabilmemiz, derinliğin 0-22 m arasında değişmesi, denizin sakin ve suda görüşün iyi olduğu dönemlerde dalışları yapılması, sistemin doğrusal bir hat üzerinde olması, yedek hava kaynağı bulunması, dalış eğitimlerinin bölgede yapılması ve daha önceki yıllarda bölgede

yaptığımız bilimsel çalışmalar nedeniyle buradaki biyolojik çeşitliliği kısmen tanımamız bize çok büyük kolaylıklar sağlamış ve sağlıklı verilerin alınmasına yardımcı olmuştur.

Su alım ünitesini yapay resif olarak kullanan makrobentik faunanın belirlenmesi amacıyla yaptığımız bu çalışmada sistem üzerinde ve çevresinde tespit ettiğimiz Echinodermata türleri, denizhiyari (*Synaptula reciprocans*), denizkestanesi, *Arbacia lixula* ve uzun dikenli denizkestanesi (*Diadema setosum*)'dir. Akdeniz'in egzotik Echinodermata türleri içerisinde yer alan *S. reciprocans*'in doğal yayılış alanı IndoPasifik ve Kızıldeniz'dir. Akdeniz havzasında ise İsrail, Lübnan, Suriye, Kıbrıs, Türkiye ve Yunanistan'ın güney kıyılarında kumlu, çakıllı kayalık ve deniz çayırının bulunduğu alanlarda gözlenmiştir (Çınar vd., 2006; Antoniadou ve Vafidis, 2009).

Araştırmamızda tespit ettiğimiz diğer bir Echinodermata türü olan *A. lixula*. Akdeniz'in yerli denizkestanesi türlerinden olup, tüm Akdeniz kıyıları boyunca dağılım göstermektedir. Deniz kestaneleri herbivor beslenme davranışı gösterirler ve genellikle sert substratlar üzerinde yaşarlar (Bulleri vd., 1999). Akdeniz'de *A. lixula* genellikle mor denizkestanesi (*Paracentrotus lividus*) ile birlikte gel-git bölgelerde yaşamını sürdürmektedir. *P. lividus*'a daha az eğimli ve düz habitatlarda sık rastlanırken *A. lixula*'nın daha dik habitatları tercih ettiği bildirilmektedir (Bulleri vd., 1999). Araştırmamızda da *A. lixula*'ya beton ağırlığın yan duvarında rastlanılmıştır.

Kızıldeniz'den Akdeniz'e geçen türlerden biri de uzun dikenli denizkestanesi *Diadema setosum*'dur. Bu denizkestanesine su alım ünitesinin boru ve beton ağırlıkları üzerinde rastlanmıştır. Ülkemiz kıyılarında bu türün kaydını ilk kez Yokeş ve Galil (2006) Kaş'tan bildirmişlerdir. Bu bildirimden bir yıl sonra Gökoğlu vd. (2007) Antalya Falezlerinden türün ikinci bildirimini yapmışlardır. Genellikle kıyısız alanlarda görülen bu denizkestanesi ülkemizin tüm Akdeniz kıyıları boyunca dağılımını genişletmiştir. Uzun dikenlerini kullanarak çok çabuk yer değiştirebilen türün karakteristik özelliği uzun, siyah dikenlerinin yanı sıra, adeta bir göz gibi görünen portakal sarısı renginde büyük bir anal kese taşımasıdır (Yokeş ve Galil, 2006). Gözlemlerimizde Çizgili Kardinal balığı *Cheilodipterus novemstriatus* (Rüppell, 1838)'nin bu denizkestanenin uzun dikenleri arasına saklanarak düşmanlarından korunma davranışı gösterdiği izlenmiştir. İlk kaydı Gökova Körfezi'nden yapılan (Katsenavakis vd., 2014) tür uzun olan dikenlerinde zehir bulunması nedeniyle tehlikeli deniz canlıları arasında yer almaktadır. Hızlı çoğalması ve kıyısız bölgelerdeki kayalık alanlara kadar bulunabilmesi denize girenler için büyük risk oluşturabilmektedir.

Süveyş Kanalı'nın açılmasından sonra doğu Akdeniz'in biyolojik çeşitliliğinde büyük değişiklikler görülmeye başlamıştır. Bu değişimlerin olduğu bölgelerden biri de ülkemiz kıyılarıdır. Kıyılarımızda tespit edilen Kızıldeniz kökenli türler içerisinde tunikatlar da yer almaktadır. *Phallusia nigra* ve *Herdmania momus* ülkemiz kıyılarında tespit edilen lesepsiyan tunikat türlerindedir (Çınar vd., 2006). Bu türler su alım ünitesinin boru ve beton ağırlık sistemleri üzerine tutunmuş olarak tespit edilmiştir. Bunlardan *P. nigra*'nın Yunanistan'ın Rodos Adası sularında da kaydı yapılmıştır (Kondilatos vd., 2010). Araştırmamızda su alım ünitesi üzerinde bu türlerden *P. momus*'a çok sık rastlanılması dikkat çekicidir.

Sistem üzerine tutunmuş halde tespit ettiğimiz tunikat türlerinden biri de *Microcosmus vulgaris*'tir. Özellikle, Gökçeada (Ege Denizi) bölgesinde bu tür "Fuska" olarak bilinmektedir. Akdeniz'in yerli türleri arasında yer alan bu organizma insan gıdası olarak tüketilen tunikat türleri içerisinde yer almaktadır (Lambert vd., 2016). Yüksek miktarda iyot içerdiğine inanılan bu tür, Gökçeada bölgesinde "Hipotroidi" tedavisi için toplanarak tüketilmektedir (Ada yerlileriyle kişisel görüşme).

Araştırmalarımız esnasında boru ve beton ağırlık altları ve arasında yengeç türlerinden *Charybdis hellerii*, *Percnon gibbesi* tespit edilmiştir. Aynı bölgede gece dalışlarımızda kum ve çakıl zemin üzerinde Kum Yengeci olarak bilinen *Portunus pelagicus* görülmüştür. Her üç yengeç de Kızıldeniz kökenli türler arasında yer almakta ve kıyısız alanlarda dağılım göstermektedirler (Yokeş ve Galil 2006; Özcan vd., 2010). Su alım ünitesinin ortasında yer alan sabitleme tonozunun altında Büyükkayı İstakozu (*Scyllarides latus*)'na rastlanmıştır ancak bu türün görüntüsü alınamamıştır. *S. latus* tüm

Akdeniz kıyılarına da kayalık alanlarda dağılım gösteren, eti insan gıdası olarak tüketilen (Aktaş vd., 2011) kısıksız istakozlardan bir türdür. Bölgemizdeki balıkçılar bu türü “Karavida” olarak adlandırmaktadırlar.

Araştırmalarımız sırasında beton ağırlık ve boru sistemleri üzerinde yoğun bir *Balanus* sp. topluluğu tespit edilmiştir. Bu canlılar denizel ortamların kıyısız alanlarında akıntının olduğu bölgelerde yaşamını sürdüren organizmalardır. Kıyısız alanların yanı sıra larvaları hareketli organizmaların derilerine ve yüzen objelere de tutunabilir. Bu türe plajlarda Kelle taş olarak adlandırılan yuvarlak taşlar üzerinde de sıkça rastlanılmaktadır. Bu yüzden taşlık alanlardaki plajlarda denize girenlerin ayaklarında çizik ve yaralanmalara neden olabilmektedirler (Acar vd., 2017).

Su iletim sistemindeki HDPE boru, beton ve metal aksam üzerine tutunmuş bivalvia türleri *Pinctada radiata*, *Spondylus spinosimus*, *Chama pacifica*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea glomerata*, *Dendostrea frons*, *Malvufundu sregulus*, *Ostrea edulis* ve Nuhun Gemisi olarak bilinen *Arca noae*'dir. *O. edulis* ve *A. noae* dışındaki türler Akdeniz için egzotik türlerdir (Gökoğlu vd., 2017). Bu türlerin kıyılarımızda çoğalması, balıkçı ağlarının dolanmasına ve yırtılmasına neden olmaktadır. Balıkçı av araçlarına zarar vermenin yanı sıra balıkçılık operasyonlarını da güçleştirmektedir. Ayrıca kıyılarımızda aşırı şekilde çoğalmış olan bu türler sert substrat içeren plajlarda denize girenlerin ayaklarında çizik ve kesik gibi yaralanmalara da neden oldukları için plajlarda risk oluşturmaktadır. Bu türlerin bazıları halen ülkemizde ekonomik olarak da değerlendirilmemektedir.

Sistem üzerinde tespit ettiğimiz diğer gastropoda üyeleri *Hexaplex trunculus*, *Cerithium* sp., *Conomurex persicus*, *Ergalatax martensi*, *Coryphellina rubrolineata*, *Flabellina* sp., *Felimare picta* türleridir. Bu türlerden *C. persicus*, *E. obscura* ve *F. rubrolineata* egzotiktir (Mutlu ve Ergev, 2006; Engl, 1995; Rudman,1998). Bunlardan *C. persicus* kıyılarımızda aşırı çoğalarak denizel florayı baskı altında tutmaktadır (Üstüner vd., 2018).

Halk arasında Murex olarak bilinen *H. trunculus* antik dönemler için önemli bir gastropod türü olduğu antik çağlarda bu türden doğal olarak kral boyası olarak bilinen mor renkli bir boya elde edildiği bildirilmiştir (Wong, 2013).

Sonuç olarak; bu veriler biyolojik çeşitlilik açısından doğu Akdeniz'in giderek tropikal bir bölge olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca su alım ünitesini resif olarak kullanan çok sayıda canlının olması, o bölgede zayıf balıkçılık alanlarının yapay resif çalışmalarıyla zenginleştirilebileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada türlerin güncel bilimsel isimlerinin belirlenmesine katkıları için Sera Övgü Kabadayı Yıldırım'a teşekkür ederiz. Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

FİNANS

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finans desteği alınmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

YAZAR KATKILARI

Kurgu: MK; Metodoloji: MK; Deneyin gerçekleştirilmesi: KG; Veri analizi: KG, MK; Makale yazımı: MK, KG; Denetleme: MK. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

ETİK ONAY BEYANI

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

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan veriler, editörün gerekçeli talebi doğrultusunda paylaşımına açıktır.

KAYNAKLAR

- Acar, D., Örcen, S., Vardar, M., Sarkınç, M., Çağatay, M. N., Sari, E., Kılıç, Ö., Belivermiş, M., & Sezer, N. (28 September - 01 October 2017). *Environmental adaptation of Balanus sp. species in estuary of Istanbul (Haliç)*. 18th Paleontology-Stratigraphy Workshop with International Participation., Tekirdağ, 27.
- Aktaş, M., Genç, E., & Genç, M. A. (2011). Maturation, spawning and production of phyllosoma larvae of Mediterranean slipper lobster, *Scyllarides latus* (Latreille 1803) in captivity. *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment*, 17(3), 275-281.
- Antoniaodou, C., & Vafidis, D. (2009). Updated distribution of the holothuroid *Synaptula reciprocans* (Forsk., 1775) in the Mediterranean: does it follow shallow-water circulation patterns? *Aquatic Invasions*, 4(2), 361-363. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.2.9>
- Bortone, S. A., Kimmel, J. J., & Bundrick, C. M. (1989). A comparison of three methods for visually assessing reef fish communities: time and area compensated. *Northeast Gulf Science*, 10(2), 85-96. <https://doi.org/10.18785/negs.1002.02>
- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cinelli, F. (1999). Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241, 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00073-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00073-8)
- Çınar M. E, Bilecenoglu M, Ozturk B, & Can, A. (2006). New records of alien species on the Levantine coast of Turkey. *Aquatic Invasions*, 1, 84-90. <https://doi.org/10.3391/ai.2006.1.2.6>
- Engl, W. (1995). Specie prevalent emente lessepsian eat testatelongo le coste Turche. *Bollettino Malacologico*, 31(1-4), 43-50.
- Fabi, G., Scarcella G., Spagnolo, A., Bortone, A. S., Charbonnel, E., Goutayer, J. J., Haddad, N., Lök, & A., Trommelen, M. (2015). *Practical guidelines for the use of artificial reefs in the Mediterranean and the Black Sea*. Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean. No. 96. Rome, Italy.
- Gökoğlu M., Balci B. A., Çolak H., & Banbul B. (3-4 Kasım 2007). Akdeniz’de Uzun Dikenli DenizKestanesi’nin (*Diadema setosum*; Leske 1778) İkinci Kaydı. XI. Sualtı Bilim ve Teknolojisi Toplantısı. Koç Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, 115-118.
- Gökoğlu, M., Korun, J., Teker, S., & Julian, D. (2017). *Phaselis Antik Kenti Egzotik Bivalvia Türleri*. *Phaselis*, 3, 61-71. <https://doi.org/10.18367/Pha.17003>
- Katsenavakis; S., Acar, Ü., Ammar, I., Balci, B. A., et al. (2014). New Mediterranean Biodiversity Records (October, 2014). *Mediterranean Marine Science*, 15(3), 675-695. <https://doi.org/10.12681/mms.1123>
- Kondilatos, G., Corsini-Foka, M., & Pancucci-Papadopoulou, M. A. (2010). Occurrence of the first on-indigenous ascidian *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in Greek waters. *Aquatic Invasions*, 5(2), 181- 184. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.2.08>
- Kuşat, M., & Koca, H. U. (2009). Antalya Körfezinde Avcılık ile Yakalanan Balık Türleri ve Bunların İşlenerek Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma *BİBAD* 2(2), 41-47. <https://bibad.gen.tr/index.php/bibad/article/view/39> (Son erişim tarihi: 05.01.2022)

- Lambert; G., Karney, R. C., Rhee, Y. W., & Carman, R. M. (2016). Wild and cultured edible tunicates: a review. *Management of Biological Invasions*, 7(1), 59–66. <http://dx.doi.org/10.3391/mbi.2016.7.1.08>
- Mutlu E., & Ergev M. B. (2006). Dynamics And Ecology Of An Indo-Pacific Conch, *Conomurex persicus* (Mollusca: Gastropoda) In Southeastern Turkey. *Revista de Biologia Tropical*, 54, 117-129. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i1.13980>
- Özcan T., Katağan T., & Irmak E (2010). An Exotic Crab, *Charybdis Helleri* along the Turkish Coasts. *Biharean Biologist*, 4(1),1-5.
- Özgül, A. (2016). Akustik konumlandırma sistemlerinin yapay resif alanlarında kullanımı. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33 (4), 405-411. <https://doi.org/10.12714/egejfas.2016.33.4.15>
- Pier, J. Q. & J. A. Smith, J. A., (2019). *Echinodermata*. In: *The Digital Encyclopedia of Ancient Life*. <https://digitalatlasofancientlife.org/learn/echinodermata>
- Rousseau, M. A. (2008). *Massachusetts Marine Artificial Reef Plan*. Massachusetts Division of Marine Fisheries, Fisheries Policy Report FP – 3, Massachusetts Division of Marine Fisheries Department of Fish and Game Executive Office of Energy and Environmental Affairs Commonwealth of Massachusetts, 61.
- Rudman, W. B. (1998). *Coryphellina rubrolineata* (O'Donoghue, 1929). In Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. <http://www.seaslugforum.net/factsheet/flabbrub>
- Stone, R. B. (1985). *History of artificial reef use in the U. S*. In Frank M. D'Itri, (ed.), *Artificial Reefs, marine and fresh water applications*, Lewis Publishers, Inc. Chelsea, MI. 3-9.
- Üstüner H., Gökoğlu M., Çetin E. K., Yılmaz D., Sarıgöl B., & Özcan H. (2018). Investigation of the Prey-Predator Relationship Between Predator *Xyrichtys novacula* (L., 1758) and Lesepian Gastropod *Strombus persicus* (SWAINSON, 1821), *European International Journal of Science and Technology*, 17(3), 41-50.
- Yeşilçimen, H. Ö., & Kuşat, M. (2011). Monthly change of economic fish species caught by bottom trawl fishing from Antalya bay. *Journal of Fisheries Sciences.Com.*, 5(2), 115-121.
- Yokeş, B., & Galil, B. (2006). The first record of the Needle-spined urchin *Diadema setosum* (Leske, 1778) (Echinodermata: Echinoidea: Diadematidae) from the Mediterranean Sea. *Aquatic Invasions*, 1(3),188-190. <https://doi.org/10.3391/ai.2006.1.3.15>
- Wong, E. H. (2013). Purple Mania: How a Snail Created the Most Sought After Colour of All Time. *Textiles Asia*, 4(3), 7-13.
- WoRMS, (2022). <http://www.marinespecies.org/>. (Son erişim tarihi:05.01.2022)

Tiazolidin'in Zebra Balığı (*Danio rerio*) Solungaç ve Karaciğer Dokusunda AChE Enzim Aktivitesi ve Toplam Protein Seviyesi Üzerine Etkileri

Effects of Thiazolidine on AChE Enzyme Activity and Total Protein Level in Zebrafish (*Danio rerio*) Gill and Liver Tissue

Figen Esin Kayhan^{1*}, Harika Eylül Esmer Duruel², Şeyma Kızılkaya¹, Güllü Kaymak³, Cansu Akbulut⁴, Hayriye Genç⁵, Mustafa Zengin⁵, Nazan Deniz Yön Ertuğ⁴

¹Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34722, İstanbul.

²Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Meslek Yüksek Okulu, Laborant Sağlığı ve Veterinerlik Programı, 46340, Kahramanmaraş. 0000-0002-0792-2062

³Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Simav Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü, 43100, Simav, Kütahya. G.K. 0000-0001-6309-0208

⁴Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 54050, Sakarya.

⁵Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 54050, Sakarya.

* Sorumlu yazar: fekayhan@marmara.edu.tr

Geliş: 06.10.2021

Kabul: 02.02.2022

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Kayhan, F. E., Esmer Duruel, H., Kızılkaya, Ş. Kaymak, G., Akbulut, C., Genç, H., Zengin, M., & Yön Ertuğ, N. D. (2022). Tiazolidin'in Zebra Balığı (*Danio rerio*) Solungaç ve karaciğer dokusunda AChE enzim aktivitesi ve toplam protein seviyesi üzerine etkileri. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 179-186. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1001378>

Özet: Bu çalışmanın amacı, tiazolidin'in (Tiazolidin-4-karboksilik asit (4S)-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil) zebra balığı (*Danio rerio*) solungaç ve karaciğer dokusunda asetilkolinesteraz enzim (AChE) aktivitesi ve total protein (TP) düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Zebra balıkları tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm farklı dozlarına 96 saat süreyle maruz bırakılmıştır. AChE enzim aktivitesi karaciğer dokusunda, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla artmıştır. Solungaç dokusunda ise, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla AChE enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Total protein seviyesi karaciğer dokusunda, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla azalmıştır. Solungaç dokusunda ise, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla total protein seviyelerinin önemli sayılabilecek oranda arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada tiazolidinin zebra balığı solungaç ve karaciğer dokuları üzerinde az da olsa zararlı etkilere neden olabileceği görülmüştür.

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of thiazolidine (4S)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) thiazolidine-4-carboxylic acid) on acetylcholinesterase enzyme (AChE) activity and total protein (TP) levels in zebrafish (*Danio rerio*) gill and liver tissue. Zebrafish were exposed to 0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm different doses of thiazolidine for 96 hours. AChE enzyme activity increased in liver tissue in 0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm dose groups of thiazolidine compared to the control group. In the gill tissue, AChE enzyme activity was decreased in 0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm dose groups of thiazolidine compared to the control group. Total protein level in liver tissue decreased in 0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm dose groups of thiazolidine compared to the control group. In the gill tissue, total protein levels were significantly increased in the 0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm dose groups of thiazolidine compared to the control group. In conclusion, it was seen that thiazolidine may cause some harmful effects on zebrafish gill

Anahtar kelimeler

- Tiazolidin
- Zebra balığı
- Solungaç
- Karaciğer
- AChE Enzim Aktivitesi

Keywords

- Thiazolidine
- Zebrafish
- Gill
- Liver
- AChE Enzyme Activity



and liver tissues in this study.

1. GİRİŞ

Bu çalışmanın amacı, tiazolidin'in (Tiazolidin-4-karboksilik asit (4S)-2- (4-hidroksi-3-metoksifenil) zebra balığı (*Danio rerio*) solungaç ve karaciğer dokusunda asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi ve total protein (TP) düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Tiazolidin'ler biyoloji, tıp ve farmakolojide kullanılan beş üyeli heterosiklik organik bileşiklerdir (Saxena vd., 2001). Tiazolidinler, tiyolün aldehid veya keton ile yoğunlaştırılmasıyla sentezlenir. Bu süreç geri dönüşümlü olduğu için tiazolidinler suda tekrar aldehid ve tiol ayrışır. Tiazolidin türevleri antimikrobiyal aktivite gibi bazı önemli biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahiptir (Shanmugapandiyar vd., 2010). Bhoot ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* gibi çeşitli bakteri suşları ile *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* mantarlarını kullanarak tiazolidin bileşiklerinin antimikrobiyal ve antifungal aktivitelerini gözlemlemişlerdir (Bhoot vd., 2006). Gram (+) ve gram (-) bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitesinin gözlemlendiği başka bir çalışmada mevcuttur (Akbulut vd., 2017).

Tiazolidin türevleri aynı zamanda antibiyotik, antidiyabetik, antiinflamatuvar ve anti epileptik aktivitelere de sahiptir. Bu nedenle tiazolidin türevleri çok çeşitli ilaç gruplarının içerisinde bulunur (Altan vd., 2006; Silva vd., 2001; Sohda vd., 1982). Örneğin, bir antidiyabetik ilaç olan pioglitazon bir adet tiazolidin halkası içerir. Tiazolidin halkası içeren başka bir ilaç ise antibiyotik penisilin'dir. Zebra balığı son yıllarda toksikolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir omurgalı model organizmadır. Genomu, insan genomu ile %70 oranında homolog olduğu için zebra balığı ile çalışmanın bazı önemli avantajları vardır. Zebra balığı aynı zamanda çeşitli toksikantlara karşı dayanıklı bir tür olarak da bilinmektedir (Zhao vd., 2021). Zebra balığının şeffaf embriyolara sahip olması, bakımının kolay ve ucuz olması ve sık yumurtlayan bir tür olması onları araştırma laboratuvarları için ideal bir model organizma haline getirmiştir (Zhu vd., 2019; Akbulut vd., 2017; Hanumantharao vd., 2005; Kutluyer ve Aksakal 2013).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada zebra balıkları tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm farklı dozlarına 96 saat süreyle akvaryum koşullarında maruz bırakıldı. Karaciğer metabolik fonksiyonu yüksek bir organdır. Bu nedenle çevresel kirleticilerin etkilerinin biyokimyasal ve histolojik metodlarla izlenmesi mümkün olmaktadır. Solungaçlar ise ortamda bulunan kirleticilerle ilk etkileşen organlardır ve bu nedenle toksikolojik araştırmalarda önemlidir. Zebra balıkları (*Danio rerio*) Cyprinidae familyasına ait bir tatlı su balığıdır. İnsan genomu ile homolog genlere sahip olması nedeniyle çeşitli hastalıklarının araştırılmasında kullanılan bir omurgalı model organizmadır (Chen vd., 2020; Ahkin Chin Tai ve Freeman, 2020; Keng vd., 2021).

2.1. Zebra balıklarının eldesi ve laboratuvara uyumu

Çalışmamızda kullanılan 4-5 cm boylarındaki erkek ve dişi zebra balıkları ticari akvaryumculardan temin edildi. Laboratuvar ortamında zebra balıklarının sirkadiyen ritmini dengede tutmak amacıyla 14:10 aydınlık:karanlık sistem oluşturuldu. Her grup için sürekli havalandırılan, 10 litrelik klorsuz su dolu akvaryumlarda on adet balık bulunduruldu (n=40). Balıklar günde iki kez kuru yemle beslendi. Akvaryumların sıcaklığı ortalama $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ve suyun pH'ı 6,9-7,2 olarak sabit tutuldu. Balıklara, deney süresince hayvan refahına uygun standart kurallar uygulandı.

2.2. Solungaç ve karaciğer doku homojenatının hazırlanması

Solungaç ve karaciğer örneklerinin homojenizasyonu amacıyla dokular tartıldı. Soğutulmuş homojenat tamponu ile eppendorf tüplerine koyuldu ve cam boncuklar yardımı ile homojenizatörde parçalandı. Çalışmanın her aşamasında örnekler buz içerisinde korundu. Homojenatlar 4°C 'de 10000

rpm devirde, 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alındı ve biyokimyasal analizler uygulandı.

2.3. Biyokimyasal parametrelerin tayini

Deney düzeneğinde zebra balıkları 96 saat süreyle tiazolidinin farklı dozlarına maruz bırakıldı. Deney grupları; 0,2 ppm grubu, 0,4 ppm grubu, 0,6 ppm grubu ve kontrol grubu olarak düzenlendi. Süre sonunda balıklar soğuk şoku ile bayıltılarak solungaç ve karaciğer organları disekte edildi. Daha sonra biyokimyasal analizler için solungaç ve karaciğer dokularının %10'luk homojenatları hazırlandı. Asetilkolin esteraz enzim aktivitesi (AChE) ve total protein (TP) seviyelerini belirlemek için uygun prosedürler uygulandı. Deneyler üç kez tekrarlandı.

2.4. Asetilkolin esteraz (AChE) enzim aktivitesinin belirlenmesi

AChE, dokularda asetilkolinin inbisyonunda görev yapan bir enzimdir (Firidin vd., 2015; Oruç, 2010). AChE enzim aktivitesi tayini, DNTB ile dokudaki alifatik tiyol bileşiklerinin hafif alkali ortamda reaksiyonu sonucunda tiyol molekülü başına oluşan p-nitrofenol anyon miktarının 412 nm'de spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır (Ellman vd., 1961).

2.5. Total Protein (TP) seviyesinin belirlenmesi

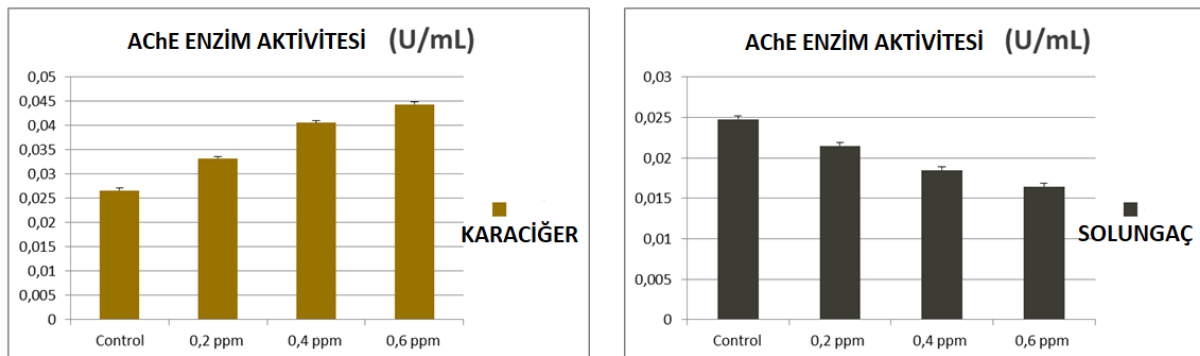
Bradford yöntemi ile protein tayininde Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası kullanıldı. Bu boya proteinlere bağlanarak, proteinlerdeki asidik ve bazik gruplar ile etkileşme neticesinde renkli bir çözelti oluşturdu. Elde edilen renkli sıvı 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Bradford, 1976).

2.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Çalışma verileri aritmetik ortalamalar ve standart sapmalar olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkların anlamlılığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi ve Student's *t*- testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

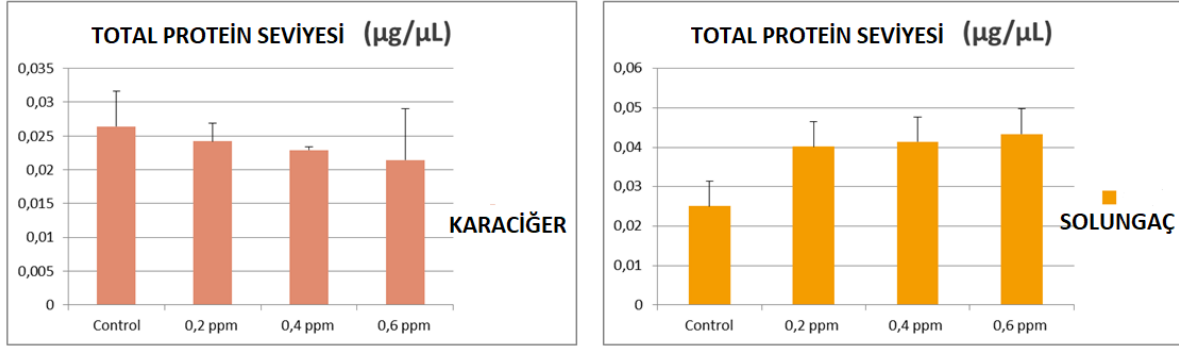
AChE enzim aktivitesi karaciğer dokusunda, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla arttı. Solungaç dokusunda ise, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla AChE enzim aktivitesinin azaldığı görüldü (Şekil 1). Zebra balığı karaciğer dokusunda tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm dozlarına 96 saatlik maruziyeti sonrası AChE enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,01$). Zebra balığı solungaç dokusunda tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm dozlarına 96 saatlik maruziyeti sonrası AChE enzim aktivitesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,01$).



Şekil 1. Tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm dozlarına maruz kalan zebra balığı karaciğer ve solungaç dokusundaki asetilkolin esteraz (AChE) enzim aktivitesi seviyeleri.

Total protein seviyesi karaciğer dokusunda, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla azaldı. Solungaç dokusunda ise, tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve

0,6 ppm doz gruplarında, kontrol grubuna oranla total protein seviyelerinin önemli sayılabilecek oranda arttığı görüldü (Şekil 2). Zebra balığı karaciğer dokusunda tiazolidin'in tüm doz gruplarına 96 saatlik maruziyeti sonrası total protein seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,01$). Zebra balığı solungaç dokusunda tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm dozlarına 96 saatlik maruziyeti sonrası total protein seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 2. Tiazolidin'in 0,2 ppm, 0,4 ppm ve 0,6 ppm dozlarına maruz kalan zebra balığı karaciğer ve solungaç dokusundaki total protein (TP) seviyeleri.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler, memelilerde olduğu gibi sucul organizmalarda da metabolik olayları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Asetilkolinesteraz molekülü her biri 80 kDa moleküler ağırlıkta olan ve dört alt birimden oluşan bir proteindir. Asetilkolinesteraz karaciğerde sentezlenir. İlk olarak Elektrikli balık'ın (*Torpedo marmoneta*) elektrik organından izole edilmiştir. Asetilkolinesteraz sinir dokusunda, eritrosit membranlarında ve iskelet kaslarında bulunur (Liu vd., 2020). Asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek inaktif forma dönüşür ve kolin ve asetik asit olarak isimlendirilen iki inaktif molekül meydana gelmektedir. Dokularda asetilkolinin inhibisyonunda görev alan enzim asetilkolinesterazdır (Halliwell, 1995; Morales vd., 2004; Karabult ve Gülay, 2016; . AChE enziminin inhibisyonunun ölçülmesi, oksidatif stresten etkilenmenin bir biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Meng vd., 2021; Firidin vd., 2015).

Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositleri üzerindeki karbosülfan'ın (karbamat grubu insektisit) olası zararlı etkilerini araştıran bir çalışmada 60 günlük kronik karbosülfan maruziyetinin ardından AChE enzim aktivitesinin üç hafta kadar süren inhibisyonu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, balıklarda hareketsizlik, renk koyulaşması, huzursuz davranış ve canlılık kaybı gibi fiziksel parametrelerin gözlemlendiği rapor edilmiştir. (Çapkın, 2011). Konyalıoğlu ve Perçin (2017), yaptıkları çalışmada kafeslerde yetiştirilen Mavi Yüzgeçli Atlantik Orkinos'u (*Thunnus thynnus*) örneklerinin kan dokusunda doğal ortamda serbest yaşayan bireylere göre stres kaynaklı antioksidan enzim düzeylerinin (katalaz, asetilkolinesteraz gibi) daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Konyalıoğlu ve Perçin, 2017). Başka bir araştırmada, çevresel kirleticilere karşı asetilkolin esteraz aktivitesindeki değişimlerin araştırılmasının uygun bir parametre olduğu ve aynı zamanda nörotoksosite izleme çalışmalarında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Liu vd., 2020). Bizim çalışmamızda AChE aktivitesi karaciğer dokusunda tüm doz gruplarında kontrol grubuna göre biraz daha yüksek bulundu. Oksidatif stresin yani serbest radikallerin artması ile AChE salınımında bir artış olduğu ve bu yüzden AChE aktivitesinin artmış olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca karaciğerin metabolik bir organ olması nedeniyle stres etkilerini daha fazla göstereceği de olasıdır. Asetilkolin esteraz (AChE) enzimindeki aktivite artışının diğer bir nedeninin tiazolidin'in AChE enziminin yapısını bozarak düzgün çalışmasını engellemesi olduğu düşünülebilir. Solungaç dokusunda AChE enzim aktivitesi bütün doz gruplarında kontrol grubuna oranla azaldı. Bunun sebebi solungaçların

toksikantlarla ilk karşılaşılan organ olması sebebiyle akut bir yanıt vermeye henüz zaman bulamaması olabilir.

Toplam protein (TP) seviyeleri, sucul organizmalarda çevresel kirleticilerin olumsuz etkilerini belirlemek için kullanılan önemli bir biyokimyasal parametredir. Çünkü proteinler, tüm canlı türlerinin hayatta kalması için temel makromoleküllerdir ve organizmalarda doku ve organların büyüme ve gelişmesinin ana bileşenleridir (Fu vd., 2020; Guarda vd., 2003). Ayrıca enzimlerin, hormonların, nörotransmitterlerin ve kofaktörlerin öncüsüdürler (Qiu vd., 2019). Yapılan bir çalışmada, Güney Amerika tatlı su balığı olan *Leporinus obtusidens*, 8 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda tarımsal bir herbisit olan kloromazon'a maruz bırakıldı. Maruziyetin sonunda balıkların karaciğerindeki protein düzeylerinin arttığı bildirildi (Miron vd., 2008). Benzer şekilde, Moraes ve arkadaşları da pestisitler gibi etkenlerle karşılaşan balıklarda yüksek TP seviyeleri rapor etmişlerdir (Moraes vd., 2011).

Sucul ortama karışan çeşitli ilaç ve kimyasal kalıntılarının oksidatif hasar belirteçleri olarak antioksidan enzim aktivitesi ölçümlerinin doğal ortamlarında yaşayan balıklar üzerinde yapılması da ekotoksikolojik yönden önemlidir (Dai vd., 2014; Karaca vd., 2014; Kayhan vd., 2018). Pek çok kimyasal ve onların metabolitleri sucul organizmalarda oksidatif stres oluşturabilir. Hücresel homeostazinin korunmasında ve sürdürülmesinde rol oynayan antioksidan savunma sistemleri bu nedenle çok önemlidir. (Qiu vd., 2019; Kutluyur ve Aksakal, 2013; Karabulut ve Gülay, 2016; Zirong ve Shijun, 2007; Fırat vd., 2009). Protein içeriğinin azalması hücre yıkımlarının ve protein sentezinin bozulmasının işareti olabilir. Bizim çalışmamızda, solungaç dokusunda, her üç doz grubunda kontrol grubuna kıyasla toplam protein seviyeleri arttı. Karaciğer dokusunda ise tüm doz gruplarında kontrole oranla hafif bir azalma görüldü. Protein miktarındaki değişiklikler enzim sentezinin inhibisyonundan veya kimyasalların neden olduğu stres koşullarında ortaya çıkan yüksek enerji talebinden kaynaklanabilir (Tabassum vd., 2016; Oruç vd., 2006; Morales vd., 2004). Tiazolidin halkası biyolojik olarak aktif bir kimyasal yapıdır ve birçok farmakolojik aktivite ile ilişkilidir. Ancak tiazolidin halkası ile etkileşime girebilecek biyolojik moleküller henüz çok iyi bilinmemektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada tiazolidinin zebra balığı solungaç ve karaciğer dokuları üzerinde az da olsa zararlı etkilere neden olabileceği görüldü.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2014-02-20-002 proje numarası ile Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

FİNANS

Bu çalışma 2014-02-20-002 proje numarası ile Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

YAZAR KATKILARI

Kurgu: FEK, NDYE, MZ, HG; **Metodoloji:** FEK, NDYE, MZ; **Deneyin gerçekleştirilmesi:** HEED, ŞK, GK, CA; **Veri analizi:** GK, HEED, ŞK, CA, FEK, NDYE; **Makale yazımı:** FEK, NDYE, HG; **Denetleme:** FEK, NDYE, HG, MZ. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

ETİK ONAY BEYANI

Bu çalışma için etik kurul onayı bildirilmemiştir.

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

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

KAYNAKLAR

- Ahkin Chin Tai, J. K., & Freeman, J. L. (2020). Zebrafish as an integrative vertebrate model to identify mRNA mechanisms regulating toxicity. *Toxicology Reports*, 7, 559-570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.03.010>
- Akbulut, C., Öztürk, B., Genc, H., Zengin, M., & Yön, N. D. (2017). Developmental Toxicity of (4S)-2- (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) thiazolidine-4-carboxylic acid in Zebrafish (*Danio rerio*). Biological and Applied Sciences. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, e17160547. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160547>
- Altan, N., Dinçel, S. A., & Koca, C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(2): 51-56.
- Bhoot D. P., Khunt R. C., Sankhavra V. K., & Parekh H. H. (2006). Synthesis of Some New Heterocyclic Compounds with Potential Biological Activity. *Journal of Sciences*, 17(4): 323-325.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-250.
- Chen, X., Teng, M., Zhang, J., Qian, L., Duan, M., Cheng, Y., Zhao, F., Zheng, J., & Wang, C. (2020). Tralopyril induces developmental toxicity in zebrafish embryo (*Danio rerio*) by disrupting the thyroid system and metabolism. *Science of the Total Environment*, 746, 141860. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141860>
- Çapkin, E. (2011). Effects of carbosulfan on erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries Sciences*, 5(3), 240-249. <https://doi.org/10.3153/jfsc.com.2011028>
- Dai, Y. J., Jia, Y. F., Chen, N., Bian, W. P., Li, Q. K., Ma, Y. B., Chen, Y. L., & Pei, D. S. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1): 11-17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andes, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-92.
- Firat, Ö., Cogun, H. Y., Aslanyavrusu, S., & Kargin, F. (2009). Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn+Cd exposures. *Journal of Applied Toxicology*, 29, 295-301. <https://doi.org/10.1002/jat.1406>
- Firidin, G., Kargin, F., Firat, Ö., Cogun, H. Y., Firat, Ö., Firidin, B., & Yüzereroğlu, T. A. (2015). Antioxidant defence systems, lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity of *Oreochromis niloticus* exposed to mercury and mercury+selenium. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5), 1958-1965.
- Fu, J., Tan, Y. X. R., Gong, Z., & Bae, S. (2020). The toxic effect of triclosan and methyl-triclosan on biological pathways revealed by metabolomics and gene expression in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110039. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110039>
- Guarda V. L. M., Pereira M. A., De Simone C. A., Albuquerque J. F. C., Galdino S. L., & Chantegrel J. (2003). Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds. *Sulfur Letters*, 26, 17-27. <https://doi.org/10.1080/0278611021000048712>
- Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization, Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
- Hanumantharao P., Sambasivarao S. V., Soni L. K., Gupta A. K., & Kaskhedikar S. G. (2005). QSAR analysis of thiazole benzenesulfonamide substituted 3-pyridylethanolamines as beta3-adrenergic

- receptor agonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(12), 3167- 3173. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.119>
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş., (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76. <https://doi.org/10.24880/maeuvsfd.260790>
- Karaca, M., Varışlı, L., Korkmaz, K., Özaydın, O., Perçin, F., & Orhan, H. (2014). Organochlorine pesticides and antioxidant enzymes are inversely correlated with liver enzyme gene expression in *Cyprinus carpio*. *Toxicology Letters*, 230, 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.013>
- Kayhan, F. E., Kaymak, G., Esmer Duruel, H. E., & Tartar Kızılkaya, Ş. (2018). Biyolojik araştırmalarda zebra balığının (*Danio rerio* Hamilton, 1822) kullanılması ve önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 38-45. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gbad/issue/35699/358614>
- Keng P. L., Gong, Z. H., & Tse, W. K. F. (2021). Zebrafish as the toxicant screening model: Transgenic and omics approaches. *Aquatic Toxicology*, 234, 105813. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105813>
- Konyahoğlu, S., & Perçin, F. (2017). The comparison of lipid peroxidation, glutathione and antioxidant enzyme activities in blood obtained from captive and wild Northern Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758). *Free Radical Biology and Medicine*, 10(8), 18-107.
- Kutluyer, F., & Aksakal, E. (2013). Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(2), 101-107. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/omuanajas/issue/20217/214191>
- Liu, S., Deng, X., & Bai, L. (2020). Developmental toxicity and transcriptome analysis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos following exposure to chiral herbicide safener benoxacor. *Science of the Total Environment*, 761, 143273. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143273>
- Meng, Q., Yeung, K., & Chan, K. M. (2021). Toxic effects of octocrylene on zebrafish larvae and liver cell line (ZFL). *Aquatic Toxicology*, 236, 100-115. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105843>
- Miron, D. S., Prettob, A., Crestani, M., Gluszcak, L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., & Morsch, V. M. (2008). Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*L. obtusidens*). *Chemosphere*, 74, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.070>
- Moraes, B. S., Clasen, B., Loro, V. L., Pretto, A., Toni, C., De Avila, L. A., Marchesan, E., De Oliveira Machado, S. L., Zanella, R., & Reimche, G. B. (2011). Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.05.013>
- Morales, A. E., Perez-Jimenez, A., Hidalgo, M. C., Abellan, E., & Gabriel C. G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139(1-3), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Oruc, E. (2010). Oxidative Stress, Steroid Hormone Concentrations And Acetylcholinesterase Activity in *Oreochromis niloticus* Exposed to Chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 96, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- Qiu, L., Jia, K., Huang, L., Liano, X., Guo, X., & Lu, H. (2019). Hepatotoxicity of tricylazole in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 232, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.159>
- Saxena A. K., Pandey S. K., Seth P., Singh M. P., Dikshit M., & Carpy A. (2001). Synthesis and QSAR Studies in 2-(N-aryl-N-aryl) amino-4,5-dihydrothiazole Derivatives as Potential Antithrombotic Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 2025-2034. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00082-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00082-7)

- Shanmugapandiyan P, Denshing K. S., Ilavarasan R, Anbalagan N., & Nirmala R. (2010). Synthesis and Biological Activity of 2-(Thiazolidin- 4-One) Phenyl]-1h-Phenylbenzimidazoles and 2-[4-(Azetidin-2-One)- 3-Chloro-4-Phenyl]-1h-Phenyl benzimidazoles. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(2): 115-119. <http://ijpsdr.com/index.php/ijpsdr/article/view/94>
- Silva TG, Barbosa FSV, Brandao SSF, Lima MCA, Galdino SL, & Pitta IR. (2001). Synthesis and structural elucidation of new benzyldiene imidazolidines and acridinyldiene thiazolidines. *Heterocyclic Communications*, 7, 523–8.
- Sohda T, Mizuno K, Tawada H, Sugiyama Y, Fujita T, & Kawamastu Y. (1982). Studies on antidiabetic agents. I. Synthesis of 5-[4-(2-methyl-2-phenylpropoxy)-benzyl] thiazolidine-2,4-dione (AL-321) and related compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 3563-3573.
- Zhao, F., Zhang, M., Guo, M., Duan, M., Zheng, J., Chen, X., Liu, Y., & Qiu, L. (2021). Effects of sublethal concentration of metamifop on hepatic lipid metabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 238, 105938. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105938>
- Zhu, X. Y., Xia, B., Wu, Y. Y., Yang, H., Li, C. Q., & Li, P. (2019). Fenobucarb induces heart failure and cerebral hemorrhage in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 209, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.020>
- Zirong X., & Shijun B. (2007). Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.04.006>

Kocaeli (Türkiye)'deki Bazı Akarsuların (Dilderesi, Yalakdere, Kirazdere) Taban Makroomurgasız Faunası

Benthic Macroinvertebrate Fauna of Some Streams (Dilderesi, Yalakdere, Kirazdere) in Kocaeli (Turkey)

Ahmet Bayköse^{1,2,*}, Halim Aytekin Ergül¹, Deniz Anıl Odabaşı³, Nurcan Özkan⁴, Serpil Sağır Odabaşı⁵, Yunus Ömer Boyacı⁶

¹ Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Umuttepe Yerleşkesi, 41001, Kocaeli

² Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Balcalı Kampüsü, 01380, Adana

³ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi, Terzioğlu Kampüsü, 17020, Çanakkale

⁴ Trakya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İsmail Hakkı Tonguç Kampüsü, 22030, Edirne

⁵ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Teknolojileri Meslek Yüksekokulu, Terzioğlu Kampüsü, 17020, Çanakkale

⁶ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, 32200, Isparta

*Sorumlu yazar: abaykose@cu.edu.tr

Geliş: 30.09.2021

Kabul: 28.12.2021

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Bayköse, A., Ergül, H. A., Odabaşı, D. A., Sağır Odabaşı, S. & Boyacı, Y. Ö. (2022). Kocaeli (Türkiye)'deki bazı akarsuların (Dilderesi, Yalakdere, Kirazdere) taban Makroomurgasız faunası. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 187-207. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1002739>

Özet: Bu çalışma Dilderesi, Yalakdere ve Kirazdere akarsularının taban makroomurgasız faunasını belirlemek amacıyla Şubat 2019 – Kasım 2019 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Örneklemeler, her akarsuyun üç farklı bölgesinden seçilmiş, toplam dokuz örnekleme istasyonunda mevsimsel olarak yapılmıştır. Makroomurgasızların örneklenmesinde çoklu habitat yöntemi, Kuadrat ve Van Veen Grab kullanılarak uygulanmıştır. Laboratuvarında gruplarına ayrılan organizmalar, uygun teşhis anahtarları kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, Kirazdere akarsuyunda 45 familyaya ait 114 takson, Yalakdere akarsuyunda 33 familyaya ait 98 takson ve Dilderesi akarsuyunda 32 familyaya ait 89 takson olmak üzere toplamda çalışma boyunca 179 takson belirlenmiştir. Tespit edilen taban makroomurgasızlardan *Caenis* sp. ve *Paratrichocladius rufiventris*'in en yaygın taksonlar olduğu belirlenmiştir. Akarsuların mansaba yakın istasyonlarında sadece Oligochaeta, Chironomidae ve Gastropoda'ya ait taksonlar tespit edilirken, akarsuların kaynağa yakın istasyonlarında özellikle Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera gruplarına ait taksonlar tespit edilmiştir. Bu çalışma Dilderesi ve Kirazdere akarsularında taban makroomurgasız faunasının belirlenmesine yönelik ilk çalışmadır. Bunun yanında, 90 takson Yalakdere akarsuyu için yeni kayıttır.

Anahtar kelimeler

- Taban Makroomurgasızları
- Kocaeli
- Dilderesi
- Yalakdere
- Kirazdere

Abstract: This study was carried out to determine the benthic macroinvertebrate fauna of Dilderesi, Yalakdere, and Kirazdere Streams between February and November 2019. Sampling was performed seasonally at three sampling stations of each stream, nine stations in total, selected along the streams. The multihabitat sampling method was performed to collect macroinvertebrates using Surber-net, and Van Veen Grab. Organisms were sorted in the laboratory and then identified using appropriate identification keys. According to our results, a total of 179 taxa was determined throughout the study: 114 taxa belonging to 45 families in the Kirazdere stream, 98 taxa

Keywords

- Benthic Macroinvertebrates
- Kocaeli
- Dilderesi
- Yalakdere
- Kirazdere



belonging to 33 families in the Yalakdere stream, and 89 taxa belonging to 32 families in the Dilderesi stream. The most common taxa among the identified benthic macroinvertebrates are *Caenis* sp. and *Paratricochladius rufiventris*. Taxa belonging to Oligochaeta, Chironomidae, and Gastropoda were detected at the downstream regions in the streams, while the remaining taxa especially belong to Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera were detected at the upstream regions in the streams. This is the first study to determine the benthic macroinvertebrate fauna in Dilderesi and Kirazdere streams. Besides, 90 taxa are new records for Yalakdere.

1. GİRİŞ

Su ekosistemlerinin canlı kalite ve kantitesinin belirlenmesi, ilgili ekosistemin biyolojik çeşitliliği hakkında veri tabanı oluşturulmasının yanı sıra, yaşam için ne ölçüde elverişli olduğu konusunda da fikir verecektir. Çalışmamızda 0,5 mm'den büyük, tatlısu ekosistemleri için indikatör organizmalar olan taban makroomurgasızlarının Kocaeli ilinde yer alan bazı akarsulardaki dağılımları araştırılmıştır. Aşağıda, ülkemizde taban makroomurgasızları konusunda yapılan bazı çalışmalar sıralanmıştır. Bu çalışmalar ülkemizin farklı bölgelerindeki taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliğinin oldukça zengin olduğunu ortaya koymaktadır. (Şahin ve Baysal, 1972, Tanatmış, 1995, Tanatmış, 2001, Özbek vd., 2003, Çabuk vd., 2004, Narin ve Tanatmış, 2004, Özbek ve Ustaoglu, 2005, Duran, 2006, Küçük ve Albaz, 2008, Akbulut vd., 2009, Ersan vd., 2009, Kalyoncu vd., 2009, Kazancı ve Türkmen, 2010, Kazancı vd., 2010, Girgin, 2010, Girgin ve Kazancı, 2010, Çamur-Elipek vd., 2010, Özbek ve Özkan, 2011, Zeybek vd., 2012, Kazancı vd., 2013, Zeybek vd., 2014, Odabaşı vd., 2015, Kazancı vd., 2015, Arslan vd., 2016, Zeybek, 2017, Özkan, 2018, Gültekin vd., 2019, Odabaşı vd., 2019, Odabaşı vd., 2020, Bal vd., 2021).

Akay ve Dalkıran (2019) tarafından, bir bölümü Kocaeli ili sınırlarında bulunan Yalakdere'de, yapılan çalışma dışında, Kocaeli ili genelinde yapılmış bir çalışmaya açık literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışma, Kocaeli gibi sanayi faaliyetlerinin ve nüfus yoğunluğunun çok yüksek olduğu bir bölgenin akarsularında yapılan, ilk kapsamlı taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliği çalışmasıdır. O nedenle çalışmamızın Kocaeli ili taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliği konusunda önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı, 1) Kocaeli ili sınırları içerisindeki en geniş drenaj alanlarına sahip akarsuların taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliğini tespit etmek ve 2) endüstri kuruluşlarına ve yoğun nüfuslu yerleşim birimlerine farklı mesafelerde taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliğinde görülen değişimleri belirlemektir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Alanı

Bu araştırmanın gerçekleştirildiği Kocaeli ili, Marmara Bölgesinin doğusunda, 3,623 km² yüzölçümüne sahip, Yalova, Bursa, İstanbul ve Sakarya illerine komşu bir sanayi kentidir. İzmit Körfezini çevreleyen şehrin, ayrıca Sapanca Gölü'ne ve Karadeniz'e de kıyısı bulunmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (2021) verilerine göre nüfusu 2 milyondan fazladır ve 563 kişi/km² ile Türkiye'nin İstanbul'dan sonra, en yoğun nüfusuna sahip ikinci kentidir.

Kocaeli ilinde İzmit Körfezine deşarj olan irili ufaklı toplam 23 adet akarsu bulunmaktadır. Şehrin güneydoğusunda yer alan Kirazdere 47,75 km toplam uzunluğu ve 597 m³/sn azami debisi ile bu akarsuların en uzun ve azami debisi en yüksek akarsudur. Kirazdere'yi 37,1 km toplam uzunluk ve 478 m³/sn azami debisi ile şehrin güney batısında yer alan Yalakdere takip etmektedir. Şehrin kuzeybatısında yer alan ve birçok ağır sanayi tesisinin bulunduğu Dilovası ilçesinden geçen Dilderesi ise 17 km toplam uzunluğa ve 371 m³/sn azami debiye sahiptir.

Tablo 1. İstasyonların koordinatları ve istasyonlara etki eden çevre faktörleri.

Örnekleme İstasyonları	İstasyonların Koordinatları	Fiziksel Baskılar (Baraj, Habitat Tahribatı vb.)	Kentleşme	Endüstriyel Faaliyetler	Tarımsal Faaliyetler	Rekreasyonel Faaliyetler
KD1	40°38'21.80"K 29°57'37.51"D					
KD2	40°40'43.49"K 29°58'21.99"D	+	+		+	+
KD3	40°44'7.54"K 29°56'29.33"D	+	+	+		
YD1	40°34'31.61"K 29°31'36.61"D				+	
YD2	40°38'8.03"K 29°30'26.72"D			+	+	
YD3	40°42'31.68"K 29°28'24.08"D	+	+	+	+	
DD1	40°51'2.54"K 29°31'1.07"D				+	
DD2	40°50'12.97"K 29°30'56.05"D					+
DD3	40°46'47.52"K 29°31'49.11"D	+	+	+		

2.2. Yöntem

Örnekleme çalışmaları Kış (Şubat-2019), İlkbahar (Mayıs-2019), Yaz (Ağustos-2019) ve Sonbahar (Kasım-2019) mevsimlerinde gerçekleştirilmiştir. Taban makroomurgasız örneklemeleri, örnekleme noktasının derin olduğu mansap bölgelerinde 15 cm x 15 cm ağız açıklığına sahip Van Veen kepçesiyle, diğer istasyonlarda ise 25 cm x 25 cm yüzey alanına sahip surber net ile gerçekleştirilmiştir. Makroomurgasız örneklemeleri, çoklu habitat yöntemine göre, örnekleme noktasında bulunan habitat çeşitlerinin (kum, çakıl, vejetasyon vb.) alansal olarak %5'lik kısmı için 1 adet örnekleme olacak şekilde yapılmıştır (TS EN ISO 16150). Buna göre örnekleme, mansap istasyonlarında Van Veen kepçesiyle en az 6 defa, akarsuların daha üst alanlarında surber net ile yapılan örneklemelerde ise 20 defa olacak şekilde uygulanmıştır.

Alınan taban makroomurgasız örnekleri, büyük taş, çakıl, bitki, detritus parçacıkları ayrıldıktan sonra, 500 µm göz açıklıklı elekten geçirilerek, 1 L'lik kaplara konularak, %80'lik etil alkol ile yerinde fikse edilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler, stereo mikroskop altında (Olympus ZX24) üst takson gruplarına ayrılmıştır. CX23 binoküler ışık mikroskobu ve stereo mikroskop kullanılarak teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

Taksonların belirlenmesinde; tatlı su gastropod ve bivalvia türleri için Radoman (1983), Glöer (2019), Zettler ve Glöer (2006), Diptera için Cranston (1982), Şahin (1984; 1986; 1991), Epler (2001), Fitkau ve Roback (1983), Pinder ve Reiss (1983) ve Saeter (1980), Oligochaeta için Wetzler ve ark. (2009), Brinkhurst ve Jamieson (1971), Kathman ve Brinkhurst (1998), Timm (2009), Hirudinea için Eliot ve Mann (1979), Amphipoda için Karaman ve Pinkster (1977a, 1977b), Ruffo (1982), Eggers ve Martens (2001); Fitzpatrick (1983); Özbek vd. (2003), Isopoda için Henry ve ark. (1996) ve Çamur ve Kırgız (2000), Ephemeroptera için Kimmins (1972), Belfiore (1983), Kazancı (2001), Berner ve Pescador (1988), Eliot vd., (1988), Tercedor (1990), Tanatmış (1993), Haybach (1999) ve Bauernfield ve Lechthaler (2014), Plecoptera için Illies (1955) ve Zwick (2004), Trichoptera için Hickin (1968); Macan (1959); Stresemann vd. (1986); Zamora-Muñoz vd. (1995), Ulmer (1961), Jansson ve Vuoristo (1979), Brohmer (1979), Edington ve Hildrew (1981), Wallace vd., (1990) ve Lechthaler ve Stockinger (2005), Coleoptera için Angus (1988; 1992) ve Aukema & Rieger (1995), Odonata için Demirsoy (1982), Stobbe (1995) ve Askew (2004)'den yararlanılmıştır.

Baskınlık oranı, "D" % baskınlık, "A" belirli istasyonda tespit edilen bir taksonun birey sayısı, "T" belirli bir istasyonda tespit edilen toplam birey sayısı olmak üzere,

$$D = \frac{A}{T} \times 100$$

formülüne göre belirlenmiştir.

Frekans, “F” % frekans, “A” belirli bir türün tespit edildiği istasyon sayısı olmak üzere,

$$F = \frac{A}{9} \times 100$$

formülüne göre belirlenmiştir.

Türlerin % D ve % F değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

3. BULGULAR

Dört farklı mevsimde, 3 farklı akarsuda ve 9 farklı istasyonda gerçekleştirilen örneklemelerde en fazla istasyonda tespit edilen takson *Limnodrilus* sp. (F %77,78) olmuştur. *Tubifex tubifex*, *Microtendipes chloris*, *Paratrichocladius rufiventris*, *Procladius* (Holotanypus) sp., *Rheotanytarsus* sp., *Baetis* sp., *Caenis* sp., *Hygrobates* sp. ve *Hydropsyche* sp. taksonları da (F %66,67) fazla sayıda istasyonda tespit edilmişlerdir (Tablo 2).

KD1, KD2, YD1, YD2, DD1 ve DD2 istasyonlarında organik kirleticilere toleransı düşük olan (Mandaville 2002, Kazancı vd., 2010) Ephemeroptera, Plecoptera ve Trichoptera takımı üyeleri tespit edilmiştir. Yine bu istasyonlarda Diptera, Coleoptera, Odonata, Decapoda ve Lumbriculidae taksonlarının organik kirliliğe toleransı düşük bireyleri de tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tolerans değerleri Mandaville (2002)’in çalışmasında bulunmayan *Potamon* sp. Kazancı vd. (2013)’e göre familya düzeyinde düşük toleranslı bir taksondur. Ancak bir tolerans değeri bu canlı için verilmemiştir. Ayrıca Trichoptera Gen. sp. familya üstü bir sınıflandırma olduğundan tolerans değeri yoktur.

Çalışma süresince, Gastropoda ve Bivalvia sınıflarından sırasıyla 7, ve 1, Oligochaeta ve Hirudinea alt sınıflarından sırasıyla 4 ve 2, Diptera, Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera, Odonata, Amphipoda, Coleoptera, Decapoda, Tricladida, ve Isopoda takımlarından sırasıyla 14, 4, 8, 2, 4, 1, 5, 1, 1 ve 1, Hydracarina kladından 3 familya olmak üzere toplam 59 farklı familya tespit edilmiştir. Taksonların akarsulara göre dağılımına bakıldığında, çalışma sürecinde, Kirazdere’de 45 familyaya ait 114, Yalakdere’de 33 familyaya ait 98 ve Dilderesi’nde 32 familyaya ait 89 olmak üzere, toplam 179 takson tespit edilmiştir (Tablo 2).

Ablabesmyia monilis, *Baetis* sp., *Caenis* sp., *Chironomus anthracinus*, *Cladotanytarsus mancus*, *Corynoneura scutellata*, *Dicrotendipes tritonus*, *Hydropsyche* sp., *Hygrobates* sp., *Lebertia* sp., *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Micropsectra praecox*, *Microtendipes chloris*, *Nais christinae*, *Nais elinguis*, *Nais variabilis*, *Paracladius conversus*, *Paratanytarsus lauterborni*, *Paratrichocladius rufiventris*, *Physella acuta*, *Polypedilum convictum*, *Procladius* (Holotanypus) sp., *Prodiamesa olivacea*, *Rheotanytarsus* sp., *Simulium* sp., *Stictochironomus devinctus*, *Tanytarsus gregarius*, *Torrenticola* sp., ve *Tubifex tubifex* taksonlarının her 3 akarsuda da bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

İstasyonlarda tespit edilen taksonlar, 4 mevsimde tespit edilen ortalama birey sayıları, tolerans değerleri, % F ve % D değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. İstasyonlarda Tespit Edilen Taksonların Ortalama Birey Sayıları D % ve F % Değerleri.

Takson	Tolerans Değerleri	F %	KD1 n(ort)	KD1 (D %)	KD2 n(ort)	KD2 (D %)	KD3 n(ort)	KD3 (D %)	YD1 n(ort)	YD1 (D %)	YD2 n(ort)	YD2 (D %)	YD3 n(ort)	YD3 (D %)	DD1 n(ort)	DD1 (D %)	DD2 n(ort)	DD2 (D %)	DD3 n(ort)	DD3 (D %)
TURBELLARIA																				
<i>Dugesia</i> sp.	6	11,11	6,5	2,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OLIGOCHAETA																				
<i>Chaetogaster</i> sp.	7	11,11	-	-	0,75	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eiseniella tetraedra</i> Savigny, 1826	6	22,22	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Embolecephalus velutinus</i> Grube, 1879	8	11,11	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enchytraeidae Gen. sp.	10	22,22	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,61
<i>Limnodrilus claperedianus</i> Ratzel, 1868	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862	10	55,56	-	-	0,75	0,11	-	-	-	-	10,25	6,91	1	11,76	-	-	2	0,29	14,25	8,65
<i>Limnodrilus profundicola</i> Verrill, 1873	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	1,52
<i>Limnodrilus</i> sp.	10	77,78	0,25	0,09	-	-	0,5	5,56	-	-	4,5	3,04	0,5	5,88	0,25	0,02	0,25	0,04	6,25	3,79
<i>Limnodrilus udekemianus</i> Claparede, 1862	10	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	83,25	50,53
Lumbricidae Gen. sp.	6	33,33	-	-	2,25	0,32	-	-	2	0,41	-	-	-	-	1,5	0,13	-	-	-	-
<i>Lumbriculus variegatus</i> Muller, 1774	5	22,22	-	-	5,25	0,74	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	0,13	-	-	-	-
Naidinae Gen. sp.	8	33,33	-	-	-	-	-	-	1	0,2	-	-	1,25	14,71	-	-	1,5	0,22	-	-
<i>Nais barbata</i> Muller, 1774	8	22,22	-	-	2	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,04	-	-	-	-
<i>Nais christinae</i> Kasprzak, 1973	8	44,44	-	-	1	0,14	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	1,75	0,16	12,5	1,8	-	-
<i>Nais communis</i> Piguët, 1906	8	22,22	1,5	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,14	-	-
<i>Nais elinguis</i> Muller, 1774	8	33,33	1	0,35	-	-	-	-	2	0,41	-	-	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
<i>Nais pardalis</i> Piguët, 1906	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
<i>Nais</i> sp.	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	0,22	-	-
<i>Nais stolci</i> Hrabě, 1981	8	11,11	13,5	4,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nais variabilis</i> Piguët, 1906	8	33,33	-	-	0,25	0,04	-	-	0,75	0,15	-	-	-	-	-	-	6	0,86	-	-
<i>Ophidonais serpentina</i> Müller, 1774	6	22,22	-	-	8	1,13	-	-	1,75	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paranais litoralis</i> Müller, 1784	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	2,94	-	-	-	-	-	-
<i>Potamothenis hammoniensis</i> Michaelsen, 1901	8	22,22	-	-	0,75	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
<i>Pristina aequiseta</i> Bourne, 1891	8	33,33	-	-	-	-	0,25	2,78	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	0,5	0,07	-	-
<i>Pristina longiseta</i> Ehrenberg, 1828	8	11,11	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pristina menoni</i> Aiyer, 1929	8	11,11	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pristina rosea</i> Piguët, 1906	8	11,11	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psammoryctides deserticola</i> Grimm, 1876	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	0,51	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stylaria lacustris</i> L., 1758	6	11,11	-	-	10,25	1,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tubifex tubifex</i> Muller, 1774	10	66,67	-	-	1,25	0,18	-	-	0,25	0,05	4,25	2,87	-	-	0,5	0,04	2,25	0,32	27,5	16,69
Tubificinae Gen. sp.	10	66,67	-	-	3	0,42	1,5	16,67	-	-	4,75	3,2	1,75	20,59	-	-	3,25	0,47	29,5	17,91
<i>Uncinails uncinata</i> Ørsted, 1842	8	22,22	-	-	-	-	-	-	1	0,2	-	-	0,25	2,94	-	-	-	-	-	-

Takson	Tolerans Değerleri	F %	KD1 n(ort)	KD1 (D %)	KD2 n(ort)	KD2 (D %)	KD3 n(ort)	KD3 (D %)	YD1 n(ort)	YD1 (D %)	YD2 n(ort)	YD2 (D %)	YD3 n(ort)	YD3 (D %)	DD1 n(ort)	DD1 (D %)	DD2 n(ort)	DD2 (D %)	DD3 n(ort)	DD3 (D %)
HIRUDINEA																				
<i>Erpobdella octoculata</i> L., 1758	8	11,11	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helobdella stagnalis</i> L., 1758	8	11,11	-	-	0,5	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BIVALVIA																				
<i>Pisidium casertanum</i> Poli, 1791	7	33,33	0,25	0,09	1,5	0,21	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pisidium</i> sp.	6	33,33	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	0,5	0,04	0,5	0,07	-	-
<i>Pisidium subtruncatum</i> Malm, 1855	6	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	2	0,29	-	-
GASTROPODA																				
<i>Ancylus fluviatilis</i> Muller, 1774	7	11,11	12	4,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ecrobia ventrosa</i> Montagu, 1803	7	22,22	-	-	-	-	0,25	2,78	-	-	-	-	0,5	5,88	-	-	-	-	-	-
<i>Galba truncatula</i> Muller, 1774	6	22,22	-	-	-	-	-	-	1	0,2	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gyraulus (Armiger) crista</i> L., 1758	8	22,22	-	-	-	-	0,25	2,78	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gyraulus piscinarum</i> Bourguignat, 1852	8	33,33	-	-	8,5	1,2	-	-	1,25	0,26	-	-	0,25	2,94	-	-	-	-	-	-
<i>Physella acuta</i> Draparnaud, 1805	8	44,44	-	-	0,75	0,11	-	-	-	-	0,5	0,34	1,5	17,65	-	-	2,75	0,4	-	-
Planorbidae Gen. sp.	7	11,11	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Planorbis intermixtus</i> Mousson, 1874	7	11,11	-	-	-	-	0,25	2,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> Gray, 1843	8	33,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	738	65,76	175,5	25,28	0,25	0,15
<i>Pseudamnicola</i> sp.	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	2,94	-	-	-	-	-	-
<i>Radix labiata</i> Rossmässler, 1835	6	22,22	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Valvata piscinalis</i> Müller, 1774	8	11,11	-	-	-	-	1,25	13,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Valvata</i> sp.	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
AMPHIPODA																				
<i>Gammarus pulex</i> L., 1758	6	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	8,82	-	-	-	-	-	-
<i>Gammarus</i> sp.	6	33,33	14	4,93	15,5	2,19	-	-	-	-	-	-	-	-	6,5	0,58	-	-	-	-
DECAPODA																				
<i>Potamon</i> sp.	-	22,22	-	-	1,25	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	1,75	0,16	-	-	-	-
ISOPODA																				
<i>Asellus aquaticus</i> L., 1758	8	11,11	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asellus</i> sp.	8	11,11	-	-	0,5	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COLEOPTERA																				
<i>Agabus</i> sp.	5	22,22	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Copelatus</i> sp.	5	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Dytiscus</i> sp.	5	11,11	-	-	2,75	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ectopria</i> sp.	5	11,11	1,75	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Elmis</i> sp.	4	11,11	1	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helophorus</i> sp.	5	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	0,25	0,04	-	-
<i>Hydraena</i> sp.	5	11,11	-	-	4,5	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenelmis</i> sp.	5	22,22	-	-	0,75	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-

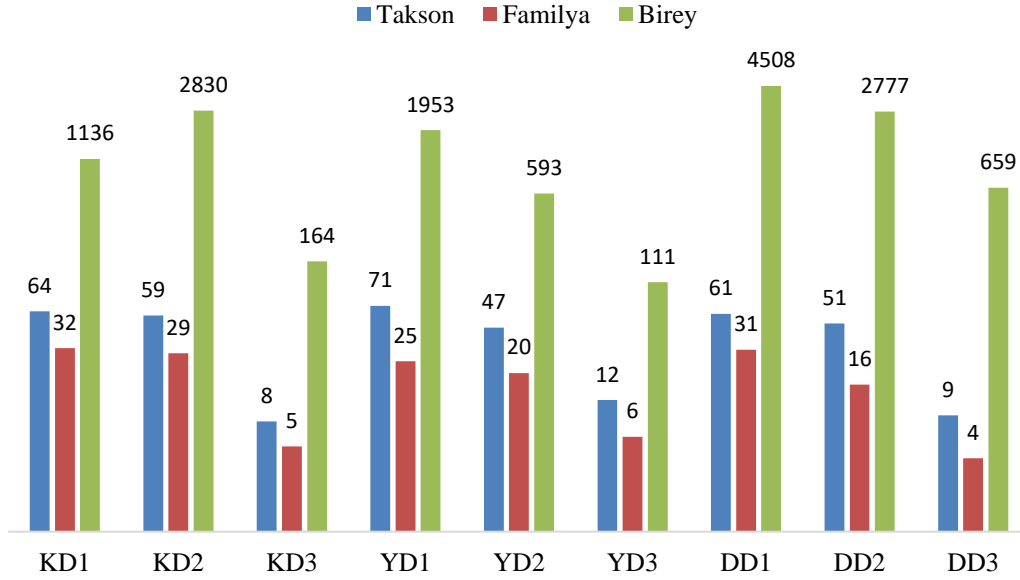
Takson	Tolerans Değerleri	F %	KD1 n(ort)	KD1 (D %)	KD2 n(ort)	KD2 (D %)	KD3 n(ort)	KD3 (D %)	YD1 n(ort)	YD1 (D %)	YD2 n(ort)	YD2 (D %)	YD3 n(ort)	YD3 (D %)	DD1 n(ort)	DD1 (D %)	DD2 n(ort)	DD2 (D %)	DD3 n(ort)	DD3 (D %)
DIPTERA																				
<i>Ablabesmyia aequidensis</i> Sahin, 1987	8	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	0,07	-	-	-	-
<i>Ablabesmyia monilis</i> L., 1758	8	55,56	1,25	0,44	1	0,14	-	-	1,25	0,26	-	-	-	-	2,25	0,2	0,5	0,07	-	-
<i>Arctopelopia</i> sp.	7	22,22	-	-	-	-	-	-	5	1,02	-	-	-	-	-	-	15,5	2,23	-	-
<i>Atherix</i> sp.	4	22,22	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Atrichopogon</i> sp.	6	11,11	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bezzia</i> sp.	6	22,22	-	-	5	0,71	-	-	1,75	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Blepharicera</i> sp.	0	11,11	1,5	0,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brillia longifurca</i> Kieffer, 1921	5	33,33	2,25	0,79	3,75	0,53	-	-	4,75	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brillia modesta</i> Meigen, 1830	5	11,11	-	-	-	-	-	-	0,75	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caloparyphus</i> sp.	7	22,22	0,5	0,18	0,25	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetocladius piger</i> Goetghebuer, 1913	6	11,11	0,75	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chironomus anthracinus</i> Zetterstedt, 1860	10	33,33	-	-	0,25	0,04	-	-	-	-	26,75	18,04	-	-	-	-	1	0,14	-	-
<i>Chironomus caliginosus</i> Meunier, 1904	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,04	-	-	-	-
<i>Cladotanytarsus mancus</i> Walker, 1856	5	33,33	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	15,75	10,62	-	-	-	-	10	1,44	-	-
<i>Corynoneura scutellata</i> Winnertz, 1846	4	55,56	1,5	0,53	3	0,42	-	-	7,25	1,48	-	-	-	-	1,75	0,16	1	0,14	-	-
<i>Cricotopus bicinctus</i> Meigen, 1818	7	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,75	0,6	-	-	-	-
<i>Cricotopus flavocinctus</i> Kieffer, 1924	7	11,11	-	-	-	-	-	-	1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cricotopus sylvestris</i> Fabricius, 1794	7	33,33	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	1,01	-	-	3,5	0,31	2,5	0,36	-	-
<i>Cryptochironomus defectus</i> Kieffer, 1913	8	33,33	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	1,5	1,01	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Cryptotendipes holsatus</i> Lenz, 1959	6	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dasyhelea</i> sp.	6	11,11	-	-	0,5	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dicrotendipes nervosus</i> Staeger, 1839	8	33,33	-	-	5	0,71	-	-	-	-	-	-	-	-	56,5	5,03	127,75	18,4	-	-
<i>Dicrotendipes tritonus</i> Kieffer, 1916	8	44,44	-	-	0,25	0,04	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	24	2,14	117,25	16,89	-	-
<i>Diplocladius cultriger</i> Kieffer, 1908	8	11,11	-	-	-	-	-	-	3,25	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dixa</i> sp.	1	11,11	1,75	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Endochironomus albipennis</i> Meigen, 1830	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,25	2,92	-	-
<i>Eukiefferiella clypeata</i> Kieffer, 1923	8	11,11	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eukiefferiella ilkleyensis</i> Edwards, 1929	8	11,11	0,75	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Forcipomyia</i> sp.	6	22,22	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Halocladius fucicola</i> Edwards, 1926	5	22,22	-	-	-	-	-	-	2	0,41	-	-	-	-	-	-	7,75	1,12	-	-
<i>Hemerodromia</i> sp.	6	11,11	1	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Heterotrissocladius marcidus</i> Walker, 1856	4	11,11	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hexatoma</i> sp.	2	11,11	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrobaenus pilipes</i> Malloch, 1915	8	22,22	0,75	0,26	-	-	-	-	10,25	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrophorus</i> sp.	4	22,22	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	0,75	0,07	-	-	-	-
<i>Krenopelopia binotata</i> Wiedemann, 1817	4	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	0,07	-	-	-	-

Takson	Tolerans Değerleri	F %	KD1 n(ort)	KD1 (D %)	KD2 n(ort)	KD2 (D %)	KD3 n(ort)	KD3 (D %)	YD1 n(ort)	YD1 (D %)	YD2 n(ort)	YD2 (D %)	YD3 n(ort)	YD3 (D %)	DD1 n(ort)	DD1 (D %)	DD2 n(ort)	DD2 (D %)	DD3 n(ort)	DD3 (D %)
<i>Krenopelopia</i> sp.	4	11,11	1,25	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Macropelopia nebulosa</i> Meigen, 1804	9	22,22	0,5	0,18	-	-	-	-	0,75	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microchironomus tener</i> Kieffer, 1918	8	11,11	-	-	-	-	4,75	52,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micropsectra curvicornis</i> Chernovskij, 1949	7	22,22	1	0,35	-	-	-	-	-	-	2,5	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micropsectra notescens</i> Walker, 1856	7	11,11	-	-	-	-	-	-	3,5	0,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micropsectra praecox</i> Wiedemann, 1818	7	55,56	-	-	2,5	0,35	-	-	6,75	1,38	1,5	1,01	-	-	0,75	0,07	8,5	1,22	-	-
<i>Microtendipes chloris</i> Meigen, 1818	6	66,67	0,25	0,09	2,75	0,39	-	-	0,75	0,15	0,75	0,51	-	-	0,5	0,04	44,25	6,37	-	-
<i>Monopelopia tenuicalcar</i> Kieffer, 1918	7	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,75	2,21	-	-	-	-
<i>Nanocladius dichromus</i> Kieffer, 1906	5	22,22	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-
<i>Paracladius conversus</i> Walker, 1856	5	33,33	-	-	0,25	0,04	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	-	-	0,5	0,07	-	-
<i>Paramerina cingulata</i> Walker, 1856	6	11,11	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paratanytarsus lauterborni</i> Kieffer, 1909	6	44,44	0,25	0,09	14,75	2,08	-	-	8,75	1,79	-	-	-	-	-	-	2,75	0,4	-	-
<i>Paratendipes albimanus</i> Meigen, 1919	6	22,22	-	-	2,75	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	0,36	-	-
<i>Paratrichocladius rufiventris</i> Meigen, 1830	5	66,67	0,75	0,26	290,75	41,05	-	-	91,75	18,79	4,5	3,04	-	-	73,75	6,57	17,5	2,52	-	-
<i>Paratrissocladius excerptus</i> Walker, 1856	5	33,33	1	0,35	-	-	-	-	1,75	0,36	1,5	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polypedilum convictum</i> Walker, 1856	6	55,56	-	-	0,25	0,04	-	-	0,75	0,15	0,5	0,34	-	-	1,75	0,16	0,75	0,11	-	-
<i>Polypedilum exsectum</i> Kieffer, 1916	6	11,11	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polypedilum pedestre</i> Meigen, 1830	6	33,33	29,5	10,39	-	-	-	-	0,25	0,05	0,5	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Polypedilum scalaenum</i> Schrank, 1803	6	22,22	-	-	-	-	-	-	2,5	0,51	1,75	1,18	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Potthastia gaedii</i> Meigen, 1838	2	22,22	3,5	1,23	-	-	-	-	0,75	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Probezzia</i> sp.	6	33,33	-	-	-	-	-	-	0,25	0,05	0,5	0,34	-	-	1	0,09	-	-	-	-
<i>Procladius</i> (Holotanypus) sp.	9	66,67	0,25	0,09	5,5	0,78	-	-	0,25	0,05	2,75	1,85	-	-	10,5	0,94	0,5	0,07	-	-
<i>Prodiamesa olivacea</i> Meigen, 1818	8	33,33	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	0,5	0,34	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
<i>Psectrocladius barbimanus</i> Edwards, 1929	8	22,22	-	-	0,5	0,07	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psectrocladius calcaratus</i> Edwards, 1929	8	22,22	10,75	3,79	-	-	-	-	2	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psectrocladius sordidellus</i> Zetterstedt, 1838	8	11,11	7	2,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psectrocladius ventricosus</i> Kieffer, 1925	8	11,11	-	-	109,5	15,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychoda</i> sp.	10	44,44	1	0,35	0,25	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	0,75	0,07	0,5	0,07	-	-
Psychodidae Gen. sp.	10	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,15
<i>Ptychoptera</i> sp.	9	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rheocricotopus effusus</i> Walker, 1856	6	22,22	2,25	0,79	-	-	-	-	0,25	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rheocricotopus fuscipes</i> Kieffer, 1909	6	33,33	-	-	-	-	-	-	3,25	0,67	0,25	0,17	-	-	-	-	0,25	0,04	-	-
<i>Rheotanytarsus exiquus</i> Joh.	6	11,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,09	-	-	-	-
<i>Rheotanytarsus</i> sp.	6	66,67	1,25	0,44	0,75	0,11	-	-	-	-	0,25	0,17	0,25	2,94	3	0,27	10,75	1,55	-	-
<i>Simulium</i> sp.	5	55,56	3	1,06	14,75	2,08	-	-	41,25	8,45	0,75	0,51	-	-	0,5	0,04	-	-	-	-
<i>Stictochironomus devinctus</i> Say, 1829	9	44,44	-	-	16,25	2,29	-	-	3	0,61	3,25	2,19	-	-	0,25	0,02	-	-	-	-

Takson	Tolerans Değerleri	F %	KD1 n(ort)	KD1 (D %)	KD2 n(ort)	KD2 (D %)	KD3 n(ort)	KD3 (D %)	YD1 n(ort)	YD1 (D %)	YD2 n(ort)	YD2 (D %)	YD3 n(ort)	YD3 (D %)	DD1 n(ort)	DD1 (D %)	DD2 n(ort)	DD2 (D %)	DD3 n(ort)	DD3 (D %)
<i>Glossosoma</i> sp.	0	11,11	3,25	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydropsyche</i> sp.	4	66,67	3,5	1,23	6,25	0,88	-	-	75	15,36	16,75	11,3	-	-	5	0,45	1,25	0,18	-	-
Hydropsychidae Gen. sp.	4	22,22	-	-	0,25	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	4,25	0,38	-	-	-	-
<i>Hydroptila</i> sp.	6	22,22	-	-	-	-	-	-	1,75	0,36	-	-	-	-	1	0,09	-	-	-	-
<i>Lepidostoma</i> sp.	1	11,11	27	9,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limnephilidae Gen. sp.	4	11,11	0,25	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnephilus</i> sp.	3	11,11	0,5	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oxyethira</i> sp.	3	11,11	-	-	5,75	0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoptera Gen. sp.	-	11,11	-	-	-	-	-	-	0,75	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

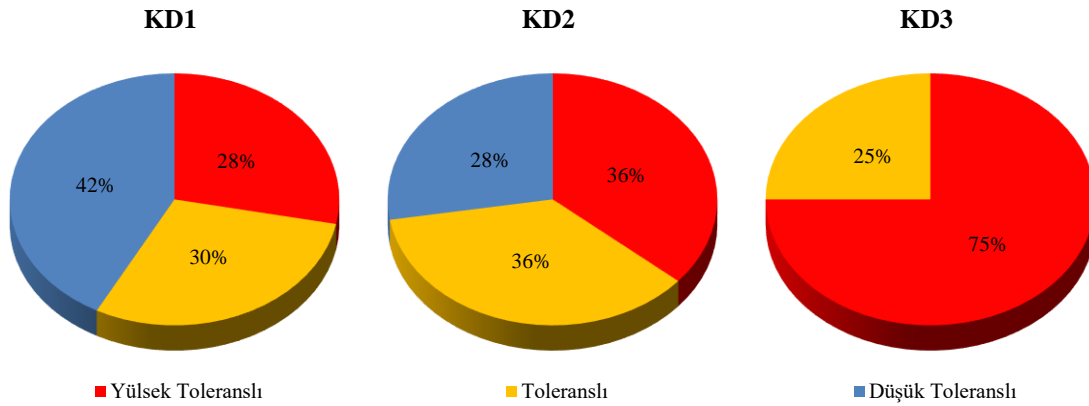
K: Kış, İ: İlkbahar, Y: Yaz, S: Sonbahar, n(ort): Ortalama birey sayısı

Her üç akarsuda da, kaynağa yakın istasyonların, taban makroomurgasız takson sayılarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma süresince, YD1 istasyonunda 25 familyadan 71 takson, KD1 istasyonunda 32 familyadan 64 takson ve DD1 istasyonunda 31 familyadan 61 takson belirlenmiştir. Tüm taksonlar bazında, en fazla birey sayısının 4508 birey ile DD1 istasyonunda, en az birey sayısının 111 birey ile YD3 istasyonunda bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 2).



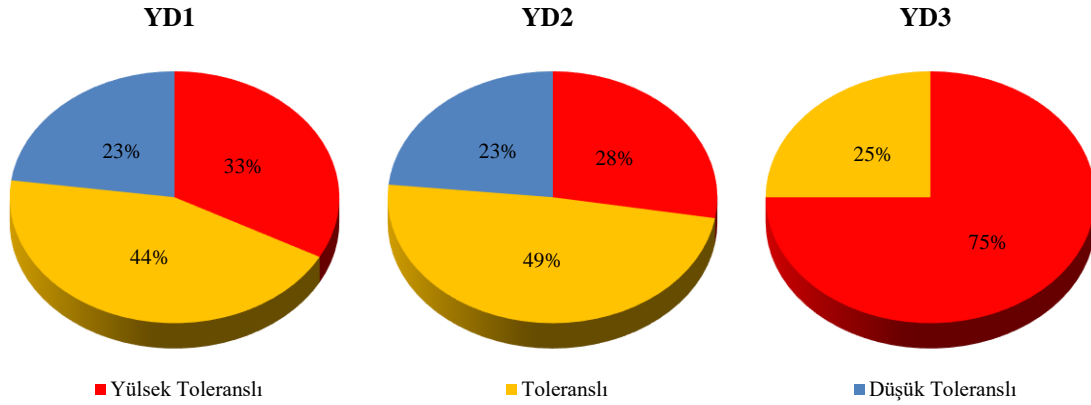
Şekil 2. İstasyonlarda Tespit Edilen Takson, Familya ve Birey Sayıları.

KD1 istasyonunda 27 düşük toleranslı, 19 toleranslı, 18 yüksek toleranslı, KD2 istasyonunda 16 düşük toleranslı, 21 toleranslı, 21 düşük toleranslı ve KD3 istasyonunda 2 toleranslı, 6 yüksek toleranslı takson tespit edilmiştir.



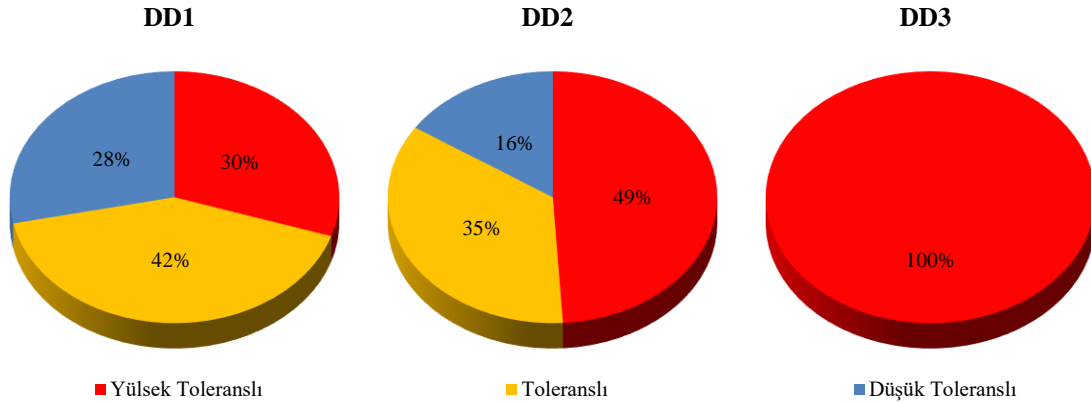
Şekil 3. Kirazdere istasyonlarında belirlenen türlerin toleranslarına göre dağılımları.

YD1 istasyonunda 16 düşük toleranslı, 31 toleranslı, 23 yüksek toleranslı, YD2 istasyonunda 11 düşük toleranslı, 23 toleranslı, 13 düşük toleranslı ve YD3 istasyonunda 3 toleranslı, 9 yüksek toleranslı takson tespit edilmiştir.



Şekil 4. Yalacdere istasyonlarında belirlenen türlerin toleranslarına göre dağılımları.

DD1 istasyonunda 17 düşük toleranslı, 25 toleranslı, 18 yüksek toleranslı, DD2 istasyonunda 8 düşük toleranslı, 18 toleranslı, 25 düşük toleranslı ve DD3 istasyonunda 9 yüksek toleranslı takson tespit edilmiştir.



Şekil 5. Dilderesi istasyonlarında belirlenen türlerin toleranslarına göre dağılımları.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kocaeli ili sınırları içerisinde yer alan, Dilderesi'nde tespit edilen 89 adet ve Kirazdere'de tespit edilen 114 taksonun tamamı bu akarsular için yeni kayıttır. Yalacdere'de tespit edilen 98 taksondan, *Asellus aquaticus*, *Atherix* sp., *Caenis* sp., *Ephemera* sp., Lumbricidae, *Physella acuta*, Planorbidae ve *Tipula* sp. (Akay ve Dalkıran, 2019) dışında kalan 90 takson bu akarsu için yeni kayıttır. Bu çalışmayla Kocaeli ili için 171 takson literatüre yeni kayıt olarak eklenmiştir (Tablo 2).

Çalışma kapsamında tespit edilen toplam 179 taksondan 29 tanesinin her üç akarsuda da bulunduğu belirlenmiştir. Bütün istasyonlarda, kozmopolit dağılıma sahip Oligochaeta, Diptera ve Gastropoda gruplarına ait taksonlar tespit edilmiştir.

Her üç akarsuda da, kaynaktan, mansaba doğru takson, familya ve düşük toleranslı taksonların sayısının azaldığı görülmüştür (Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5). Taban makroomurgasız biyolojik çeşitliliğinin kaynaktan mansaba doğru azalmasında, mansaba yaklaştıkça kentleşmenin, sanayi alanlarının yoğunlaşması ve bunlarla birlikte artan nüfusa bağlı olarak insan kaynaklı faaliyetlerin yoğunlaşmasının neden olduğu düşünülmektedir (Tablo 1). Smith ve Lamp (2008), Cao vd. (2016), Hepp ve Santos (2008) yaptıkları çalışmalarda insan kaynaklı faaliyetlerin taban makroomurgasız çeşitliliğine olumsuz etki ettiğini belirtmişlerdir. Habitat çeşitliliğinin ve istasyonlara göre farklılık gösteren örnekleme metodunun belirlenen takson sayısını etkileyebileceği bilinmektedir (Nedeau vd.,

2003). Mevcut çalışmada özellikle mansap istasyonlarında Van Veen tip kepçe kullanımı ve tek çeşit habitat (çamur) bulunması diğer istasyonlarda kullanılan surber nete göre farklılık oluşturabilir. Ancak grab kullanılan istasyonlarda örnekleme sayısı artırıldığı için bu farklılığın en aza indirildiği ve istasyonlardaki gerçek tür çeşitliliğinin belirlendiği düşünülmektedir.

İstasyonlarda tespit edilen birey sayılarının da, Kirazdere dışında, DD1'den DD3'e ve YD1'den YD3'e gidildikçe azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Kirazdere'de KD2 istasyonunda birey sayısının kaynağa yakın KD1 istasyonuna göre fazla olmasında KD2 istasyonu öncesinde Yuvacık Barajı'nın bulunuyor olmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Bredenhand ve Samways (2009), baraj varlığının, su akış hızını azalttığını, suyu durağan hale getirdiğini, bunun da sucul yüzey bitkilerinin artmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada da KD2 istasyonundaki suyun durağanlaştığı ve sucul bitkilerin arttığı belirlenmiştir. Bunun paralelinde, kaba partiküller, odunsu döküntüler ve çevredeki ağaçlardan dökülen yaprakların istasyonda biriktiği ve bunlarla beslenen ögütücü bir tür olan *Paratrichocladius rufiventris* (Mandaville, 2002) birey sayısının artmasına neden olduğu düşünülmektedir (Tablo 2).

Örnekleme yapılan her üç akarsuda da Diptera takımına ait taksonların yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Kazancı vd. (2014) Yeşilirmak'ta, Kumari ve Maiti (2020) Hindistan'da, Gonzalo ve Camargo (2013) İspanya'da, Azrina vd. (2006) Malezya'da, Chertoprud ve Palatov (2017) Bulgaristan'da, Çamur-Elipek vd. (2010) Gala Gölü'nde, Akbulut vd. (2009) Menderes Çayı'nda yaptıkları çalışmalarda, başta Chironomidae familyası olmak üzere Diptera takımına ait taksonların birey sayısının yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Kazancı vd. (2010) Yeşilirmak'ta yaptıkları çalışmada organik kirliliğin artmasının Diptera takımı birey sayısının artmasına neden olacağını belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen veriler, yukarıdaki belirtilen çalışmaların verileriyle benzerlik göstermektedir. Çalışmamız kapsamındaki akarsularda Diptera taksonlarının ortalama baskınlığı % 37,44 oranındadır. Bu taksonların tolerans değerleri dikkate alındığında 80 taksondan 20 tanesi düşük toleranslı, diğerleri toleranslı ve yüksek toleranslı olarak değerlendirilmektedir. Bu 20 taksonun % F değerleri dikkate alındığında istasyonlarda ortalama % 25,55 oranında tespit edilmişlerdir. Ayrıca % D değerleri dikkate alındığında 9 istasyondaki ortalama baskınlıkları %12,10 oranında iken toleranslı ve yüksek toleranslı taksonların ortalama baskınlıkları %25,34 oranındadır. Tespit edilen Diptera takımını üyelerinden toleranslı ve yüksek toleranslı bireylerin baskınlığının fazla olmasının, yoğun arazi kullanımından (Tablo 1) kaynaklanan organik kirlilik ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

En fazla taban makroomurgasız familyası, Ephemeroptera takımının, Mandaville (2002)'e göre toleranslı (*Baetis* sp. ve *Caenis* sp.) ve düşük toleranslı (*Heptagenia* sp., *Rhithrogena* sp., *Ephemera* sp. ve *Ecdyonurus* sp.) taksonlarının birey sayısının fazla olduğu KD1 istasyonunda tespit edilmiştir. Benzer olarak, Zeybek vd. (2012) Köprüçay Irmağı'nda yaptıkları çalışmada Ephemeroptera takımı taksonlarının birey sayılarının diğer taksonlara göre fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Azrina vd. (2006) Malezya'da yaptıkları çalışmada Ephemeroptera takımı üyelerinin birey sayılarının diğer gruplara göre fazla olmasının temiz bir ekosistemi işaret ettiğini bildirmişlerdir. Nitekim KD1 istasyonunun Kirazdere kaynağına yakın konumda yer alması multihabitat yöntemi gözlemlerine göre su içi habitat çeşitliliğinin fazla olması ve herhangi bir arazi kullanım faaliyetinin bulunmaması Ephemeroptera taksonlarının sayısının artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte organik kirliliğe toleransı düşük olan Plecoptera takımı üyelerinin ve organik kirliliğe toleransları Mandaville (2002)'e göre çok düşük olan *Rhithrogena* sp., *Glossosoma* sp., *Blepharicera* sp., ve *Acroneuria* sp. taksonlarının KD1 istasyonunda bulunduğu, ayrıca en fazla sayıda düşük toleranslı taksonun bu istasyonda bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 2, Şekil 3). Kazancı vd. (2010)'e göre Ephemeroptera, Plecoptera ve Trichoptera taksonlarının diğer gruplara göre birey sayılarının fazla olması, bozulmamış habitat yapısına ve yüksek su kalitesine işaret etmektedir. Bu taksonların toplam baskınlığı KD1 istasyonunda % 51,94 oranındadır. Bu bilgiler ışığında bu istasyonun, diğer tüm istasyonlardan daha temiz bir ekosisteme sahip olduğu düşünülmektedir.

DD1 istasyonunda Gastropoda sınıfı üyelerinin birey sayısı fazladır. Bu istasyonda Gastropoda birey sayısının artmasında istilacı bir tür olan *Potamopyrgus antipodarum* popülasyonu etkili olmuştur. Goldberg vd. (2013) bu türün son derece doğurgan ve istilacı olduğunu belirtmiştir.

Mevcut çalışmada mansap istasyonlarında en çok tespit edilen Oligochaeta taksonları *Limnodrilus* cinsi üyeleridir. Azrina vd. (2006) yaptıkları çalışmada Oligochaeta taksonlarının kirlilik indikatörü olduğunu ve yoğunluklarının artmasının, kirliliğin arttığına işaret ettiğini, özellikle *Limnodrilus* sp. bireylerinin akarsuların mansabına yakın bölgelerde bol bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Mansaba yakın istasyonlarda Oligochaeta taksonlarının baskınlıkları akarsuların diğer istasyonlarına göre daha fazladır (Tablo 2). Baskınlıktaki bu artışın, bu bölgelerde, sanayileşmenin ve kentleşmenin artmasıyla birlikte artan kirlilikle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca çalışma yaptığımız Dilderesinde, Pekey vd. (2004) yaptıkları çalışmada iz metallerin konsantrasyonlarını tespit etmiş ve Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliğine göre bu konsantrasyonların yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bölgede yer alan boya endüstrisi ve evsel kaynaklı deşarjların en baskın kirlenici unsurlar olduğundan bahsetmişlerdir. Ayrıca Pekey vd. (2005) ve Pekey (2006) İzmit Körfezi'nde Dilderesi'nin ağız bölgesinde yaptıkları çalışmada demir, çelik, boya sanayi ve evsel atıkların ağır metal kirliliğine sebebiyet verdiğini bildirmişlerdir. Morkoç vd. (2008) İzmit Körfezi için en önemli kirlilik girdisi kaynağının Dilderesi'ne yapılan deşarjlardan kaynaklandığını belirtmiştir. Yalakdere'de ise Akay ve Dalkıran (2019) yaptıkları çalışmada, fizikokimyasal veriler tespit etmişlerdir. Ancak Yalakdere'de tespit ettikleri taban makroomurgasızlarının fizikokimyasal parametrelerden ziyade, iklimsel kaynaklı sıcaklık değişikliklerinden ve kuraklıktan daha fazla etkilendiğinden bahsetmişlerdir. Mevcut çalışmamızda Yalakdere akarsuyu istasyonlarında kuraklıkla ilgili bir bulguya rastlanmamıştır. Örnekleme gerçekleştirilen bir diğer akarsu olan Kirazdere'de kirlenici üzerine bir çalışma açık literatürde bulunmamıştır. Kirazdere istasyonları ile ilgili, tartışma ve sonuç başlığı altında bazı baskı unsurlarından bahsedilmiştir.

İnsan kaynaklı faaliyetlerin neler olduğu ve etkilerinin net olarak belirlenebilmesi için fauna tespiti çalışmaları önemlidir. İleride yapılacak çalışmalarda biyotik indeksler kullanılarak literatüre kazandırılan yeni taban makroomurgasız kayıtları ile birlikte bu çalışmanın ve benzer çalışmaların kaynak olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Örnekleme ve laboratuvar çalışmalarında imkânlarından faydalandığımız, Kocaeli Üniversitesi Hidrobiyoloji Ar-Ge Laboratuvarına, ÇevSis Ar-Ge Danışmanlık'a, ayrıca, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Hanife Aldemir'e ve Deren Ülgen'e teşekkürü bir borç biliriz.

FİNANS

Bu çalışmanın yürütülmesinde Kocaeli Üniversitesi Hidrobiyoloji Arge Laboratuvarı imkanlarından yararlanılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

YAZAR KATKILARI

AB: Saha çalışmaları, makale yazımı, Amphipoda, Ephemeroptera, Decapoda, Isopoda, Diptera ve Trichoptera sistematığı ve sonuçların yorumlanması, HAE: Çalışmanın dizaynı, Analizler ve sonuçların yorumlanması, DAO: Gastropoda, Bivalvia, Turbellaria ve Hirudinea sistematığı ve sonuçların yorumlanması, NÖ: Chironomidae sistematığı ve sonuçların yorumlanması, SSO: Oligochaeta sistematığı ve sonuçların yorumlanması, YÖB: Odonata, Plecoptera, Hydracarina, Diptera

ve Coleoptera sistematığı ve sonuçların yorumlanması. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

ETİK ONAY BEYANI

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

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan veriler DergiPark platformunda <https://doi.org/10.22392/actaquat.1002739> DOI adresi ile erişime açıktır.

KAYNAKLAR

- Akay, E., & Dalkiran, N. (2020). Assessing biological water quality of Yalakdere stream (Yalova, Turkey) with benthic macroinvertebrate-based metrics. *Biologia*, 75(9), 1347-1363. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00387-9>
- Akbulut, M., Celik, E. S., Odabasi, D. A., Kaya, H., Selvi, K., Arslan, N., & Odabasi, S. S. (2009). Seasonal Distribution and Composition of Benthic Macroinvertebrate Communities in Menderes Creek, Canakkale, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(11a), 2136-2145.
- Alba-Tercedor, J. (1990). Life cycle and ecology of Mayflies from Sierra Nevada (Spain), IV. *Limnetica*, 6, 23-24. <https://doi.org/10.23818/limn.06.03>
- Angus, R. B. (1988). A New Sibling Species of Helophorus F (Coleoptera, Hydrophilidae), Revealed by Chromosome Analysis and Hybridization Experiments. *Aquatic Insects*, 10(3), 171-183. <https://doi.org/10.1080/01650428809361325>
- Arslan, N., Salur, A., Kalyoncu, H., Barışık, B., Odabaşı, D., & Kara, D. (2016). The use of BMWP and ASPT indices for evaluation of water quality according to macroinvertebrates in Küçük Menderes River (Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 38, 603-613.
- Askew, R. (2021). *The dragonflies of Europe*. Brill.
- Aukema, B., Rieger, C., & Nederlandse Entomologische, V. (1995). *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region*. Netherlands Entomological Society.
- Azrina, M. Z., Yap, C. K., Ismail, A. R., Ismail, A., & Tan, S. G. (2006). Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.003>
- Bal, D., Odabaşı, D. A., & Zilifli, A. (2021). Kavak Çayı (Gelibolu, Çanakkale) Mollusca Faunası ve Bazı Su Kalitesi Özelliklerinin Belirlenmesi. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(3), 393-407.
- Bauernfeind, E., & Lechthaler, W. (2014). *Ephemeroptera—Key to Larvae from Central Europe*. EUTAXA, CD-Edition, Vienna, Austria, 1.
- Belfiore, C. (1983). Notes on Italian Heptageniidae (Ephemeroptera) - Rhithrogena-Fiorii Grandi, 1953 and R-Adrianae Sp-N. *Aquatic Insects*, 5(2), 69-76. <https://doi.org/10.1080/01650428309361129>
- Berner, L., & Pescador, M. L. (1988). *The mayflies of Florida*. Florida A and M University Press.
- Bredenhand, E., & Samways, M. J. (2009). Impact of a dam on benthic macroinvertebrates in a small river in a biodiversity hotspot: Cape Floristic Region, South Africa. *Journal of Insect Conservation*, 13(3), 297-307. <https://doi.org/10.1007/s10841-008-9173-2>
- Brinkhurst, R. O., & Jamieson, B. G. M. (1971). *Aquatic oligochaeta of the world*. University of Toronto Press.
- Brohmer, P. (1979). *Fauna von Deutschland*, 581 p. In: Heidelberg.

- Cao, Y., Wang, B. X., Zhang, J., Wang, L. Z., Pan, Y. D., Wang, Q. X., Jian, D. J., & Deng, G. P. (2016). Lake macroinvertebrate assemblages and relationship with natural environment and tourism stress in Jiuzhaigou Natural Reserve, China. *Ecological Indicators*, 62, 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.023>
- Chertoprud, M. V., & Palatov, D. M. (2017). Stream macrozoobenthic communities of the Eastern Balkans. *Inland Water Biology*, 10(3), 286-295. <https://doi.org/10.1134/S1995082917030051>
- Commission of the European, C. (2000). *Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy*. Office for Official Publications of the European Communities.
- Cornejo, A., Tonin, A. M., Checa, B., Tunon, A. R., Perez, D., Coronado, E., Gonzalez, S., Rios, T., Macchi, P., Correa-Araneda, F., & Boyero, L. (2019). Effects of multiple stressors associated with agriculture on stream macroinvertebrate communities in a tropical catchment. *Plos One*, 14(8), e0220528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220528>
- Cranston, P. S. (1982). *A key to the larvae of the British Orthocladinae (Chironomidae)*. Freshwater Biological Association.
- Çabuk, Y., Arslan, N., & Yılmaz, V. (2005). Species composition and seasonal variations, of the Gastropoda in Upper Sakarya River System (Turkey) in relation to water quality. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 32(6), 393-400. <https://doi.org/10.1002/ahch.200300544>
- Çamur-Elipek, B., Arslan, N., Kırgız, T., Öterler, B., Güher, H., & Özkan, N. (2010). Analysis of Benthic Macroinvertebrates in Relation to Environmental Variables of Lake Gala, a National Park of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(2), 235-243. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2010.0212>
- Çamur, B., & Kırgız, T. (2000). Freshwater Isopod Species (Crustacea) of Turkish Thrace and Their Distribution. *Turkish Journal of Zoology*, 24(1), 17-22.
- Demirsoy, A. (1982). *Odonata*. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu.
- Duran, M. (2006). Monitoring water quality using benthic macroinvertebrates and physicochemical parameters of Behzat Stream in Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 709-717.
- Edington, J. M., Hildrew, A. G., & Freshwater Biological, A. (1981). *A key to the caseless caddis larvae of the British Isles: with notes on their ecology*. Freshwater Biological Association.
- Eggers, T. O., & Martens, A. (2001). Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschlands / A key to the freshwater Amphipoda (Crustacea) of Germany. *Lauterbornia*, 42, 1-68.
- Elliott, J. M., Humpesch, U. H., Macan, T. T., & Freshwater Biological, A. (1988). *Larvae of the British Ephemeroptera: a key with ecological notes*. Freshwater Biological Association.
- Elliott, J. M., & Mann, K. H. (1979). *A key to the British freshwater leeches: with notes on their life cycles and ecology (3rd, revised and enlarged ed.)*. Freshwater Biological Association.
- Epler, J. H. (2001). *Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina: a guide to the taxonomy of the midges of the southeastern United States, including Florida*. St. Johns River Water Management District.
- Ersan, E., Altındag, A., Ahiska, S., & Alas, A. (2009). Zoobenthic fauna and seasonal changes of mamasin dam lake (Central part of Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4702-4707.
- Fittkau, E. J., & Roback, S. S. (1983). The Larvae of Tanypodinae (Diptera, Chironomidae) of the Holarctic Region - *Keys and Diagnoses*. *Entomologica Scandinavica*, 33-110.
- Fitzpatrick, J. F. (1983). *How to know the freshwater crustacea*. Wm. C. Brown.
-

- Girgin, S. (2010). Evaluation of the benthic macroinvertebrate distribution in a stream environment during summer using biotic index. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1), 11-16. <https://doi.org/10.1007/Bf03326112>
- Girgin, S., & Kazancı, N. (2010). Biomonitoring of an urban stream (Ova Stream, Ankara, Turkey) using the Belgian Biotic Index. *Review of Hydrobiology*, 3(1).
- Glöer, P. (2019). *The freshwater gastropods of the West-Palaearctis: Volume I. Fresh-and brackish waters except spring and subterranean snails. Identification key, anatomy, ecology, distribution.* Biodiversity Research Lab, Hetlingen.
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800. <https://doi.org/10.1899/13-046.1>
- Gonzalo, C., & Camargo, J. A. (2013). The impact of an industrial effluent on the water quality, submersed macrophytes and benthic macroinvertebrates in a dammed river of Central Spain. *Chemosphere*, 93(6), 1117-1124. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.032>
- Gültekin, Z., Hellmann, C., Aydin, R., & Winkelmann, C. (2019). Possible indices for the assessment of ecological stream quality based on macroinvertebrates in Euphrates tributaries (Turkey). *Journal of Freshwater Ecology*, 34(1), 783-806.
- Haybach, A. (1999). Beitrag zur Larvaltaxonomie der Ecdyonurus-venosus-Gruppe in Deutschland. *Lauterbornia*, 37, 113-150.
- Henry, J.-P., Magniez, G., & Notenboom, J. (1996). Isopoda Asellota de Turquie récoltés en 1987: Netherlands biospeleological explorations in Turkey, 5. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 66(1), 55-62.
- Hepp, L. U., & Santos, S. (2009). Benthic communities of streams related to different land uses in a hydrographic basin in southern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 157(1-4), 305-318. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0536-7>
- Hickin, N. E. (1968). *Caddis larvae : larvae of the British Trichoptera ((1st American). ed.)*. Fairleigh Dickinson University Press.
- Illies, J. (1955). *Steinfliegen oder Plecoptera*. Fischer.
- Kalyoncu, H., & Gülboy, H. (2009). Benthic macroinvertebrates from Dariören and Isparta streams (Isparta/Turkey)–Biotic indices and multivariate analysis. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(1), 85-92.
- Karaman, G. S., & Pinkster, S. (1977). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and Adjacent Regions of Asia (Crustacea-Amphipoda): Part I. Gammarus pulex-Group and Related Species. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 47(1), 1-97.
- Karaman, G. S., & Pinkster, S. (1977). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda): Part II. Gammarus roeseli-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 47(2), 165-196.
- Kathman, R. D., & Brinkhurst, R. O. (1998). *Guide to the freshwater oligochaetes of North America.* Aquatic Resources Center.
- Kazancı, N. (2001). Türkiye Ephemeroptera (Insecta) Faunası-Ephemeroptera (Insecta) Fauna of Turkey. Ankara, Turkey: İmaj Printing.
- Kazancı, N., Ekingen, P., Dugel, M., & Turkmen, G. (2015). Hirudinea (Annelida) species and their ecological preferences in some running waters and lakes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(3), 1087-1096. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0574-3>
- Kazancı, N., Girgin, S., Dugel, M., & Oğuzkurt, D. (1997). Türkiye İç Suları Araştırmaları Dizisi II (Ed. N. Kazancı): Akarsuların çevre kalitesi yönünden değerlendirilmesinde ve izlenmesinde biyotik indeks yöntemi. İmaj Yayınevi, Ankara. 100s.

- Kazancı, N., & Türkmen, G. (2010). *Assessment of water quality of Kelkit Stream (Turkey) with application of various macro invertebrate-based metrics*. Proceeding of Balwois.
- Kazancı, N., Türkmen, G., Başören, Ö., Ekingen, P., & Bolat, H. (2014). Assessment of the land use effects in Yeşilirmak River Basin by determining water quality and Yeşilirmak river-specific biotic index (Y-BMWP): I. Evaluation with physico-chemical methods. Evaluation with biological methods by using benthic macroinvertebrates and updated Y-BMWP. *Review of Hydrobiology*, 7(2), 75-155.
- Kazancı, N., Türkmen, G., Ekingen, P., & Başören, Ö. (2013). Preparation of a biotic index (Yeşilirmak-BMWP) for water quality monitoring of Yeşilirmak River (Turkey) by using benthic macroinvertebrates. *Review of Hydrobiology*, 6(1), 1-29.
- Kazancı, N., Türkmen, G., Ertunç, Ö., Ekingen, P., Öz, B., & Gültutan, Y. (2010). Assessment of ecological quality of Yeşilirmak River (Turkey) by using macroinvertebrate-based methods in the content of Water Framework Directive. *Review of Hydrobiology*, 3(2).
- Kimmins, D. E., & Freshwater Biological, A. (1972). A revised key to the adults of the British species of Ephemeroptera : with notes on their ecology (2d rev. ed.). Freshwater Biological Association.
- Kumari, P., & Maiti, S. K. (2020). Bioassessment in the aquatic ecosystems of highly urbanized agglomeration in India: An application of physicochemical and macroinvertebrate-based indices. *Ecological Indicators*, 111, 106053. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.106053>
- Küçük, S., & Alpbaz, A. (2008). The impact of organic pollution on the Kirmir Creek and Sakarya River in Turkey. *Water Resources*, 35(5), 591-597. <https://doi.org/10.1134/S0097807808050102>
- Lechthaler, W., & Stockinger, W. (2005). *Trichoptera: key to larvae from central Europe*. Eutaxa.
- Macan, T. T. (1959). A guide to freshwater invertebrate animals. Longmans.
- Mandaville, S. (2002). *Benthic macroinvertebrates in freshwaters: Taxa tolerance values, metrics, and protocols (Vol. 128)*. Citeseer.
- Mason, C. F. (2002). *Biology of freshwater pollution (4th ed.)*. Prentice Hall.
- Morkoç, E., Okay, O. S., & Edinçliler, A. (2008). Land-based sources of pollution along the Izmit Bay and their effect on the coastal waters. *Environmental Geology*, 56(1), 131-138. <https://doi.org/10.1007/s00254-007-1146-3>
- Narin, N. Ö., & Tanatmış, M. (2004). Gönen (Balıkesir) ve Biga (Çanakkale) Çayları'nın Ephemeroptera (Insecta) limnofaunası. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(1), 16-25.
- Nedeau, E. J., Merritt, R. W., & Kaufman, M. G. (2003). The effect of an industrial effluent on an urban stream benthic community: water quality vs. habitat quality. *Environmental Pollution*, 123(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00363-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00363-9)
- Nilsson, A. N., & Angus, R. B. (1992). A reclassification of the Deronectes-group of genera (Coleoptera: Dytiscidae) based on a phylogenetic study. *Insect Systematics & Evolution*, 23(3), 275-288.
- Odabasi, D. A., Akay, E., & Koyuncuoglu, S. (2020). Pseudamnicola thalesi sp. n. (Gastropoda: Truncatelloidea: Hydrobiidae), a new freshwater gastropod species from Western Turkey. *Zoology in the Middle East*, 66(2), 140-144. <https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1739370>
- Odabasi, S., Odabasi, D. A., & Acar, S. (2019). New species of freshwater molluscs from Gokceada (northeastern Aegean Sea), Turkey (Gastropoda: Hydrobiidae, Bythinellidae). *Archiv Fur Molluskenkunde*, 148(2), 185-195. <https://doi.org/10.1127/arch.moll/148/185-195>
- Odabasi, S., Odabasi, D. A., & Arslan, N. (2015). The First Record of Chaetogaster limnaei limnaei Baer 1827 (Annelida: Clitellata) on Pseudobithynia yildirimi (Gastropoda: Prosobranchia) from Northwest of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(2), 367-369. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_2_19

- Özbek, M., & Özkan, N. (2011). *Dikerogammarus istanbulensis* sp. n., a new amphipod species (Amphipoda: Gammaridae) from Turkey with a key for the genus. *Zootaxa*, 2813(1), 55-64.
- Özbek, M., & Ustaoglu, M. R. (2005). Taxonomical investigation of Lake District Inland Waters Malacostraca (Crustacea-Arthropoda) fauna. *Su Urunleri Dergisi*, 22(3), 357-362.
- Özbek, M., Ustaoglu, M. R., & Balık, S. (2003). Contribution to knowledge of the variation and ecology of *Echinogammarus antalyae* Karaman, 1971 (Crustacea: Amphipoda). *Zoology in the Middle East*, 29(1), 113-115.
- Özkan, N. (2018). Colonization of Fresh Water Leech *Erpobdella Octoculata* Linnaeus, 1758 (Annelida: Hirudinida) in Different Habitats in Tunca River, Edirne. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(7), 4743-4750.
- Pekey, H. (2006). The distribution and sources of heavy metals in Izmit Bay surface sediments affected by a polluted stream. *Marine Pollution Bulletin*, 52(10), 1197-1208. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.012>
- Pekey, H., Bakoglu, M., & Pekey, B. (2005). Sources of heavy metals in the Western Bay of Izmit surface sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(14), 1025-1036. <https://doi.org/10.1080/03067310500194953>
- Pekey, H., Karakas, D., & Bakoglu, M. (2004). Source apportionment of trace metals in surface waters of a polluted stream using multivariate statistical analyses. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), 809-818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.06.029>
- Pinder, L. (1983). The larvae of Chironominae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region-Keys and diagnoses. Chironomidae of the Holarctic Region. Keys and Diagnoses, 1. Larvae, *Entomologica Scandinavica Supplement*, 19, 149-294.
- Radoman, P., (1983). *Hydrobioidea a superfamily of Prosobranchia (Gastropoda)*. Serbian Academy of Sciences and Arts.
- Ruffo, S. (1982). Une nouvelle espèce de *Metacrangonyx* Chevreux (Amphipoda: Gammaridae) du désert du Sinaï. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 31(3-4), 151-156.
- Sæther, O. A. (1980). The females and immatures of *Paracricotopus* Thienemann and Harnisch, 1932, with the description of a new species (Diptera: Chironomidae). *Aquatic Insects*, 2(3), 129-145.
- Smith, R. F., & Lamp, W. O. (2008). Comparison of insect communities between adjacent headwater and main-stem streams in urban and rural watersheds. *Journal of the North American Benthological Society*, 27(1), 161-175. <https://doi.org/10.1899/07-071.1>
- Stobbe, H. (1995). Libellenbeobachtungen in Griechenland im Sommer 1985. *Naturkundliche Reiseberichte*, 2, 1-56.
- Stresemann, E., Senglaub, K., Hannemann, H.-J., & Klausnitzer, B. (1986). *Exkursionsfauna für die Gebiete der DDR und der BRD.: Wirbellose. Insekten*. Volk und Wissen Volkseigener Verlag.
- Şahin, Y. (1984). *Identification and distributions of Chironomidae (Diptera) larvae in East and Southeast Anatolia rivers and lakes*. Anadolu Üniversitesi Yayınları.
- Şahin, Y. (1986). *Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri Akarsuları Chironomidae Larvaları ve Yayılışları*. Tübitak TBAG Proje (792).
- Şahin, Y. (1991). *Chironomidae potamofauna of Turkey*. TÜBİTAK, TBAG-869 nolu proje, 88s.
- Şahin, Y., & Baysal, A. (1972). Hazar Gölü Dip Faunası ve Yayılışları. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü İçsular Araştırma Kısım, *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi*, 9, 1-33.
- Tanatmış, M. (1993). *Sakarya nehir sistemi Ephemeroptera limnofaunasının tespiti ve yayılışları* [Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi].
- Tanatmış, M. (1995). Sakarya nehir sistemi Ephemeroptera limnofaunasının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 19(4), 287-298.

- Tanatmış, M. (2001). The ephemeroptera (insecta) fauna of Lake Ulubat Basin. *Turkish Journal of Zoology*, 26(1), 53-61.
- Timm, T. (2009). *A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe*. Mauch.
- TÜİK. (2021). *TÜİK Kurumsal*. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Adrese-Dayali-Nufus-Kayit-Sistemi-Sonuclari-2021-45500>
- Ulmer, G. (1961). *Die Süßwasserfauna Deutschlands, Trichoptera*. In: Berlin.
- Vuoristo, T., & Jansson, A. (1979). Significance of stridulation in larval Hydropsychidae (Trichoptera). *Behaviour*, 71(1-2), 167-185.
- Wallace, I. D., Freshwater Biological, A., Wallace, B., Philipson, G. N., & Freshwater Biological, A. (1990). *A key to the case-bearing caddis larvae of Britain and Ireland*. Freshwater Biological Association.
- Weber, G., Christmann, N., Thiery, A. C., Martens, D., & Kubiniok, J. (2018). Pesticides in agricultural headwater streams in southwestern Germany and effects on macroinvertebrate populations. *Science of The Total Environment*, 638-648. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.155>
- Zamora-Muñoz, C., Sáinz-Cantero, C. E., Sánchez-Ortega, A., & Alba-Tercedor, J. (1995). Are biological indices BMPW and ASPT and their significance regarding water quality seasonally dependent? Factors explaining their variations. *Water Research*, 29(1), 285-290.
- Zettler, M. L., & Glöer, P. (2006). Zur Ökologie und Morphologie der Sphaeriidae der Norddeutschen Tiefebene. *Heldia*, 6(8), 1-61.
- Zeybek, M. (2017). Macroinvertebrate-based biotic indices for evaluating the water quality of Kargi Stream (Antalya, Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 41(3), 476-486. <https://doi.org/10.3906/zoo-1602-10>
- Zeybek, M., Kalyoncu, H., Ertan, Ö., & Çiçek, N. (2012). Köprüçay Irmağı (Antalya) bentik omurgasız faunası. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(2), 146-153.
- Zeybek, M., Kalyoncu, H., Karakas, B., & Ozgul, S. (2014). The use of BMWP and ASPT indices for evaluation of water quality according to macroinvertebrates in Degirmendere Stream (Isparta, Turkey). *Turkish Journal of Zoology*, 38(5), 603-613. <https://doi.org/10.3906/zoo-1310-9>
- Zou, W., Tolonen, K. T., Zhu, G. W., Qin, B. Q., Zhang, Y. L., Cao, Z. G., Peng, K., Cai, Y. J., & Gong, Z. J. (2019). Catastrophic effects of sand mining on macroinvertebrates in a large shallow lake with implications for management. *Science of the Total Environment*, 695, 133706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133706>
- Zwick, P. (2004). Key to the West Palaearctic genera of stoneflies (Plecoptera) in the larval stage. *Limnologica*, 34(4), 315-348. [https://doi.org/10.1016/S0075-9511\(04\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0075-9511(04)80004-5)
-

Heavy Metal Concentrations and Health Risk Assessment in *Sarda sarda* (Bloch, 1793) Caught in the Turkish Black Sea Coasts

Türkiye'nin Karadeniz Kıyılarında Yakalanan *Sarda sarda*'da (Bloch, 1793) Ağır Metal Konsantrasyonları ve Sağlık Riski Değerlendirmesi

Bülent Verep¹, Tanju Mutlu^{2,*}

¹University of Recep Tayyip Erdogan, Faculty of Fisheries and Aquatic Sciences, Dep. of Basic Sciences of Aquatic Sciences-Marine Biology, 53100, Rize-Türkiye

²University of Recep Tayyip Erdogan, Vocational School, Dep. of Environmental Protection and Control, 53100, Rize-Türkiye

* Corresponding author: tanju.mutlu@erdogan.edu.tr

Received: 21.10.2021

Accepted: 22.11.2021

Published: 01.06.2022

How to Cite: Verep, B. & Mutlu, T. (2022). Heavy metal concentrations and health risk assessment in *Sarda sarda* (Bloch, 1793) caught in the Turkish Black Sea coasts. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 208-216. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1012944>

Abstract: In this study, it was aimed to determine heavy metal levels in muscle tissues of Atlantic bonito samples caught in the Eastern Black Sea Region and to determine their potential to pose a risk to human health. The concentrations of Fe, Zn, Cu, Pb, Mn, and Al have been measured in the edible muscle of Atlantic bonito (*Sarda sarda* Bloch, 1793) from the Trabzon and Rize coasts of the southern Black Sea from September 2020 to December 2020. Cd, Cr, Co, and Ni were not detected in the edible part of *S. sarda* in both coastal areas. These concentrations are lower than the maximum permissible values in European and Turkish regulations. The average weekly intake of heavy metals per body weight value not exceeded the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) established. Therefore, it may be concluded that these ten metals should not pose any health threat to the consumers resulting from the consumption of *S. sarda*.

Keywords

- Heavy metals
- Rize ve Trabzon
- Black Sea
- Atlantic Bonito

Özet: Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesinde yakalanan palamut örneklerinin kas dokularındaki ağır metal seviyelerinin belirlenmesi ve insan sağlığı açısından risk oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Karadeniz'in Trabzon ve Rize kıyılarında avlanan palamutun (*Sarda sarda* Bloch, 1793) yenilebilir kaslarında Fe, Zn, Cu, Pb, Mn ve Al konsantrasyonları ölçülmüştür. Eylül 2020'den Aralık 2020'ye kadar deniz. Her iki kıyı bölgesinde de *S. sarda*'nın yenilebilir kısmında Cd, Cr, Co ve Ni tespit edilmedi. Bu konsantrasyonlar, Avrupa ve Türkiye yönetmeliklerinde izin verilen maksimum değerlerden daha düşüktür. Vücut ağırlığı değerleri başına haftalık ortalama ağır metal alımı, belirlenen Geçici Tolere Edilebilir Haftalık Alım (PTWI) değerini aşmadı. Bu nedenle, *S. sarda* tüketiminden kaynaklanan bu 6 metalin tüketiciler için herhangi bir sağlık tehdidi oluşturmaması gerektiği sonucuna varılabilir.

Anahtar kelimeler

- Ağır metaller
- Rize ve Trabzon
- Karadeniz
- Palamut

1. INTRODUCTION

Heavy metals increase in aquatic environments due to industrial, domestic, and agricultural activities, and they have significant effects on living things due to their toxicity and accumulation feature (Dobaradaran et al., 2010; Akkan et al., 2018; Aktop and Çağatay, 2020; Mutlu, 2021a). Heavy metals mixed into the aquatic environment can not only affect aquatic organisms, but also human

health by accumulating heavy metals in their bodies and reaching people through the food chain (Akgün et al., 2007; Yılmaz et al., 2016).

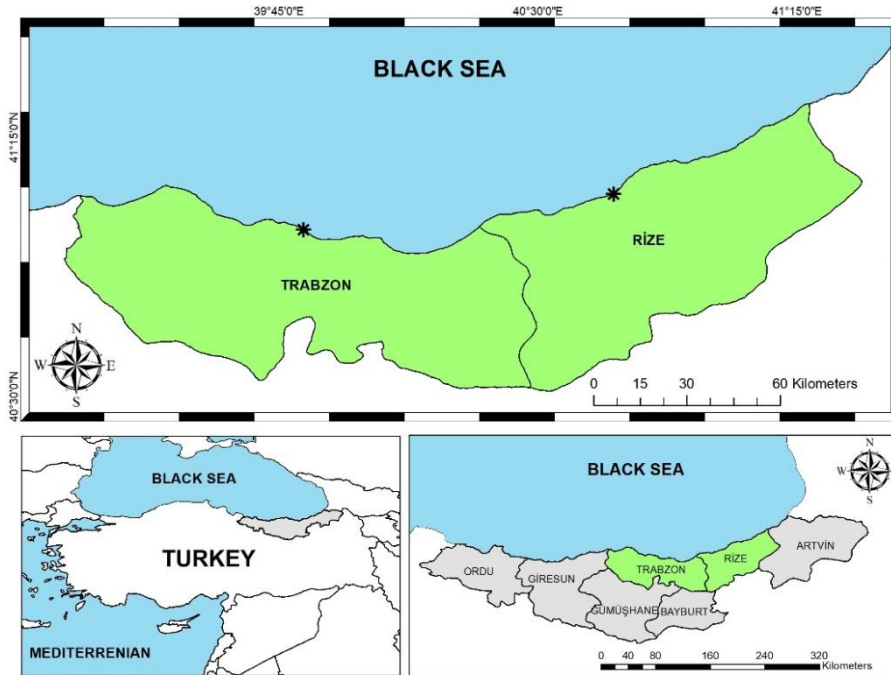


Figure 1. The study area (Trabzon and Rize coasts).

Although bivalves fed by filtering water are primarily used in monitoring heavy metal pollution in aquatic ecosystems, heavy metal research in fish located at the top of the food pyramid has been increasing in recent years since they are the main food sources of humans. There is a similar trend in heavy metal pollution research in the Black Sea region where the study was conducted. However, it is seen that research on bottom fish living close to the seabed or sediment layer has been intensified recently. On the other hand, it is necessary to monitor and reveal the risk status of pelagic species that migrate for food and reproduction. Because the Black Sea is under the effect of freshwater containing pollutant loads carried by many streams from the precipitation basin of 6 different countries surrounding it.

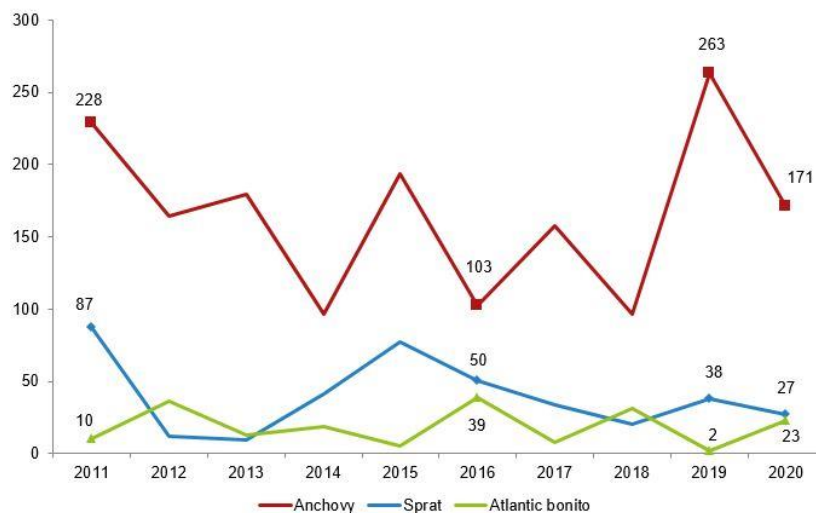


Figure 2. The most captured sea fish, 2011-2020 (Thousand tonnes) (TSI, 2020).

Atlantic bonito fish is a member of the Scombridae family (*Sarda sarda* Bloch, 1793) and is an epipelagic species. It is distributed in flocks along the Black Sea, Mediterranean, and Atlantic coasts (Collette and Nauen, 1983). This fish species, which is extremely important economically in Turkey, migrates between the Black Sea and the Aegean Sea for breeding and feeding purposes through the Dardanelles and Istanbul Straits (Nümann, 1955). The diet of bonito is formed by small fishes such as anchovies, sardines and sprat, and crustaceans (Campo et al., 2006; Kahraman et al., 2014). In the meantime, fishing is carried out intensively with seine nets, seine nets, and fishing rods. Bonito fish migrates from the Eastern Mediterranean to the Black Sea between May and July to spawn and then migrate to the same region again (Cengiz, 2013; Nümann, 1954). Turkey's waters in 2019 total 374 726 tonnes of sea fish are hunted that 1,578 tons of bonito fish (0.42%) (Figure 1).

It is clear that Atlantic bonito, which is located in the upper layers of the food pyramid in the Black Sea region, can play an important role in heavy metal bioaccumulation. Therefore, in this study, it will be an important issue to investigate heavy metal accumulation in bonito fish in terms of 2 important locations (Trabzon and Rize) on the Southeastern Black Sea coasts.

2. MATERIAL and METHODS

This study was carried out in September 2020 in Trabzon and Rize stations, which are the two most important provinces in terms of fishing in the Eastern Black Sea Region. Atlantic bonito used in this study were sampled from September 2020 to December 2020 directly from local fishing vessels in the southern of the Black Sea (Figure 1).

2.1. Preparation of fish samples before heavy metal analysis

The fish caught were labeled and brought to the laboratory in ice-protected containers the same day, and the length and weight of the samples were determined. The fish samples, which were then washed with distilled water, were dried on filter paper and stored in conditions below -20 °C until analysis after being packed in polyethylene bags.

2.2. ICP-OES Method

ICP is a high-temperature plasma technique, such as 7000-8000 °K, supported by a magnetic field, in which the elements in the sample are atomized and excited. Plasma is called gaseous ion current. In the ICP technique, plasma is created by interacting argon gas with the magnetic field created by the radiofrequency generator, since it is both inert and easily ionizable. ICP-OES is an optical emission spectroscopy technique that uses induction coupled plasma to excite atoms. It is thought that the ICP-OES technique is superior to other optical emission spectroscopy techniques due to its features such as reaching high temperatures, a long retention time of the sample element in the plasma, and atomization and excitation processes can be performed in an inert environment.

In this method, the first step consists of sample preparation. In the second step, the sample in solution is converted into aerosols with the help of a nebulizer. In the third step, the solvent of the sample coming to the plasma is removed and the substances are passed into the gas phase. In the fourth step, substances in the gas phase are separated into atoms and free atoms are obtained in the gas phase. In the fifth step, the gaseous atoms become excited in the plasma, and after a short time, they return to the ground state by emitting a resonance beam. In the last step, the resonance beam formed is detected by the detectors and the measurement is performed. In recent years, the ICP-OES system has been frequently preferred in the metal analysis due to its various advantages. These advantages are; It is possible to reach high temperatures, the retention time of the sample element in the plasma is long, atomization and excitation processes can be carried out in an inert environment, and even very stable compounds can be separated into atoms thanks to the high temperature obtained in the plasma.

In this study, heavy metal analysis in fish was performed using ICP/OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometer) method by Perkin Elmer Optima 7000 DV. EN 15763

European Standard methods were applied. The limits of detection ($\mu\text{g/l}$) used for analysis of Fe, Zn, Cu, Pb, Mn and Al were 0.5, 0.15, 0.5, 0.5, 0.02, 0.05, 0.78, 0.58, 0.166, 0.5 and 0.05, respectively.

The certified and measured values of the Reference material used to control the accuracy of the analysis process in the measurements performed in the ICP-OES system in this study are presented in Table 1. Certified reference material (DORM-4; National Research Council Canada, NRCC) was analyzed ($n=3$) to validate the method for accuracy. It is a fish protein reference material for trace element analysis in fish. While the accuracy of the analysis processes is given separately for each metal, it is seen that it is 89.24 percent on average for all elements (Table 1).

Table 1. Certified, observed values (mg.kg^{-1}) and recoveries (%) of trace metal concentrations in standard reference material for this research.

Metals	Reference Material Metal concentration (mg/kg) (Dry weight)		
	Certified	Observed	Recovery (%)
Cu	154.61	141.02	91.21
Pb	150.55	131.22	87.16
Zn	352.90	315.90	89.52
Fe	2.72	2.50	91.91
Al	1.03	0.86	83.50
Mean			89.24

2.3. Intake Levels Calculation

The average heavy metal weekly intake was estimated according to the following formula (Bat and Arıcı, 2016; Türkmen et al., 2009; Tüzen, 2009):

Heavy metals intake level = average heavy metal content X consumption of fish per person/ body weight

EWI (estimated weekly intake level) values were calculated by multiplying the mean concentrations of each element and the amount of weekly consumed fish. The annual quantity of fish consumed is 6.3 kg/person [TUIK, 2019], which is equivalent to 17.3 g/day for Turkey. The body weight of an adult person is 70 kg.

The health risks for Turkish consumers caused by consuming Atlantic bonito from the Southwest Black Sea were assessed based on THQ. This method offers an indication of the risk level due to the heavy metal exposure. The following equation was used to determine THQ (Han et al., 1998; Chien et al., 2002; Storelli, 2011; Mol et. al., 2018; Mutlu 2021b):

$$\text{THQ} = [(\text{EF} \times \text{ED} \times \text{FIR} \times \text{C}) / (\text{RFD} \times \text{WAB} \times \text{TA})] \times 10^{-3}$$

Where EF is the exposure frequency (365 days/year), ED is the exposure duration (70 years, the average lifetime according to Bennett, Kastenber, & McKone, (1999). FIR is the food ingestion rate (17.3 g/day for Turkish consumers, according to Speedy (2003), C is the determined metal concentration (mg.kg^{-1}), RFD is the oral reference dose ($\text{mg.kg}^{-1}/\text{day}$), WAB is the average body weight (70 kg), according to Kumar, Verma, Naskar, Chakraborty, & Shah, (2013), TA is the average exposure time for noncarcinogens (365 days/year x ED, assuming 70 years in this study). The oral reference doses (RFD) for Cu, Zn, Cd, Hg, and Pb (mg.kg^{-1} , day) have been suggested as 4×10^{-2} , 3×10^{-1} , 1×10^{-3} , 1.6×10^{-4} and 4×10^{-3} , respectively (US EPA, 2009).

2.4. Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Data were analyzed by ANOVA at $\alpha=0.05$. Comparison of means was performed by Duncan test and the difference was considered significant at $p < 0.05$ [20]. IBM SPSS Statistics version 21 software is used for statistical analysis.

3. RESULTS and DISCUSSION

The Black Sea Atlantic bonito from the south coast of the Black Sea, from September 2020 to December 2020 were analyzed for Fe, Zn, Cu, Pb, Mn, and Al. The mean concentrations and ranges of Fe, Zn, Cu, Pb, Mn, and Al in fish have been presented in Figure 2. The EWI and PTWI values of Atlantic bonito were calculated while THQ values were shown in Table 3. These values were calculated for Turkish consumers.

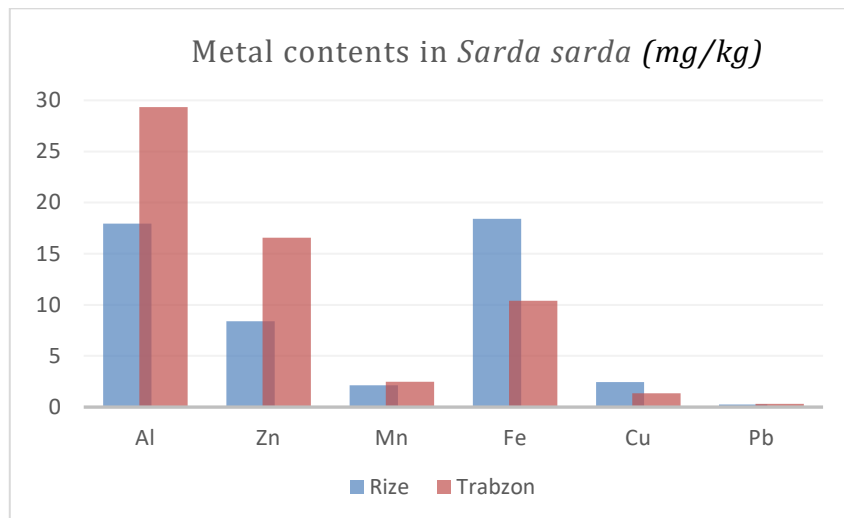


Figure 3. Comparison of the results between Trabzon and Rize stations.

The concentration of examined metals in edible tissues of Atlantic bonito from the southern Black Sea demonstrated regional differences between Trabzon and Rize stations. Mn, Pb, and Cu were detected at low concentrations at similar levels at both stations in the edible part of *S. sarda* in both coastal areas. Figure 3 shows the mean concentrations of heavy metals in the muscle of Atlantic bonito from the Trabzon and Rize coasts of the southern Black Sea, Turkey. The concentrations of measured heavy metals decrease in the order of $Pb > Cu > Mn > Zn > Fe > Al$ in all stations.

In this study, the results indicate that there is a considerable greater accumulation of the metals in muscle tissues of *S. sarda* from Trabzon than those in muscle tissues of fish from Rize coast ($P < 0.05$) and that there was a statistically significant difference between the concentrations of the metals (Table 2). On the other hand, when the metal levels accumulating in muscle tissue are evaluated in terms of permissible limits according to international standards, it is seen that the permissible limit values for Pb and Mn are exceeded (Table 2) (Suyatna et al., 2017). For other metals, it is seen that the metal levels in the muscle tissue do not exceed the permissible limit values in terms of Fe, Cu, and Zn. Also, THQ values are given in Table 3. If $THQ < 1$, it means that the consumption of the studied fish species has no adverse effects on human health in light of the current concentrations in the fish (Malakootian et al., 2016).

Table 2. Metal concentration in Atlantic bonito (mg/kg).

Metals	Metal concentrations in <i>S. sarda</i>		
	Trabzon	Rize	Permissible limits (mg.kg ⁻¹)
Pb	0.33±0.10	0.25±0.18	0.20-0.50
Cu	1.34±0.35	2.46±0.56	<20
Mn	2.49±1.11	2.14±0.75	1.00
Zn	16.56±8.26	8.40±2.69	40
Fe	10.41±10.11	18.42±2.53	100
Al	29.33±26.77	17.94±7.36	-

When the results of this research on heavy metal accumulation in bonito muscle tissues were examined, it was determined that while Pb and Mn exceeded the permissible limit values published by international organizations, this was not the case in terms of Cu, Fe, Zn, and Al values. Although there are not many studies in terms of aluminum, there are many studies on Pb and Mn. While the average Pb accumulation measured in this study was 0.29 ppm, many studies conducted in Turkey and especially in the Black Sea coast yielded results between 0.22 ppm and 0.76 ppm (Tüzen 2003, Uluözlü et al. 2007, Mendil et al., 2010, and Bat et al., 2006). It is seen that in another study on the same species on the Black Sea coast, the results of this study were considerably higher than the results of this study (Bat et al.2016). Therefore, it is seen that the permissible limit values for international standards (WHO, FAO, and EC) are exceeded in most of the studies in the current reviewed literature (Table 4).

Table 3. Target hazard quotient (THQ) of *Sarda sarda* (ug/kg/bw/day) for the adult.

Metals	Rfd	THQ	
		Rize	Trabzon
Cu	40	0.018	0.010
Fe	700	0.008	0.004
Mn	140	0.004	0.005
Pb	4	0.018	0.024
Zn	300	0.008	0.016
TTHQ		0.055	0.058

Table 4. Literature data and researches on the metal concentration in Atlantic bonito.

Metals	References	Mean metal concentrations (mg /kg)	Statiton
Al	This study	23,63	Trabzon, Rize
	Bat and Arıcı (2016)	ND	Samsun, Sinop
Zn	This study	12,48	Trabzon, Rize
	Tüzen (2003)	11.20±1.44 (dry wt.)	Samsun
	Uluozlu et al. (2007)	48.7 ± 3.7 (dry wt.)	Black Sea
	Mendil et al. (2010)	21.0 ± 2.1 (dry wt.)	Samsun, Ordu, Trabzon, Rize
	Bat et al. (2006)	12.66 (wet wt.)	Sinop
Mn	This study	2,32	Trabzon, Rize
	Tüzen (2003)	1.06±0.27 (dry wt.)	Samsun
	Uluozlu et al. (2007)	2.68 ± 0.22 (dry wt.)	Black Sea
	Mendil et al. (2010)	2.0 ± 0.2 (dry wt.)	Samsun, Ordu, Trabzon, Rize
	Bat et al. (2006)	1.72 (wet wt.)	Sinop
Fe	This study	14,41	Trabzon, Rize
	Tüzen (2003)	9.52±0.81 (dry wt.)	Samsun
	Uluozlu et al. (2007)	73.5 ± 6.3 (dry wt.)	Black Sea
	Mendil et al. (2010)	25.5 ± 2.3 (dry wt.)	Samsun, Ordu, Trabzon, Rize
	Bat et al. (2006)	12.18 (wet wt.)	Sinop
Cu	This study	1,90	Trabzon, Rize
	Tüzen (2003)	1.28±0.14 (dry wt.)	Samsun
	Uluozlu et al. (2007)	0.84 ± 0.05 (dry wt.)	Black Sea
	Mendil et al. (2010)	1.9 ± 0.2 (dry wt.)	Samsun, Ordu, Trabzon, Rize
	Bat et al. (2006)	0.659 (wet wt.)	Sinop
Pb	This study	0,29	Trabzon, Rize
	Tüzen (2003)	0.22±0.04 (dry wt.)	Samsun
	Uluozlu et al. (2007)	0.76 ± 0.05 (dry wt.)	Black Sea
	Mendil et al. (2010)	0.28 ± 0.03 (dry wt.)	Samsun, Ordu, Trabzon, Rize
	Bat et al. (2006)	0.537 (wet wt.)	Sinop

According to the results of this study, when Mn metal values are compared with other studies, it is seen that the values vary between 1.72 ppm and 2.58 ppm and the results are almost 2 times higher than the allowable limit values (Tüzen 2003, Uluözlu et al. 2007, Mendil et al., 2010, and Bat et al., 2006). Although the results of Pb and Mn are high, when the previous studies are evaluated in terms of other metals (Cu, Fe, and Zn) discussed in this study, it is seen that the results are well below the allowable limit values in all the studies examined (Table 3) (Tüzen 2003, Uluözlu et al. 2007, Mendil et al., 2010, and Bat et al., 2006).

FUNDING

No financial support was received in the conduct of this study.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that there are no financial interests or personal relationships that could affect this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Editing: BV; Methodology: TM; Performing the experiment: BV, TM; Data analysis: TM; Article writing: BV; Supervision: BV. All authors approved the final draft.

ETHICAL STATEMENTS

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

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data used in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Akkan, T., Yazicioglu, O., Yazici, R. & Yilmaz M. (2018). An examination of ecological and statistical risk assessment of toxic metals in sediments at Siddıklı Dam Lake: A Case Study In Kırsehr, Turkey. *Fresen. Environ. Bull.*, 27(12), 8104-8111.
- Aktop, Y. & Çağatay, İ. T. (2020). Ağır Metallerin Balıklarda Birikimi ve Etkileri. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 6(1), 37-44.
- Bennett, D.H., Kastenber, W.E. & McKone, T.E. (1999). A multimedia, multiple pathway risk assessment of atrazine: the impact of age differentiated exposure including joint uncertainty and variability. *Reliability Engineering & System Safety*, 63, 185–98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0951-8320\(98\)00046-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0951-8320(98)00046-5)
- Chien, L., Hung, T., Choang, K., Yeh, C., Meng, P., Shieh, M. & Han, B. (2002), Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 285, 177-185.
- Collette, B.B., & Nauen, C.E. (1983). FAO species catalogue. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. FAO Fisheries Synopsis no. 125, Rome, 137 pp.
- Nümann, W., (1955). Die Pelamiden (*Sarda sarda*) des Schwarzen Meeres, des Bosphorus, der Marmara und der Dardanellen. *Hidrobiology*, 3, 75-127.
- Bat, L. & Arıcı, E. (2016). Health risk assessment of heavy metals in *Sarda sarda* Bloch, 1793 for people through consumption from the Turkish Black Sea coasts. *International Journal of Zoology Research*, 1(1), 1-7.
- Han, B.C., Jeng, W.L., Chen, R.Y., Fang, G.T., Hung, T.C. & Tseng, R.J. (1998). Estimation of Target Hazard Quotients and Potential Health Risks for Metals by Consumption of Seafood in Taiwan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 711–720. <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900535>
- Kumar, B., Verma, V.K., Naskar, A.K., Chakraborty, P. & Shah, R. (2013). Human Health Hazard due to Metal Uptake via Fish Consumption from Coastal and Fresh Water Waters in Eastern India Along the Bay of Bengal. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 2(3), 1-7. <http://dx.doi.org/10.4172/2324-8661.1000115>
- Malakootian M, Mortazavi M S, & Ahmadi A. (2016). Heavy metals bioaccumulation in fish of southern Iran and risk assessment of fish consumption. *Environ. Health Eng. Manag.* 3(2) :61-68.
- Mendil, D., Ünal, Ö.F., Tüzen, M., & Soylak, M. (2010). Determination of trace metals in different fish species and sediments from the River Yeşilirmak in Tokat, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 1383-1392.

- Mol, S., Kahraman, A.E., & Ulusoy, S. (2018). Potential Health Risks of Heavy Metals to the Turkish and Greek Populations via Consumption of Spiny Dogfish and Thornback Ray from the Sea of Marmara, *Turk. J. Fish. & Aquat. Sci.* 19(2), 109-117.
- Mutlu, T. (2021a). Heavy metal concentrations in the edible tissues of some commercial fishes caught along the Eastern Black Sea coast of Turkey and the health risk assessment, *Spectroscopy Letters*, <http://dx.doi.org/10.1080/00387010.2021.1939386>
- Mutlu, T. (2021b). Seasonal variation of trace elements and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) values of commercial marine fish from the black sea and human health risk assessment, *Spectroscopy Letters*, 2(3). <http://dx.doi.org/10.1080/00387010.2021.1984254>
- Speedy, A.W. (2003). Global Production and Consumption of Animal Source Foods. *Journal of Nutrition*, 133(11), 4048-4053. <http://dx.doi.org/10.1080/10934520701480615>
- Storelli, M.M., Cuttone, G., & Marcotrigiano, G.O. (2011). Distribution of trace elements in the tissues of smooth hound *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) from the southern eastern waters of Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1-4), 271-81. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-010-1456-x>
- Suyatna, I., Adnan, A.S., Syahrir, M., Ghitarina, G., Abdunnur, A., & Saleh, S. (2017). Heavy Metal levels in water and fish samples from coastal waters of Mahakam Delta, Kutai Kartanegara District, East Kalimantan, Indonesia, *AACL Bioflux*, 10(5), 1319-1329.
- TUIK, (2020). Turkish Fishery Statistics, <https://www.data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2020-37252> , 29 September 2020.
- Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Töre, Y. & Ateş, A. (2009). Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. *Food Chemistry*, 113, 233–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.071>
- Tuzen, M. (2009). Toxic and Essential Trace Elemental Contents in Fish Species from the Black Sea, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1785–1790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.029>
- Tuzen, M. (2003). Determination of Heavy Metals in Fish Samples of the Middle Black Sea (Turkey) by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Chemistry*, 80(1), 119–123. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00264-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00264-9)
- Tüzen, M. (2009). Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey, *Food Chemical and Toxicology*, 47, 1785–1790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.0291>
- Uluozlu, O.D., Tüzen, M., Mendil, D. & Soylak, M. (2007). Trace metal content in nine species of fish from the Black and Aegean Seas, Turkey. *Food Chemistry*, 104(2), 835-840.
- US EPA. (2009). Risk-based Concentration table. Philadelphia PA. Washington DC, USA, Environmental Protection Agency.
- Yilmaz, M., Teber, C., Akkan, T., Er, C., Kariptas, E. & Ciftci, H. (2016). Determination of heavy metal levels in different tissues of tench (*Tinca tinca* L., 1758) from Siddikli Kucukbogaz dam lake (Kirsehir), Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(6), 1972-1977.
-

The Impact of Thyme, Rosemary, and Basil Extracts on the Chemical, Sensory and Microbiological Quality of Mackerel Balls Stored at -18°C

Kekik, Biberiye ve Fesleğen Ekstraktlarının -18°C'de Depolanan Uskumru Köftelerinin Kimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Kalitesine Etkisi

Esra Balıkçı^{1,*}, Yeşim Özoğul², Mustafa Durmuş², Yılmaz Uçar³, Saadet Gökdoğan Tekin²

¹ Yozgat Bozok University, Faculty of Tourism, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Yozgat, Türkiye

² Cukurova University, Faculty of Fisheries, Department of Seafood Processing Technology, Adana, Türkiye

³ Ordu University, Fatsa Faculty of Marine Science, Department of Fisheries Engineering Technology, Ordu, Türkiye

*Corresponding author: esra.balikci@bozok.edu.tr

Received: 27.10.2021

Accepted: 11.04.2022

Published: 01.06.2022

How to Cite: Balıkçı, E., Özoğul, Y., Durmuş, M., Uçar, Y., & Gökdoğan Tekin, S. (2022). The impact of thyme, rosemary and basil extracts on the chemical, sensory and microbiological quality of mackerel balls stored at -18°C. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 217-235. <https://doi.org/10.22392/actaquaatr.1015342>

Abstract: The effect of adding 0.05% natural herb extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymbra spicata*), and basil (*Ocimum basilicum* L.) on mackerel balls during 10 months of frozen storage (-18°C) were investigated concerning sensory (raw and cooked), biochemical (PV- peroxide value, FFA- free fatty acids, TVB-N -total volatile basic nitrogen, TBA- thiobarbituric acid and pH) and microbiological analyses (TVC- total viable count). The results indicated that the total phenolic compounds of plant extracts were determined as 38.13 mg GAE/g, 81.85 mg GAE/g, and 21.08 mg GAE/g for thyme, rosemary, and basil, respectively. The shelf life of raw fish balls was found as eight months for the control and basil groups and ten months for rosemary and thyme groups. 0.05% basil extract gave the fishball an intense taste and odor and a bitter taste. TVB-N, TBA, FFA, PV, and pH values remained lower than the acceptability limits during the storage period in all groups. The plant extracts, especially rosemary and thyme, were effective for inhibiting bacterial growth and the values of biochemical parameters. Therefore, it was concluded that natural extracts could be added to fish products as an antioxidant to prolong the shelf life of fish.

Keywords

- Lipid oxidation
- Thyme
- Rosemary
- Basil
- Fishball

Özet: Uskumru köftelerine %0,05 biberiye (*Rosmarinus officinalis*), kekik (*Thymbra spicata*) ve fesleğen (*Ocimum basilicum* L.)den elde edilen doğal bitki ekstraktlarının ilave edilmesinin duyusal (çiğ ve pişmiş), biyokimyasal (PV-peroksit değeri, FFA-serbest yağ asitleri, TVB-N-toplam uçucu bazik nitrojen, TB-tiobarbitürik asit ve pH) ve mikrobiyolojik kalitesi (TVC-toplam canlı sayısı) üzerine etkileri köftelerin dondurularak 10 ay depolanması (-18°C) süresince araştırılmıştır. Sonuçlar bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşiklerinin kekik, biberiye ve fesleğen için sırasıyla 38,13 mg GAE/g, 81,85 mg GAE/g ve 21,08 mg GAE/g olduğunu göstermiştir. Çiğ balık köftelerinin raf ömrü kontrol ve fesleğen grupları için 8 ay, biberiye ve kekik grupları için 10 ay olarak bulunmuştur. %0,05 fesleğen ekstraktı, balık köftesine yoğun bir koku ve acı bir tat vermiştir. Depolama süresince tüm gruplarda TVB-N, TBA, FFA, PV ve pH değerleri kabul edilebilirlik limitlerinin altında kalmıştır. Bitki ekstreleri, özellikle biberiye ve kekik, bakteri üremesini ve biyokimyasal parametrelerin değerlerini engellemede etkili olmuştur. Bu nedenle, balıkların raf ömrünü uzatmak için antioksidan olarak balık ürünlerine doğal ekstraktlar eklenebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler

- Lipid oksidasyonu
- Kekik
- Biberiye
- Fesleğen
- Balık köftesi

1. INTRODUCTION

Fish balls are commonly ball-shaped products obtained from minced fish with/without the inclusion of vegetables, starches, and condiments (Tee & Siow, 2014; Yuxiang Zhang et al., 2019). They are steamed, boiled, or deep-fried (Feng et al., 2017; Huda et al., 2010). In several countries such as China, Singapore, Japan, the United States, Germany, Australia, and the countries in Southeast Asia, it is commonly consumed food and available in supermarkets worldwide (Feng et al., 2017; Yuxiang Zhang et al., 2019). Besides its high nutritional value, the consumption of fish balls prevents the problem of drowning due to the fish bones since the bones are completely taken during the procedure (Feng et al., 2017). However, the fishball is a particularly perishable product as it is made of fish meat (Kok & Park, 2007) containing a high level of long-chain PUFAs, especially DHA and EPA (Ali et al., 2019; Petricorena, 2015). In addition, it is more sensitive to oxidative deterioration than other meat products. Lipid oxidation can cause degradation of taste, odor, color, texture, and also the production of toxic composites (Kanner, 1994). During frozen storage, lipid hydrolysis, oxidation, and protein denaturation in seafood have been reported to have a major effect on product acceptability (Tironi et al., 2010). To ensure freshness and longer the shelf life, fish balls are mostly sold as frozen (Hilgarth et al., 2018; Russell, 1990).

Growing demand for ready-to-cook fish products with high quality and prolonged shelf life has led to the improvement of various novel techniques to preserve quality characteristics and obtain innocuous products (Maftoonazad & Badii, 2012). Synthetic preservative agents have been employed to prolong the storage life of foods, but they are tightly controlled due to toxicological and health issues (Wilson & Bahna, 2005). Therefore, food products preserved with natural extracts have become popular due to the perception of consumers against chemical preservatives (Holley & Patel, 2005). It is challenging to find influential and non-toxic procedures to delay spoilage and prolong the shelf life of fish (Gao et al., 2014). The usage of herbal essential oils and their extracts has been used in many food products (Aliakbarlu & Khalili Sadaghiani, 2015; Hashemi Gahruie et al., 2015). Current demand in food manufacturing is the decrease or replacement of chemically synthesized additives. The usage of plant extracts or plant essential oils as natural food preservatives is a method to avoid the growth of microorganisms or to preserve food from oxidation (Bubonja-Sonje et al., 2011).

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) has been employed as an antioxidant or food additive (Seabra et al., 2011). Its antioxidant capacity is mainly due to phenolic diterpenes, rosmarinic acid, carnosol, and carnosic acid (Rocío Teruel et al., 2015). In addition, carvacrol and thymol extracted from thyme improved the permeability of ATP, resulting in fatal damage to bacterial cells (Burt, 2004). Basil has also demonstrated antimicrobial and antioxidant activities. Rosmarinic acid is one of the most significant phenolics in basil (Sharafati-Chaleshtori et al., 2015). It has been reported that rosmarinic acid and its derivatives have antioxidant, antibacterial, and medicinal properties (Petersen & Simmonds, 2003). Thus, the current study aimed to research the antioxidant and antimicrobial effects of three plant extracts (basil, thyme, and rosemary) on the quality of fishball concerning sensory, chemical, and microbiological assessments during frozen storage.

2. MATERIALS and METHODS

2.1. Plant extract

Rosemary (*R. officinalis* L.), thyme (*Thymbra spicata*), and basil (*Ocimum basilicum* L.) were extracted by the method of (Chen et al. (1992).

2.2. Preparation of samples

Atlantic mackerel (*S. scombrus*) were bought from a local fish processing plant (Pakyürek, Adana, Turkey). After frozen fish were thawed in a fridge, they were gutted and washed. After that, the fish was cooked in boiling water for 5 min. The flesh of fish was separated from the bones and skins

manually. The minced fish was divided into four groups (the control with no extract, 0.05% rosemary, 0.05% thyme, and 0.05% basil extract). Fish balls were made by the method of López-Caballero et al. (2005) with minor modifications. Ingredients consisted of 0.5% salt, 5% water, 2% egg white (Lick A.Ş., Turkey), and 10% wheat starch (Kent Gıda A.Ş., Turkey) with/without plant extract was added to minced fillets, mixed thoroughly by a mixer (Easy Max Compact, France) and then shaped into a fishball (3cm, 15±1.2 g) by hands. Fish balls were placed into each polyethylene bag (24x38cm, high-density polyethylene (HDPE)), whose density is typically between 0.94-0.97 g/cm³ and higher melting point (135°C, typically stable at 110°C). Every package contained ten fish balls and was kept at -18 °C for ten months. They were analyzed monthly in terms of sensory, chemical, and microbiology analyses. Data were obtained from three packages of fish balls.

2.3. Sensory analysis

Sensory analyses of raw fish balls (appearance, color, odor, and general acceptability) were assessed by the method of de Koning and Mol (1991). Each assessment was carried out on each test day by a minimum of six trained panelists. Fish balls were evaluated at 24 °C under normal daylight circumstances. On each analysis day, three packs of fish balls were randomly selected for each group to assess their sensory attributes, both raw and cooked. Sensory evaluation of cooked mackerel meatballs was assessed by Paulus et al (1979). Fish balls were presented to panelists after they were fried in sunflower oil at 185 °C for 2-3 minutes.

2.4. Chemical analyses

The kjeldahl procedure was used for the determination of protein content (AOAC, 1998) using a Buchi Digestion System (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Switzerland) and a Kjeltac Distillation Unit B-324 (BÜCHI Labortechnik). Protein level was determined as a percentage of Nx6.25. Lipid was measured by Bligh and Dyer's (1959) method. Ash level was found as described by AOAC Method 920.153 (2002), and moisture content was found by AOAC Official method 950.46 (2002). Peroxide value (PV) was carried out by AOCS Method Ja 8-87 (1994) and expressed as milliequivalents of peroxide oxygen per kilogram of fat. The total phenolic levels of plant extracts were performed by Singleton et al. (1999). The TVB-N content of samples was measured by Antonocopoulos (1973) and expressed as milligrams TVB-N per kilogram of muscle. Free fatty acid analysis (FFA) was found by AOCS Official Method (Ca 5a-40, 1997) and expressed as a percentage of oleic acid. Thiobarbituric acid (TBA) values of fish balls were measured by the method of Tarladgis et al. (1960) and expressed as TBA values in milligrams of malondialdehyde (MA) per kilogram of flesh.

2.5. Microbiological analyses

Plate count agar (standard methods agar) was used enumeration of mesophilic bacteria. Ten grams of fish meat from each fish ball group were weighed, and then these samples were homogenized for 2 minutes in the stomacher device by adding 90 mL of Ringer's solution. After, decimal dilutions were made up to 10⁻⁸, and then 0.1 mL of each dilution was pipetted onto the surface of plate count agar plates in triplicate. Then, all plates were incubated at 30°C for two days. Afterward, all plate count agar plates were incubated at 30 °C for two days for mesophilic bacteria growth.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyzes were done using the SPSS version 22 software (SPSS, Chicago, Illinois, USA). The data of control, thyme, rosemary, and basil groups were subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range tests.

3. RESULTS and DISCUSSION

3.1. Sensory analyses

The sensory analyses of raw fish balls are given in Table 1. Sensory scores of fish balls in all groups regarding appearance, odor, color, and general acceptability reduced towards the end of the storage period. However, the scores for each sensory trait of samples with rosemary and thyme were

significantly higher ($p < 0.05$) than those of the control samples at any time during frozen storage. There were significant differences ($p < 0.05$) in fish ball groups after the 6th month of storage in terms of general acceptance (Table 1). As a result of sensory analyses, the control and basil groups were rejected at nine months by panelists and considered unacceptable, while rosemary and thyme groups were still acceptable at the end of the storage (10 months) period. It was found that thyme and rosemary extract was more effective on sensory evaluation and prolonged the shelf life by two months compared to the control and basil groups.

Table 1. Changes in sensory parameters of the raw fish ball during frozen storage (-18°C)

Sensory parameters	Storage time (month)	Groups			
		Control % 0.05	Thymus % 0.05	Rosemary % 0.05	Basil % 0.05
Appearance	0	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	1	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	2	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	3	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	4	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	5	4.9±0.25 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	4.9±0.25 ^{ax}
	6	4.4±0.48 ^{bxy}	4.9±0.25 ^{ax}	4.9±0.25 ^{ax}	4.3±0.29 ^{by}
	7	4.0±0.00 ^{cx}	4.3±0.29 ^{bx}	4.4±0.25 ^{bx}	4.1±0.25 ^{bx}
	8	3.1±0.25 ^{dy}	4.0±0.00 ^{cx}	4.1±0.25 ^{bx}	3.3±0.29 ^{ey}
	9	2.6±0.25 ^{ey}	3.4±0.25 ^{dx}	3.6±0.48 ^{cx}	2.5±0.00 ^{dy}
	10	2.4±0.25 ^{ey}	3.1±0.25 ^{ex}	3.0±0.00 ^{dx}	2.3±0.29 ^{dy}
Colour	0	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	1	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	2	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	3	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	4	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	5	4.6±0.48 ^{bx}	4.8±0.50 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	4.6±0.48 ^{ax}
	6	4.1±0.25 ^{cx}	4.4±0.48 ^{ax}	4.5±0.58 ^{ax}	4.3±0.29 ^{bx}
	7	3.9±0.25 ^{cx}	4.1±0.25 ^{bx}	4.3±0.29 ^{bx}	4.1±0.25 ^{bx}
	8	3.1±0.25 ^{dy}	4.0±0.00 ^{bx}	4.1±0.25 ^{bx}	3.1±0.25 ^{ey}
	9	2.5±0.00 ^{ey}	3.4±0.25 ^{cx}	3.5±0.41 ^{cx}	2.3±0.29 ^{dy}
	10	2.3±0.29 ^{ey}	3.0±0.25 ^{dx}	3.1±0.25 ^{dx}	2.1±0.25 ^{dy}
Odour	0	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	1	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	2	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	3	4.9±0.25 ^{abx}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	4.9±0.25 ^{abx}
	4	4.6±0.48 ^{abx}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	4.8±0.50 ^{abx}
	5	4.5±0.58 ^{bcdx}	4.8±0.50 ^{abx}	4.8±0.50 ^{ax}	4.5±0.58 ^{bcdx}
	6	4.1±0.25 ^{cdy}	4.5±0.58 ^{bcdx}	4.9±0.25 ^{ax}	4.3±0.30 ^{cdy}
	7	4.0±0.00 ^{dy}	4.3±0.25 ^{cy}	4.8±0.29 ^{ax}	4.0±0.00 ^{dy}
	8	3.3±0.29 ^{ey}	4.1±0.25 ^{cx}	4.3±0.29 ^{bx}	3.3±0.29 ^{ey}
	9	2.1±0.25 ^{fy}	3.3±0.29 ^{dx}	3.5±0.58 ^{cx}	2.3±0.29 ^{fy}
	10	2.0±0.41 ^{fy}	3.0±0.00 ^{dx}	3.0±0.00 ^{dx}	2.0±0.00 ^{fy}
General acceptance	0	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	1	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	2	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	3	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}
	4	4.9±0.25 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	5.0±0.00 ^{ax}	4.9±0.25 ^{abx}
	5	4.8±0.29 ^{ax}	4.9±0.25 ^{ax}	4.9±0.25 ^{ax}	4.63±0.48 ^{bcdx}
	6	4.3±0.29 ^{bz}	4.8±0.29 ^{axy}	4.9±0.07 ^{ax}	4.4±0.25 ^{cdyz}
	7	4.0±0.00 ^{by}	4.1±0.25 ^{by}	4.5±0.00 ^{bx}	4.1±0.25 ^{dy}
	8	3.3±0.29 ^{cy}	4.0±0.00 ^{bx}	4.3±0.29 ^{bx}	3.3±0.29 ^{ey}
	9	2.6±0.25 ^{dy}	3.4±0.25 ^{cx}	3.5±0.41 ^{cx}	2.3±0.29 ^{fy}
	10	2.3±0.29 ^{ey}	3.0±0.00 ^{dx}	3.0±0.00 ^{dx}	2.0±0.00 ^{fy}

n:3, values represent mean ±SD. Values in the same column followed by different letters (a, b, c, d, e, f) indicate significant differences ($p < 0.05$) during storage periods. Values in the same row followed by different letters (x, y, z) indicate significant differences between groups ($p < 0.05$). A score of 5 represents 'like very much, a score of 4 'like', a score of 3 'neither like or dislike' while a score of 2-1 was regarded as 'dislike'.

Sensory assessments of cooked fish balls (color, odor, taste, general acceptability, and texture) are given in Table 2. Sensory scores in all groups decreased during storage of 10 months. The addition of 0.05% basil extract gave the samples a bitter taste and odor compared to the extracts of thyme and

rosemary used at the same concentration. Therefore, the thyme and rosemary groups were the most preferred by the sensory panel compared to the basil group. Many researchers have reported that the decrease in taste and aroma scores is caused by composites such as ketone and aldehyde, which are released because of lipid oxidation during storage and negatively affect the taste of products (Flores et al., 2004; Montel et al., 1998).

Table 2. Changes in sensory parameters of the cooked fish ball during frozen storage (-18°C).

Storage time (month)	Groups	Color	Odor	Taste	Texture	General acceptance
0	Control	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Tymus	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Rosemary	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Basil	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
1	Control	9.00±0.00 ^{ax}	8.83±0.41 ^{ax}	8.58±0.49 ^{aby}	9.00±0.00 ^{ax}	8.83±0.41 ^{ax}
	Tymus	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Rosemary	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Basil	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
2	Control	9.00±0.00 ^{ax}	8.83±0.41 ^{ax}	8.42±0.49 ^{abx}	9.00±0.00 ^{ax}	8.67±0.49 ^{ax}
	Tymus	9.00±0.00 ^{ax}	8.83±0.41 ^{abx}	8.83±0.41 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Rosemary	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	8.92±0.20 ^{abx}	9.00±0.00 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}
	Basil	8.92±0.20 ^{ax}	8.58±0.49 ^{abx}	8.75±0.42 ^{ax}	9.00±0.00 ^{ax}	8.83±0.41 ^{abx}
3	Control	8.83±0.41 ^{ax}	8.50±0.55 ^{ax}	8.33±0.52 ^{bx}	8.67±0.52 ^{abx}	8.63±0.52 ^{ax}
	Tymus	8.75±0.27 ^{ax}	8.75±0.42 ^{abx}	8.83±0.26 ^{ax}	8.92±0.20 ^{ax}	8.83±0.41 ^{abx}
	Rosemary	8.92±0.20 ^{ax}	8.75±0.27 ^{abx}	8.83±0.26 ^{abx}	8.83±0.26 ^{ax}	8.92±0.20 ^{abx}
	Basil	8.75±0.42 ^{abx}	8.50±0.55 ^{abx}	8.50±0.45 ^{ax}	8.67±0.52 ^{ax}	8.67±0.52 ^{abx}
4	Control	8.75±0.42 ^{ax}	8.42±0.49 ^{ax}	8.17±0.26 ^{bx}	8.58±0.49 ^{abx}	8.08±0.20 ^{bx}
	Tymus	8.58±0.38 ^{ax}	8.50±0.55 ^{abx}	8.33±0.26 ^{bx}	8.67±0.52 ^{ax}	8.50±0.55 ^{bcx}
	Rosemary	8.67±0.52 ^{ax}	8.50±0.55 ^{bcx}	8.50±0.55 ^{bcx}	8.67±0.52 ^{ax}	8.58±0.49 ^{bcx}
	Basil	8.50±0.55 ^{bcx}	8.33±0.26 ^{bcx}	8.00±0.55 ^{bx}	8.17±0.61 ^{bx}	8.42±0.49 ^{bx}
5	Control	8.25±0.27 ^{bx}	7.75±0.61 ^{bx}	7.50±0.55 ^{cy}	8.17±0.26 ^{by}	7.92±0.20 ^{bz}
	Tymus	8.50±0.45 ^{ax}	8.33±0.26 ^{cx}	8.25±0.27 ^{bx}	8.58±0.49 ^{ax}	8.42±0.20 ^{cx}
	Rosemary	8.58±0.38 ^{ax}	8.25±0.27 ^{cdx}	8.33±0.26 ^{cx}	8.58±0.20 ^{ax}	8.33±0.26 ^{cdx}
	Basil	8.33±0.42 ^{cx}	8.00±0.55 ^{cdx}	7.92±0.49 ^{bxy}	7.83±0.26 ^{by}	7.92±0.20 ^{cy}
6	Control	7.67±0.52 ^{bcx}	7.50±0.55 ^{bx}	7.17±0.41 ^{cdy}	7.50±0.55 ^{cy}	7.33±0.52 ^{cy}
	Tymus	7.75±0.61 ^{bx}	7.58±0.45 ^{cx}	7.67±0.52 ^{cxy}	7.75±0.42 ^{bx}	7.83±0.41 ^{dx}
	Rosemary	7.75±0.42 ^{bx}	8.00±0.00 ^{dex}	7.83±0.26 ^{dx}	8.08±0.20 ^{bx}	8.00±0.00 ^{dex}
	Basil	7.50±0.55 ^{dx}	7.50±0.55 ^{dx}	7.33±0.52 ^{cxy}	7.00±0.00 ^{ez}	7.17±0.26 ^{dy}
7	Control	7.58±0.58 ^{bcx}	7.33±0.52 ^{bxy}	6.83±0.41 ^{dey}	7.33±0.52 ^{cxy}	7.33±0.52 ^{cxy}
	Tymus	7.50±0.55 ^{bx}	7.50±0.49 ^{cx}	7.50±0.55 ^{cx}	7.58±0.66 ^{bx}	7.50±0.55 ^{dx}
	Rosemary	7.67±0.52 ^{bx}	7.83±0.41 ^{ex}	7.67±0.52 ^{dx}	7.83±0.41 ^{bx}	7.67±0.52 ^{efx}
	Basil	7.42±0.49 ^{dex}	6.83±0.52 ^{ey}	7.33±0.52 ^{cxy}	6.75±0.42 ^{cy}	6.83±0.41 ^{dey}
8	Control	7.33±0.52 ^{cx}	6.50±0.55 ^{ey}	6.33±0.52 ^{ey}	6.67±0.52 ^{dy}	6.50±0.55 ^{cy}
	Tymus	7.33±0.52 ^{bx}	7.00±0.00 ^{dy}	6.50±0.55 ^{dy}	7.08±0.20 ^{cxy}	7.00±0.00 ^{exy}
	Rosemary	7.50±0.55 ^{bx}	7.67±0.52 ^{ex}	7.50±0.55 ^{dx}	7.33±0.52 ^{cx}	7.50±0.55 ^{fx}
	Basil	7.33±0.41 ^{dex}	6.67±0.52 ^{ey}	6.17±0.26 ^{dy}	6.67±0.52 ^{cy}	6.67±0.52 ^{ey}
9	Control	6.75±0.42 ^{dx}	5.92±0.49 ^{dxy}	5.67±0.52 ^{fy}	6.50±0.55 ^{dx}	6.00±0.00 ^{gy}
	Tymus	6.83±0.41 ^{ax}	6.25±0.42 ^{ey}	6.33±0.52 ^{dex}	6.50±0.55 ^{dx}	6.17±0.41 ^{fy}
	Rosemary	7.00±0.00 ^{cx}	7.00±0.00 ^{fx}	6.50±0.55 ^{ex}	6.67±0.52 ^{dx}	7.00±0.00 ^{gx}
	Basil	7.00±0.00 ^{ex}	5.67±0.52 ^{fy}	5.50±0.45 ^{ey}	6.50±0.55 ^{cx}	6.00±0.00 ^{fy}
10	Control	6.33±0.52 ^{dx}	4.92±0.20 ^{ey}	5.00±0.32 ^{gy}	6.25±0.42 ^{dx}	5.42±0.49 ^{dy}
	Tymus	6.50±0.55 ^{ax}	5.83±0.41 ^{fx}	6.00±0.00 ^{ex}	6.33±0.52 ^{dx}	6.00±0.00 ^{fx}
	Rosemary	6.50±0.55 ^{dx}	6.00±0.00 ^{gx}	6.25±0.27 ^{ex}	6.50±0.55 ^{dx}	6.33±0.41 ^{hx}
	Basil	6.33±0.52 ^{fx}	4.50±0.55 ^{gy}	4.33±0.41 ^{fy}	6.33±0.52 ^{cx}	5.00±0.55 ^{gy}

n:3, values represent mean ±SD. Different letters (a,b,c,d,e,f) in the same column show significant differences (P<0.05). Different letters (x,y,z) in the same row show significant differences (P<0.05). In the sensory evaluation based on a scale of 1 to 9, a score of 9 indicates "very good quality", a score of 7-8 indicates "good quality", a score of 5-6 indicates the "acceptable limit", while a score of 1-4 indicates "bad or unacceptable".

The general acceptability value of cooked samples decreased during storage, in this study. The decline in general acceptability was attributed to the loss of taste and texture caused by microbial

infestation, degradation of protein, and lipid oxidation (Lorenzo et al., 2013). For the raw samples, the shelf life of fishball was 8 months for the basil and the control groups whereas the rosemary and thyme groups had shelf lives of 10 months. However, for the cooked samples, all groups can be consumed until the end of 10-month storage period. This result proposed that cooking might eliminate some unwanted volatile compounds in fish meat. Chytiri et al. (2004) also reported that raw trout meat was rejected on the 14th day of storage, while cooked trout were rejected on the 19th day of storage. Thyme and rosemary groups in the cooked fish balls were the most effective compared to the control and basil groups as found in raw fish balls. Thyme and rosemary extracts enhanced the flavor of fish balls by giving a pleasant taste and aroma. Similar results were found in the other studies (Schilling et al., 2018; Zhao et al., 2019).

Uçak et al., (2011) tested two different concentrations of rosemary extracts (0.4% and 0.8%) on fish burgers made from Atlantic mackerel. The addition of 0.4% rosemary extracts was the most effective on the organoleptic quality of the fish burgers. Pezeshk et al. (2011) researched the effects of turmeric and shallot extracts on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored at 4°C for 20 days. They reported that the use of natural extracts maintained the good quality of the products. They also noticed an improvement in the sensory characteristics especially when turmeric and shallot extracts were combined. These findings suggest that adding natural plant extracts could help to enhance the sensory characteristics of fish and fish products.

3.2. Changes in chemical quality

3.2.1. Proximate composition

Lipid, protein, ash, and moisture contents of raw fish balls were determined as 12.42%, 17.02%, 1.53%, and 59.51% respectively. Similar values were observed for chub mackerel burgers with natural (green tea, sage, oregano, and laurel) extracts by Ozogul and Uçar, (2013) and also for Atlantic mackerel fish burgers with rosemary extract by Uçak et al. (2011).

3.2.2. The total phenolic compounds (TPC)

Herbs as preservative agents have been used to prolong the shelf-life of food, especially lipid-rich products (Kivilompolo et al., 2007) due to their antioxidant properties related to their phenolic compounds (Vallverdú-Queralt et al., 2015). In the current study, the highest value of phenolic level was reported for rosemary (81.85 mg GAE/g) with the most effective on fish balls, followed by thyme (38.13 mg GAE/g) whereas basil (21.08 mg GAE/g) extract had the lowest content of phenolic compounds. Similarly, Stanciu et al. (2017) observed that rosemary had the highest TPC while basil had the lowest TPC among the examined seven plant spices (basil, thyme, sage, coriander, mint, tarragon, rosemary). Melissa and rosemary, oregano, and thyme have been reported to have high contents of phenolic compounds (Ulewicz-Magulska & Wesolowski, 2019).

Skendi et al. (2017) reported a similar total phenolic compound (38.2 mg GAE/g) for thyme with the methanolic extract. However, Gedikoğlu et al. (2019) showed that the TPC in the range of 13.13 - 15.13 mg GAE/g for the dry weight (DW) for *Thymbra spicata* and *Thymus vulgaris* ethanol and methanol extracts. Roby et al. (2013) also observed much lower (from 4.75 to 8.10 mg GAE/g DW) total phenolic compounds for thyme for four solvents (hexane, ethanol, methanol, and diethyl ether) than that found in this study. The mean total phenolic levels for 15 basil cultivars were in the range of 3.47 mg - 17.58 mg GAE/g DW (Kwee & Niemeyer, 2011). Złotek et al. (2017) indicated that basil leaves contained 16.21 ± 0.51 mg GAE/g DW of total phenolic compounds. The earlier studies revealed that the TFC of rosemary was 40.2 mg GAE/g (Skendi et al., (2017) and 31.73 mg GAE/g (Yeşilsu & Özyurt, 2019) which were lower than that of rosemary in this study. The differences in total phenols content of herbs can be explained by the geographical properties, growing conditions, chemical composition of the species, harvesting time, plant's part used in analyses (Rahimmalek et al., 2009; Stanciu et al., 2017), and also storage conditions and the method of analysis (Skendi et al., 2017).

3.2.3. Peroxide value (PV)

PV was measured to evaluate the creation of prime lipid oxidation products that define the degree of lipid oxidation. During frozen storage, the changes in PV of all samples are given in Table 3. PV values were measured as 0.28 meq O₂/kg in all groups at the beginning of the storage period. A rise in the PV values of all groups was noticed during the storage period (Table 3). There were significant differences ($P<0.05$) in PV between the control and the other groups except for the basil group. At the end of frozen storage, the highest values were obtained for the control and the basil groups (12.98 and 12.77 meq O₂/kg respectively) while the lowest PV was obtained from rosemary (8.18 meq O₂/kg) and thyme (11.22 meq O₂/kg) groups. The acceptability limit is 20 meq O₂/kg oil for PV of fish oil according to Connell (1995). In this study, PV values of all fish ball samples did not reach this limit during frozen storage.

Table 3. Changes in TBA (mg MA/kg), FFA (% oleic acid) and PV (meq O₂/kg) content of fishball during frozen storage (-18°C).

Storage months	Control	Thymus	Rosemary	Basil
TBA (mg MA/kg)				
0	0.49±0.00 ^{fx}	0.49±0.00 ^{gx}	0.49±0.00 ^{fx}	0.49±0.00 ^{fx}
1	0.59±0.03 ^{fx}	0.54±0.01 ^{gy}	0.53±0.02 ^{fy}	0.58±0.01 ^{fx}
2	1.77±0.08 ^{ex}	1.40±0.04 ^{fy}	1.33±0.06 ^{ey}	1.83±0.07 ^{ex}
3	1.64±0.07 ^{ex}	1.50±0.24 ^{fx}	1.36±0.09 ^{ex}	1.60±0.35 ^{ex}
4	1.83±0.32 ^{ex}	1.65±0.17 ^{fx}	1.49±0.24 ^{ex}	1.75±0.42 ^{ex}
5	2.82±0.55 ^{dx}	2.37±0.44 ^{ey}	2.05±0.18 ^{dy}	2.87±0.05 ^{dx}
6	2.69±0.81 ^{dx}	2.54±0.39 ^{ex}	2.45±0.23 ^{cdx}	2.67±0.61 ^{dx}
7	3.02±0.18 ^{dx}	2.89±0.32 ^{dx}	2.67±0.37 ^{cx}	2.92±0.22 ^{dx}
8	3.80±0.17 ^{cx}	3.55±0.33 ^{cx}	3.10±0.21 ^{by}	3.75±0.44 ^{cx}
9	5.81±0.64 ^{bx}	4.03±0.41 ^{by}	3.34±0.90 ^{by}	5.43±0.45 ^{bx}
10	6.87±0.57 ^{ax}	5.96±0.19 ^{ay}	4.39±0.39 ^{az}	6.43±0.58 ^{axy}
FFA (% Oleic acid)				
0	2.02±0.12 ^{dx}	2.02±0.12 ^{ex}	2.02±0.12 ^{cx}	2.02±0.12 ^{hx}
1	2.34±0.07 ^{cdx}	2.16±0.09 ^{dex}	2.12±0.26 ^{cx}	2.13±0.11 ^{ghx}
2	2.42±0.08 ^{cx}	2.20±0.09 ^{dey}	2.20±0.10 ^{cy}	2.23±0.08 ^{fghy}
3	2.41±0.08 ^{cx}	2.33±0.28 ^{cdx}	2.31±0.13 ^{bex}	2.34±0.20 ^{efgx}
4	2.46±0.14 ^{cx}	2.39±0.09 ^{bcdx}	2.25±0.05 ^{cx}	2.45±0.23 ^{defx}
5	2.88±0.21 ^{bx}	2.53±0.21 ^{bcy}	2.30±0.02 ^{bcy}	2.57±0.17 ^{dexy}
6	2.83±0.20 ^{bx}	2.57±0.12 ^{bcy}	2.34±0.09 ^{bcy}	2.65±0.17 ^{cdx}
7	2.88±0.51 ^{bx}	2.67±0.12 ^{abx}	2.62±0.43 ^{abx}	2.70±0.14 ^{bcdx}
8	3.18±0.08 ^{abx}	2.88±0.15 ^{ay}	2.69±0.08 ^{ay}	2.86±0.06 ^{abcy}
9	3.30±0.20 ^{ax}	2.92±0.14 ^{ay}	2.75±0.18 ^{ay}	2.97±0.23 ^{abxy}
10	3.35±0.15 ^{ax}	2.89±0.18 ^{ay}	2.88±0.07 ^{ay}	2.99±0.05 ^{ay}
PV (meq O₂/kg)				
0	0.28±0.09 ^{gx}	0.28±0.09 ^{gx}	0.28±0.09 ^{hx}	0.28±0.09 ^{ix}
1	0.29±0.17 ^{gx}	0.25±0.04 ^{gx}	0.24±0.05 ^{hx}	0.25±0.02 ^{ix}
2	1.85±0.44 ^{fx}	1.54±0.14 ^{fx}	0.21±0.02 ^{hz}	1.23±0.21 ^{hy}
3	4.12±0.68 ^{dx}	2.29±0.40 ^{ey}	1.29±0.25 ^{gy}	1.85±0.75 ^{ghy}
4	3.10±0.54 ^{ex}	2.53±0.04 ^{exy}	2.01±0.10 ^{fy}	2.29±0.35 ^{gy}
5	4.23±0.86 ^{dx}	3.28±0.81 ^{dx}	3.00±0.08 ^{ex}	4.21±0.33 ^{fx}
6	7.62±0.84 ^{ex}	6.35±0.06 ^{cy}	5.86±0.37 ^{dy}	5.46±0.62 ^{ey}
7	8.10±0.33 ^{cx}	7.44±0.38 ^{bxy}	6.67±0.65 ^{bcy}	7.79±0.53 ^{dx}
8	9.87±0.13 ^{bx}	7.98±0.11 ^{bz}	6.26±0.45 ^{cdt}	8.63±0.36 ^{cy}
9	10.51±0.19 ^{by}	8.07±0.38 ^{bz}	6.90±0.33 ^{bt}	11.45±0.64 ^{bx}
10	12.98±0.46 ^{ax}	11.22±0.82 ^{ay}	8.18±0.31 ^{az}	12.77±0.39 ^{ax}

n:3, values represent mean ±SD. Different letters (a,b,c,d,e,f) in the same column show significant differences (P<0.05). Different letters (x,y,z) in the same row show significant differences (P<0.05).

It was found that the application of plant extract groups especially rosemary and thyme had significant effects on postponing lipid oxidation in frozen fish balls. This could be explained by that rosemary and thyme groups showed a more pro-oxidant effect than the basil group on fish balls. The antioxidant efficiency of rosemary, thyme, and basil extracts is because of a high content of phenolic compounds (Ying Zhang et al. 2010; Rizea et al. 2012; Rocío Teruel et al. 2015; Skendi et al. 2017). Shi et al. (2019) and Özyurt et al. (2011) also observed the anti-oxidative effect of rosemary extract on mud shrimp (*Solenocera melantho*) and sea bream (*Sparus aurata*) during frozen storage respectively. Similarly, Ozogul and Uçar, (2013) indicated that additions of laurel, green tea, and oregano extract reduced lipid oxidation in fish burgers during frozen (-18 °C) storage.

3.2.4. Free Fatty Acid (FFA)

FFA is found to determine the degree of lipid hydrolysis (De Abreu et al., 2011; Shi et al., 2019). Variations in FFA of frozen fish balls during the storage period are presented in Table 3. The initial FFA level was measured as 2.02%. This value rose in all groups during the storage and the FFA value was found at 3.35% in the control group, while the FFA value of thyme, rosemary, and basil was found at 2.89%, 2.88%, and 2.99% respectively at the end of the storage. During the storage, the FFA values of the control were higher than those of the plant extract groups ($p < 0.05$). No significant differences were found among the FFA values of the groups with plant extract (except the 6th month) ($p > 0.05$). The data exhibited that the addition of plant extract was significant ($p < 0.05$) effect on the prevention of FFA development during the frozen storage of fish balls. Serdaroğlu and Felekoğlu (2005) also indicated that the FFA levels of sardines treated with rosemary extract were lower than the control group during storage at -20°C . Moreover, Ozogul and Uçar, (2013) reported that thyme extract added to the fish burger significantly reduced FFA compared to the control group.

3.2.5. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

The TBARS value was one of the significant indices for measuring lipid oxidation (Kuley et al., 2012). TBA value is widely used to evaluate rancidity levels and is mostly correlated to the improvement of secondary products for oxidation (Schormüller 1968). At the beginning of the storage, the TBA value was 0.49 mg MA/kg and increased significantly during the storage period (Table 3). This increase was higher in the control group than in the plant extract groups ($p < 0.05$). It was determined that the TBA values of the control and plant extract groups did not reach the acceptability limit value of 7-8 mg MA/kg specified by Schormüller (1969) at the end of storage. The lowest TBA values were observed in rosemary-treated groups during storage. The decrease in TBARS could be associated with the phenolic compounds. As a result of their potential antioxidant capability, phenol-enriched plant extracts were commonly used in food processing and storage (Sun et al., 2017). The use of various plant extracts has been found to affect a decrease TBARS levels in fish and fish products (Alghazeer et al., 2008; Gahraie et al., 2017; Li et al., 2013; Martínez et al., 2019; Shi et al., 2019; Yi et al., 2011).

Similar results were found for the sage, oregano and grape seed (SOG) extracts which were applied to delay lipid oxidation in hairtail fish balls (Guan et al., 2019). They reported that TBARS values were in the range of 1.17 - 2.07 mg MDA/kg for the control, whereas TBARS values were reduced to 0.27–0.56 mg MDA/kg in the SOG-treated sample Cadun et al. (2008) also reported that TBA value in marinated shrimp applied with rosemary extract was 2.7 times lower than that of the control group at the end of storage. The impacts of adding rosemary extract on the oxidation of cooked sea bream during frozen storage were evaluated by Özyurt et al. (2011). They observed that samples treated with rosemary extract mostly gave lower TBA values than those of the untreated samples. Based on the data found in the present study, treatment with rosemary and thyme extract was more effective on the TBA value.

3.2.6. Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N)

TVB-N is one of the extensively used fish quality indexes to assess the degree of spoilage by endogenous enzymes and bacteria. TVB-N in fish consists mainly of ammonia, dimethylamine, and trimethylamine. (Pezeshk et al., 2011; Sallam et al., 2007). The rise in TVB-N value is due to the action of spoilage bacteria and endogenous enzymes (Ruiz-Capillas & Moral, 2005). However, during the storage period, the TVB-N level of some species showed fluctuations (Özyurt et al. 2007; Papadopoulos et al. 2003). TVB-N values of fishball samples during frozen storage are presented in Table 4. In this study, during the storage period, fluctuations, and significant differences ($p < 0.05$) for TVB-N values were observed between the control and treated with the plant extracts groups. The initial TVB-N value of all the groups was determined as 11.15 mg /100g and increased at the end of storage. The TVB-N values for the control group were the highest (19.43 mg /100g) ($p < 0.05$),

followed by basil (18.62 mg/100g), thyme (18.22 mg/100g), and rosemary (18.13mg/100g) at the end of storage period. TVB-N values in all groups didn't reach the maximum values, which is the refusal limits of TVB-N 35-40 mg /100g of fish and fishery products (Huss, 1995).

Table 4. Changes in TBV-N, pH and TCV contents of fish ball during frozen storage (-18°C)

Storage months	Control	Thymus	Rosemary	Basil
TVB-N (mg /100g)				
0	11.15±0.04 ^{dx}	11.15±0.04 ^{dx}	11.15±0.04 ^{dx}	11.15±0.04 ^{hx}
1	15.29±0.03 ^{cx}	13.59±0.35 ^{cy}	12.92±0.35 ^{cz}	12.57±0.02 ^{gz}
2	18.59±0.81 ^{ax}	17.89±0.37 ^{ax}	15.78±0.01 ^{by}	17.67±0.79 ^{bcx}
3	17.30±0.35 ^{bx}	15.94±0.36 ^{cy}	16.97±0.02 ^{cdy}	16.98±0.01 ^{cdx}
4	15.34±0.04 ^{cx}	15.35±0.03 ^{bx}	15.31±0.10 ^{bx}	15.16±0.44 ^{fx}
5	16.71±0.64 ^{bx}	15.56±0.42 ^{by}	15.35±0.02 ^{by}	15.79±0.80 ^{efxy}
6	17.19±0.83 ^{bx}	15.34±0.01 ^{byz}	14.87±0.82 ^{bz}	16.25±0.78 ^{dexy}
7	18.70±0.03 ^{ax}	18.17±0.68 ^{ax}	14.89±0.44 ^{by}	18.52±0.34 ^{abx}
8	18.88±0.40 ^{ax}	18.11±0.08 ^{axy}	17.69±0.83 ^{ay}	18.83±0.72 ^{axy}
9	19.27±0.83 ^{ax}	16.04±0.74 ^{by}	15.33±0.01 ^{by}	18.81±0.67 ^{ax}
10	19.43±0.03 ^{ax}	18.22±0.42 ^{ay}	18.13±0.04 ^{ay}	18.62±0.82 ^{abxy}
pH				
0	6.14±0.07 ^{gx}	6.14±0.07 ^{fx}	6.14±0.07 ^{fx}	6.14±0.07 ^{gx}
1	6.39±0.01 ^{cdx}	6.24±0.02 ^{ez}	6.19±0.04 ^{et}	6.29±0.01 ^{efy}
2	6.45±0.04 ^{abx}	6.26±0.03 ^{ez}	6.25±0.02 ^{dz}	6.32±0.02 ^{dexy}
3	6.37±0.04 ^{dex}	6.26±0.04 ^{dexy}	6.20±0.04 ^{ey}	6.34±0.05 ^{cdx}
4	6.43±0.04 ^{abcx}	6.35±0.03 ^{abyz}	6.34±0.01 ^{cz}	6.41±0.09 ^{abxy}
5	6.48±0.02 ^{ax}	6.39±0.04 ^{ay}	6.38±0.02 ^{by}	6.44±0.01 ^{ax}
6	6.45±0.20 ^{abx}	6.32±0.04 ^{bey}	6.34±0.03 ^{cy}	6.42±0.02 ^{ax}
7	6.23±0.05 ^{fz}	6.30±0.00 ^{cdy}	6.36±0.01 ^{bcx}	6.29±0.01 ^{efy}
8	6.41±0.05 ^{bcdy}	6.37±0.01 ^{ay}	6.48±0.01 ^{ax}	6.38±0.00 ^{bey}
9	6.34±0.01 ^{ey}	6.28±0.01 ^{dez}	6.37±0.03 ^{bx}	6.26±0.02 ^{fz}
10	6.18±0.04 ^{gx}	6.09±0.04 ^{gy}	5.88±0.03 ^{gz}	6.17±0.02 ^{gx}
TVC (log cfu/g)				
0	3.85±0.12 ^{ax}	3.85±0.12 ^{ax}	3.85±0.12 ^{ax}	3.85±0.12 ^{ax}
1	4.01±0.11 ^{ax}	3.58±0.12 ^{ay}	3.54±0.22 ^{ay}	3.56±0.07 ^{by}
2	4.00±0.05 ^{ax}	3.56±0.02 ^{ay}	3.46±0.26 ^{aby}	3.53±0.02 ^{by}
3	4.00±0.11 ^{ax}	3.54±0.09 ^{ay}	3.39±0.17 ^{aby}	3.50±0.17 ^{by}
4	3.69±0.09 ^{abx}	3.49±0.43 ^{abxy}	3.30±0.00 ^{aby}	3.50±0.17 ^{bxy}
5	3.60±0.00 ^{abx}	3.24±0.34 ^{aby}	3.23±0.30 ^{by}	3.39±0.00 ^{by}
6	3.47±0.00 ^{abx}	3.00±0.00 ^{bz}	3.00±0.00 ^{bz}	3.30±0.00 ^{bey}
7	3.30±0.30 ^{bx}	3.00±0.00 ^{bz}	3.00±0.00 ^{bz}	3.21±0.17 ^{bey}
8	3.30±0.00 ^{bx}	3.00±0.00 ^{bz}	3.00±0.00 ^{bz}	3.20±0.00 ^{bey}
9	3.15±0.21 ^{bx}	3.00±0.00 ^{bx}	2.97±0.35 ^{bx}	3.15±0.39 ^{bcx}
10	3.12±0.00 ^{bx}	3.00±0.00 ^{by}	3.00±0.00 ^{by}	3.06±0.01 ^{cy}

n:3, values represent mean ±SD. Different letters (a,b,c,d,e,f) in the same column show significant differences (P<0.05). Different letters (x,y,z,t) in the same row show significant differences (P<0.05).

As reported in previous studies, lower TVB-N values were found compared to the groups treated with plant extracts during storage (Kenar et al. 2010; Özyurt et al. 2012; Ozogul and Uçar 2013; Martínez et al. 2019; Shi et al. 2019). The rise in TVB-N values was significantly (P < 0.05) reduced in plant extract groups. This is due to the role of extracts used as an antimicrobial agent for bacterial growth (Sacchetti et al., 2005). Especially rosemary and thyme groups were observed to maintain low

TVB-N values during the storage period. The results suggested that the reduction of TVB-N in the samples with plant extracts can be associated with an inhibition impact of herb extracts on bacteria.

3.2.7. pH

The pH value was determined as 6.14 in all groups at the beginning of storage (Table 4). During the storage period, pH values fluctuated. There were significant differences ($p < 0.05$) between the control and plant extract groups. The highest pH values were observed at the 5th month of storage for the control (6.48), thyme (6.39), and basil (6.44) groups. At the end of the storage period, the pH values were found 6.18 for control, 6.09 for thyme, 5.88 for rosemary, and 6.17 for basil group. The results indicated that the pH value of the rosemary group was significantly lower than those of the other groups ($p < 0.05$). Similarly, Ibrahim and El-Sherif (2008) studied the effects of three extracts (black cumin, thyme, and rosemary) and their combination on frozen tilapia fillets at -18°C . They found that plant extracts retarded pH values compared to the control, although pH values increased in all groups during the storage period. It was reported that the rise in pH value might result from a raise in volatile bases including trimethylamine and ammonia formed by microbial enzymes or either endogenous (Chaijan et al., 2005) while the reduction in pH value could be caused by the acidic compounds formed during bacterial metabolism (Yi et al., 2011).

3.3. Microbiological Analyses

The initial TVC value was determined as 3.85 log cfu/g for all fish ball groups (Table 4). Plant extracts groups showed a significant difference ($p < 0.05$) in TVC among groups. The microbiological limit suggested by ICMSF, (1986) as 7 log cfu/g was not exceeded in any group during storage. With an increase in storage time, TVC showed a decrease (Table 4). The same decrease was found by Ozogul and Uçar (2013) for mackerel hamburgers with laurel, oregano, sage, and green tea extracts during frozen (-18°C) storage. Lakshmisha et al. (2008) also found that the initial TVC value in the mackerel fillet was 4.46 log cfu / g and the TVC value decreased due to the inhibition of bacterial activity during frozen storage at -18°C .

Our findings were also in accordance with the research on Atlantic mackerel fish burgers conducted by Uçak et al. (2011). In this research, it was found that especially rosemary and thyme extracts were more effective in controlling the growth of microorganisms. It could be due to the total phenolic content of plants. Bubonja-Sonje et al. (2011) measured the antioxidant and antibacterial efficacy of polyphenols derived from rosemary, cocoa, and olive oil extract. They found that the most effective antimicrobial and the antioxidant agent was rosemary extract used as a food additive. The antioxidant and antimicrobial activity of the extract of rosemary is primarily due to carnosic acid and carnosol (Moreno et al. 2006). In addition, Burt (2004) found more than 30 antimicrobial composites in oregano extracts, especially significant quantities of carvacrol.

4. CONCLUSIONS

The extracts of rosemary and thyme proved their efficacy by improving the shelf life of the frozen fish ball samples; 10 months for the rosemary and thyme and 8 months for basil and the control groups. The plant extracts with antioxidant properties maintained the sensory scores (appearance, color, and odor) of the fish ball, and the TBV-N, PV, FFA, and TBA values were lower than those of the control. In addition, the natural extracts reduced the microbial propagation since TVC was lower than that of the untreated fish ball. Therefore, plant extracts especially thyme and rosemary could be applied in the seafood industry to extend the storage period, improve the sensory attributes, control the biochemical changes and delay the deterioration of seafood since plant extracts are an easily accessible source of natural antioxidants and antimicrobials.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Scientific Research Projects of Cukurova University for their support (Project SUF2011D3). This article is a part of the first author's doctoral thesis. This study was presented as an abstract at the 2nd International Food Technology Congress, Aydın, Turkey in 2014.

FINANCIAL SUPPORT

This project was supported by the Scientific Research Projects of Cukurova University (Project SUF2011D3).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Editing: EB, YÖ; Methodology: EB, YÖ; Performing the experiment: EB, MD, YU, SDT; Data analysis: EB; Article writing: EB; Supervision: EB, YÖ. All authors approved the final draft.

ETHICAL STATEMENTS

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

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data used in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Alghazeer, R., Saeed, S., & Howell, N. K. (2008). Aldehyde formation in frozen mackerel (*Scomber scombrus*) in the presence and absence of instant green tea. *Food Chemistry*, 108(3), 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.067>
- Ali, M., Imran, M., Nadeem, M., Khan, M. K., Sohaib, M., Suleria, H. A. R., & Bashir, R. (2019). Oxidative stability and Sensoric acceptability of functional fish meat product supplemented with plant-based polyphenolic optimal extracts. *Lipids in Health and Disease*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0982-y>
- Aliakbarlu, J., & Khalili Sadaghiani, S. (2015). Effect of Avishane Shirazi (*Zataria Multiflora*) and Clove (*Syzygium Aromaticum*) Essential Oils on Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Ground Sheep Meat During Refrigerated Storage. *Journal of Food Quality*, 38(4), 240–247. <https://doi.org/10.1111/jfq.12147>
- Antonocopoulos, N. (1973). Bestimmung des flüchtigen Basenstickstoofs. In W Ludorf, V Meyer (Eds.), *Fische und Fischerzeugnisse*. Berlin, Germany: Auflage-Verlag Paul Parey.
- AOAC Method 920.153. (2002). *Ash content*. *Ash content*. In: *Official Methods of Analysis, 17th Ed*, Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC Official method 950.46. (2002). *Moisture content in meat*. In: *Official Methods of Analysis, 17th Ed*, Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOCS Method Ja 8-87. (1994). *Peroxide value*. In D. E. Firestone (Ed.), *Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society, 4th edn*. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

- AOCS Official Method Ca 5a-40. (1997). *Free fatty acids*. In D. E. Firestone (Ed.), *Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society, 5th edn.* AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.
- BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.071>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cadun, A., Kışla, D., & Çaklı, Ş. (2008). Marination of deep-water pink shrimp with rosemary extract and the determination of its shelf-life. *Food Chemistry*, 109(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.021>
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Faustman, C. (2005). Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93(4), 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.035>
- Chen, Q., Shi, H., & Ho, C. T. (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69(10), 999–1002. <https://doi.org/10.1007/BF02541065>
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology*, 21(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00059-5)
- De Abreu, D. A. P., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2011). Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants. *Food Chemistry*, 126(1), 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.048>
- de Koning, A. J., & Mol, T. H. (1991). Quantitative quality tests for frozen fish: Soluble protein and free fatty acid content as quality criteria for hake (*Merluccius capensis*) stored at –18°C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54(3), 449–458. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540316>
- Feng, X., Zhu, Y., Liu, Q., Lai, S., & Yang, H. (2017). Effects of Bromelain Tenderisation on Myofibrillar Proteins, Texture and Flavour of Fish Balls Prepared from Golden Pomfret. *Food and Bioprocess Technology*, 10(10), 1918–1930. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1963-7>
- Flores, M., Durá, M. A., Marco, A., & Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68(3), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.04.001>
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., & Prior, E. (1996). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 131–135. <https://doi.org/10.1021/jf950374p>
- Gahruie, H. H., Hosseini, S. M. H., Taghavifard, M. H., Eskandari, M. H., Golmakani, M. T., & Shad, E. (2017). Lipid oxidation, color changes, and microbiological quality of frozen beef burgers incorporated with shirazi thyme, cinnamon, and rosemary extracts. *Journal of Food Quality*, 2017, 6350156. <https://doi.org/10.1155/2017/6350156>
-

- Gao, M., Feng, L., Jiang, T., Zhu, J., Fu, L., Yuan, D., & Li, J. (2014). The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. *Food Control*, 37(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.010>
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Science and Nutrition*, 7(5), 1704–1714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>
- Guan, W., Ren, X., Li, Y., & Mao, L. (2019). The beneficial effects of grape seed, sage and oregano extracts on the quality and volatile flavor component of hairtail fish balls during cold storage at 4 °C. *Lwt*, 101, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.024>
- Hashemi Gahruie, H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>
- Hilgarth, M., Behr, J., & Vogel, R. F. (2018). Monitoring of spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 740–753. <https://doi.org/10.1111/jam.13669>
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22(4), 273–292. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>
- Huda, N., Shen, Y. H., Huey, Y. L., & Dewi, R. S. (2010). Ingredients, proximate composition, colour and textural properties of commercial Malaysian fish balls. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12), 1183–1186. <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.1183.1186>
- Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. In FAO. Fisheries Technical Paper. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/25ea9f6b-4143-5cd6-a89d-6e5000458bce/%5Cnhttp://www.fao.org/3/a-v7180e/index.html>
- Ibrahim, S. M., & El-Sherif, S. A. (2008). Effect of some plant extracts on quality aspects of frozen tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fillets. *Global Veterinaria*, 2(2), 62–66.
- ICMSF. (1986). Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. In International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, 36(1–2), 169–189. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90040-X)
- Kenar, M., Özogul, F., & Kuley, E. (2010). Effects of rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(11), 2366–2372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02414.x>
- Kivilompolo, M., Obürka, V., & Hyötyläinen, T. (2007). Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(4), 881–887. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1298-8>
- Kok, T. N., & Park, J. W. (2007). Extending the shelf life of set fish ball. *Journal of Food Quality*, 30(1), 1–27. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00103.x>
- Kuley, E., Ozogul, F., Durmus, M., Gokdogan, S., Kacar, C., Ozogul, Y., & Ucar, Y. (2012). The impact of applying natural clinoptilolite (zeolite) on the chemical, sensory and microbiological changes of vacuum packed sardine fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(9), 1977–1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03060.x>
- Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4), 1044–1050. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.011>

- Lakshmisha, I. P., Ravishankar, C. N., Ninan, G., Mohan, C. O., & Gopal, T. K. S. (2008). Effect of freezing time on the quality of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during frozen storage. *Journal of Food Science*, 73(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00876.x>
- Li, T., Li, J., Hu, W., & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138(2–3), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.092>
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.06.006>
- Lorenzo, J. M., Bedia, M., & Bañón, S. (2013). Relationship between flavour deterioration and the volatile compound profile of semi-ripened sausage. *Meat Science*, 93(3), 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.006>
- Maftoonazad, N., & Badii, F. (2012). Use of Edible Films and Coatings to Extend the Shelf Life of Food Products. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(2), 162–170. <https://doi.org/10.2174/2212798410901020162>
- Martínez, L., Castillo, J., Ros, G., & Nieto, G. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary, pomegranate and olive extracts in fish patties. *Antioxidants*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antiox8040086>
- Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)90042-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)90042-0)
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>
- Ozogul, Y., & Uçar, Y. (2013). The Effects of Natural Extracts on the Quality Changes of Frozen Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) Burgers. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1550–1560. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0794-9>
- Özyurt, Gülsün, Kuley, E., Balıkçı, E., Kaçar, Ç., Gökdogan, S., Etyemez, M., & Özogul, F. (2012). Effect of the Icing with Rosemary Extract on the Oxidative Stability and Biogenic Amine Formation in Sardine (*Sardinella aurita*) During Chilled Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2777–2786. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0586-7>
- Özyurt, Gulsun, Özkütük, A. S., & Polat, A. (2011). Capability of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the oxidative stability of cooked sea bream (*Sparus aurata*) during frozen storage. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 6(2), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s00003-010-0624-9>
- Özyurt, Gülsün, Özogul, Y., Özyurt, C. E., Polat, A., Özogul, F., Gökbulut, C., Ersoy, B., & Küley, E. (2007). Determination of the quality parameters of pike perch Sander *luciooperca* caught by gillnet, longline and harpoon in Turkey. *Fisheries Science*, 73(2), 412–420. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01349.x>
- Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20(4), 411–420. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00148-X)
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Petricorena, Z. C. (2015). Chemical Composition of Fish and Fishery Products. *Handbook of Food Chemistry*, 403–435. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5_12

- Pezeshk, S., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2011). Effects of Turmeric, Shallot Extracts, and Their Combination on Quality Characteristics of Vacuum-Packaged Rainbow Trout Stored at 4 ± 1 °C. *Journal of Food Science*, 76(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02242.x>
- Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M., & Sayed Tabatabaei, B. E. (2009). Genetic variability and geographic differentiation in thymus daenensis subsp. daenensis, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochemical Genetics*, 47(11–12), 831–842. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9281-z>
- Rizea, Gabrie. A. D., Popescu, M., Ionescu, D., Mihele, D., & Manea, S. (2012). Comparative determinations of antioxidant free radical scavenging polyphenols in certain natural products by HPLC methods and UV-Vis spectrophotometry. *Revista de Chimie*, 63(11), 1085–1088.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., & Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>
- Rocío Teruel, M., Garrido, M. D., Espinosa, M. C., & Linares, M. B. (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*, 172, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.018>
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89(3), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.041>
- Russell, N. J. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 326(1237), 595–611. <https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0034>
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Sallam, K. I., Ahmed, A. M., Elgazzar, M. M., & Eldaly, E. A. (2007). Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 102(4), 1061–1070. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.044>
- Schilling, M. W., Pham, A. J., Williams, J. B., Xiong, Y. L., Dhowlaghar, N., Tolentino, A. C., & Kin, S. (2018). Changes in the physiochemical, microbial, and sensory characteristics of fresh pork sausage containing rosemary and green tea extracts during retail display. *Meat Science*, 143, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.009>
- Seabra, L. M. J., Damasceno, K. S. F. S. C., Andrade, S. A. C., Dantas, M. M. G., Soares, N. K. M., & Pedrosa, L. F. C. (2011). Effect of rosemary on the quality characteristics of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Quality*, 34(5), 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00402.x>
- Serdaroğlu, M., & Felekoğlu, E. (2005). Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. *Journal of Food Quality*, 28(2), 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00016.x>
- Sharafati-Chaleshtori, R., Rokni, N., Rafieian-Kopaei, M., Drees, F., & Salehi, E. (2015). Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(4), 817–826.
- Shi, J., Lei, Y., Shen, H., Hong, H., Yu, X., Zhu, B., & Luo, Y. (2019). Effect of glazing and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on preservation of mud shrimp (*Solenocera melantho*) during frozen storage. *Food Chemistry*, 272(August 2018), 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.056>
-

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skendi, A., Irakli, M., & Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.02.001>
- Stanciu, G., Cristache, N., Lupsor, S., & Dobrinas, S. (2017). Evaluation of antioxidant activity and total phenols content in selected spices. *Revista de Chimie*, 68(7), 1429–1434. <https://doi.org/10.37358/rc.17.7.5689>
- Sun, L., Sun, J., Thavaraj, P., Yang, X., & Guo, Y. (2017). Effects of thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during cold storage. *Food Chemistry*, 224, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.097>
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37(1), 44–48. <https://doi.org/10.1007/BF02630824>
- Tee, E. T., & Siow, L. F. (2014). Physical and Sensory Properties of Frozen Spanish Mackerel (*Scomberomorus guttatus*) Fish Balls Added with Cryoprotectants. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3442–3454. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1348-0>
- Tironi, V. A., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2010). Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.007>
- Uçak, I., Özogul, Y., & Durmuş, M. (2011). The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(6), 1157–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02610.x>
- Ulewicz-Magulska, B., & Wesolowski, M. (2019). Total Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Herbs Used for Medical and Culinary Purposes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 61–67. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0699-5>
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Alvarenga, J. F. R., Martinez-Huelamo, M., Leal, L. N., & Lamuela-Raventós, R. M. (2015). Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: Caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Science and Technology*, 35(1), 189–195. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6580>
- Wilson, B. G., & Bahna, S. L. (2005). Adverse reactions to food additives. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 95(6), 499–507. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61010-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61010-1)
- Yeşilsu, A. F., & Özyurt, G. (2019). Oxidative stability of microencapsulated fish oil with rosemary, thyme and laurel extracts: A kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, 240(14), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.021>
- Yi, S., Li, J., Zhu, J., Lin, Y., Fu, L., Chen, W., & Li, X. (2011). Effect of tea polyphenols on microbiological and biochemical quality of Collichthys fish ball. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1591–1597. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4352>
- Zhang, Ying, Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.038>
- Zhang, Yuxiang, Wei, J., Yuan, Y., Chen, H., Dai, L., Wang, X., & Yue, T. (2019). Bactericidal effect of cold plasma on microbiota of commercial fish balls. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52(December 2018), 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.019>
- Zhao, Y., Kong, H., Zhang, X., Hu, X., & Wang, M. (2019). The effect of Perilla (*Perilla frutescens*) leaf extracts on the quality of surimi fish balls. *Food Science and Nutrition*, 7(6), 2083–2090. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1049>

- Zheljazkov, V. D., Callahan, A., & Cantrell, C. L. (2008). Yield and oil composition of 38 basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions grown in Mississippi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 241–245. <https://doi.org/10.1021/jf072447y>
- Złotek, U., Szychowski, K. A., & Świeca, M. (2017). Potential in vitro antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and anticancer effect of arachidonic acid-elicited basil leaves. *Journal of Functional Foods*, 36, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.024>
-

Monitoring of Enzymatic Activity in the Gastrointestinal Tract of Black Sea Salmon (*Salmo labrax* Pallas, 1814)

Karadeniz Alabalığının (*Salmo labrax* Pallas, 1814) Gastrointestinal Sistemindeki Enzimatik Aktivitenin İzlenmesi

Osman Tolga Özel^{1,*}, Selin Ertürk Gürkan²

¹Central Fisheries Research Institute, Department of Aquaculture, Trabzon, Türkiye

²Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Art and Science, Department of Biology, Çanakkale, Türkiye

*Corresponding author: osmantolgaozel@gmail.com

Received: 08.11.2021

Accepted: 27.01.2022

Published: 01.06.2022

How to Cite: Özel, O. T. & Ertürk Gürkan, S. (2022). Monitoring of enzymatic activity in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon (*Salmo labrax* Pallas, 1814). *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 236-246. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1020183>

Abstract: In this study, it was aimed to determine the activity of digestive enzymes at different time intervals after-feeding throughout the gastrointestinal tract of Black Sea salmon (*Salmo labrax*). The study was conducted at freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). The fish were fed by hand up to satiation for 60 days with diets containing 46.25% protein and 14.90% lipid. The fish gastrointestinal tract including stomach, anterior (with pyloric caeca), middle and posterior sections were taken together at 45th minute, 3rd, 6th, 12th, 24th, 48th, 72nd, and 96th hours post-feeding. The tissues were stored at -80°C until analyzed. In terms of digestive enzyme activity, at the end of the study, anterior and middle intestine sections had the highest level at 3rd-hour post-feeding. Similarly, pepsin, trypsin, and lipase in the stomach had the highest activity at 3rd-hour post-feeding. However, amylase in the stomach was the highest level at 45th minute and 3rd-hour post-feeding. At 3rd-hours post-feeding, the pepsin in the stomach, the trypsin, and lipase in the anterior section, and the amylase in the middle intestine had the highest levels. Moreover, the correlations between these enzymes were strong in the positive direction. Also, the difference in pepsin, trypsin, amylase, and lipase levels in the samples dissected at different time intervals after feeding was statistically significant. Our results revealed that stomach, anterior, middle, and posterior sections in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon had enzyme activity in the different levels, and enzyme activity of these sections changed depending on time post-feeding.

Keywords

- Aquaculture
- Digestive system
- Enzyme
- Nutrition
- Trout

Özet: Bu çalışmada, Karadeniz alabalığının (*Salmo labrax*) sindirim sistemi boyunca beslenme sonrası farklı zaman aralıklarında sindirim enzimlerinin aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma tatlısu ile çalışan kapalı devre araştırma ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Balıklar deneme boyunca %46,25 protein ve %14,90 lipit içeren yemlerle 60 gün süresince doyana kadar elle beslenmiştir. Balıkların mide, ön (pilorik kese ile birlikte), orta ve arka bağırsakları içeren sindirim kanalı, yemlemeden sonra 45. dakika, 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınmıştır. Dokular analiz edilene kadar -80°C'de saklanmıştır. Sindirim enzim aktivitesi beslenme sonrası 3. saatte ön ve orta bağırsak bölümlerinde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Benzer şekilde midedeki pepsin, tripsin ve lipaz enzimleri de beslenmeden sonraki 3. saatte en yüksek aktiviteye ulaşmıştır. Bununla birlikte, midede amilaz, beslenme sonrası 45. dakika ve 3. saatte en yüksek düzeyde bulunmuştur. Beslenme sonrası 3. saatte midede pepsin, ön bağırsakta tripsin ve lipaz ve orta kısımda amilaz en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bununla birlikte, bu enzimler arasındaki korelasyonlar pozitif yönde güçlü bulunmuştur. Ayrıca beslenme sonrası farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde pepsin, tripsin, amilaz ve lipaz düzeylerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05). Sonuçlar, Karadeniz alabalığının sindirim kanalındaki mide, ön, orta ve arka bölümlerinin farklı seviyelerde enzim aktivitesine sahip olduğunu ve bu bölümlerin enzim aktivitesinin besleme sonrası zamana bağlı olarak değiştiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler

- Yetiştiricilik
- Sindirim sistemi
- Enzim
- Besleme
- Alabalık



1. INTRODUCTION

Digestion is a necessary process using mechanical, chemical, and due to enzymatic methods with digestive enzymes released from multiple locations along the gastrointestinal tract for the catabolism and hydrolysis of ingested macronutrients into smaller molecules suitable for transport (Weinrauch et al. 2019). This process starts in the stomach and continues along the intestine. Ingested feeds are hydrolyzed into smaller size molecules, such as amino acids, simple sugars, and fatty acids produced by the hydrolysis of proteins, sugars, or lipids, respectively (Caruso et al. 2009). Understanding the digestive physiology of fish is quite important in the generate nutritional protocols that respond to the metabolic capabilities of feed utilization of fish species (Caruso et al. 2008). This is an important step for optimal nutritional values and cost-effectiveness (Barlaya et al. 2016). The utilization of nutrients in fish depends on the activities of digestive enzymes with different properties in the digestive organs (Tian et al. 2019). The activity of digestive enzymes in fish may be changed depending on the fish age, feeding type, season, temperature (Munilla-Moran and Saborido-Rey, 1996), fish size (Murtaza et al. 2016), feeding habits (Almeida et al. 2018), time of day, infestation with parasites (Solovyev et al. 2015) and intestinal morphology (Barlaya et al. 2016).

Digestive enzymes are secreted from the exocrine pancreas into the anterior section of the gastrointestinal tract (Tian et al. 2019), and their concentration and activity are more conspicuous in this section and decrease towards the posterior sections of the gastrointestinal tract (Gonzalez-Felix et al. 2018). In fish, activities of the digestive enzymes may change among the organs (Duarte et al. 2015). Different parts of the intestine do not have the same capacity for digestion and absorption of nutrients. Many digestive enzymes are limited to specific parts of the gastrointestinal tract (Barlaya et al. 2016). The relative activities of digestive enzymes between sections of the intestine differ from one enzyme to another (Deguara et al. 2003). The determination of digestive enzyme activities including proteases, carbohydrases, and lipases may provide information about the digestive capacity and the efficiency of species (Caruso et al. 2009). The digestive enzymes and their activities present in various sections of the intestine is quite important for understanding digestion mechanism and adaptation to nutrition in fish species (Iqbal et al. 2018). Therefore, we aimed to monitor the activities of digestive enzymes in various sections of the gastrointestinal tract of Black Sea salmon.

2. MATERIAL and METHODS

2.1. Fish and Maintenance

This study was performed at freshwater recirculating aquaculture systems (RAS) at Central Fisheries Research Institute, Trabzon, Turkey. Seventh filial generation (F7) of Black Sea salmon (*Salmo labrax*, Pallas, 1814) was used in the study. Fish were fed with commercial feeds before the experiment. Afterward, the fish were fed with a trial diet for 60 days (Table 1). Trial fish were placed randomly in 400 L (100x100 cm square with depths 40 cm) fiberglass tanks. The study was performed as triplicates containing 35 fish per trial tank. The fish were fed by hand three times a day at 08:00, 12:00, and 16:00 for 60 days up to apparent satiation. The diet used in the study was shown in Table 1. Water temperature (mean, 15.40±0.73°C), pH (mean, 7.32±0.25) and oxygen (mean, 8.48±0.57 mg/L) were recorded three times a day. Ammonia (mean, 0.04±0.02 mg/L) was measured weekly. Water change in tanks was 22 times in a day. The water supplied to the trial tanks was passed through 100, 25, 10, and 5 µ filters from the system, respectively. Trial tanks were cleaned by siphoning daily. 12 hours of darkness and 12 hours of light were applied during the experimental period.

Table 1. Formulation and proximate composition of the base diet

Ingredients	%
Fish meal	31
Soybean meal	20
Wheat gluten	6
Pea protein	12
Sunflower seed meal	7
Wheat flour	12.5
Fish oil	11
Vitamin mix ¹	0.22
Mineral mix ²	0.16
Vit C	0.12
Proximate composition	
Crude protein	46.25
Crude lipid	14.90
Crude ash	9.28
Moisture	6.10

¹Supplied the following: inositol 300 mg, biotin (Vit B7) 200 mg, tocopherol (Vit E) 200 mg, calcium pantothenate (Vit B5) 50 mg, riboflavin (Vit B2) 30 mg, pyridoxine (Vit B6) 20 mg, thiamine (Vit B1) 20 mg, menadione (Vit K3) 12 mg, niacin (Vit B3) 6 mg, retinol (Vit A) 0.6 mg, folic acid (Vit B9) 0.5 mg, cholecalciferol (Vit D3) 0.05 mg, cobalamin (Vit B12) 0.05 mg.

²Supplied the following: ferric sulfate heptahydrate (FeSO₄·7H₂O) 50 mg, manganese (II) oxide (MnO) 50 mg, zinc oxide (ZnO) 50 mg, copper sulfate pentahydrate (CuO₄S·5H₂O) 10 mg, calcium iodate (Ca₂I₂O₆) 0.8 mg, cobalt carbonate hexahydrate (CoCO₃·6H₂O) 0.15 mg, sodium selenite (Na₂SeO₃) 0.15 mg.

2.2. Enzyme activity

The gastrointestinal tract samples from the fish (250.67±44.09 g) were taken together at the 45th minute, 3rd, 6th, 12th, 24th, 48th, 72nd, and 96th hours post-feeding. Tissue samples were stored at -80°C until analyzed. Then, they were brought to Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Arts and Science, Biology Department, Water Ecology Laboratory in the cold chain (in the ice cube). The stomach, anterior (with pyloric ceace), middle, and posterior intestines were examined separately. It was necessary to prepare homogenate from the digestive tract to be used and to obtain cytosolic fractions to analyse the digestive enzymes. The tissues taken were weighed and homogenized with liquid nitrogen and then taken into homogenization buffer (0.05 phosphate buffer pH 7.4). The measurements were settled following the preparation of homogenates. The specific activity of each enzyme evaluated in the study was measured spectrophotometrically. Obtained values were proportioned to the protein value in homogenate, and Bradford (1976) method was used to calculate the amount of protein.

For the measurement of trypsin enzyme activity, Bieth and Metais (1968), the analysis method used in their study, and Na-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) were used as substrate. Enzyme activities of the samples were measured in a spectrophotometer at 253 nm wavelength for 5 minutes. Measurement of pepsin enzyme activity was performed using a revised version of the analysis method used by Worthington (1982) by Infante and Cahu (1994). Besides, bovine haemoglobin was used as a substrate. Samples were measured at a wavelength of 280 nm for 5 minutes. Monitoring the amylase enzyme activity depended on the study conducted by Tseng et al. (1982) which they used soluble starch as a substrate. Samples were measured at 540 nm wavelength for 5 minutes. To measure lipase enzyme activity, α -naphthyl caprylate was used as the substrate, and the analysis method was used in the study conducted by Versaw et al. (1989). The measurements were done at 490 nm wavelength for 10 minutes.

2.3. Data analyses

The statistical analyses were carried out SPSS 21.0 software. Normality of data and homogeneity of variances was tested using Kolmogorov Smirnov and Levene tests, respectively. The results were compared using parametric tests (One-Way ANOVA and Tukey's sub-test) and/or non-parametric tests (Kruskal-Wallis test). Duncan's multiple range test was performed for the significance of differences of means between groups. The correlation between enzyme levels was calculated by Pearson correlation. The significant differences among concentrations were presented with different letters or figures. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyse whether there was a difference between the activities of digestive enzymes in different sections of the digestive tract and different periods. A significance level α was set at 0.05 for all analyses except correlation analysis.

3. RESULTS

The enzymatic activity in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon fed at optimal temperature was shown in Table 2 and Table 3. The digestive enzyme activities of fish changed depending on time post-feeding and sections of the gastrointestinal tract. The difference in amylase enzyme activity in samples dissected at different time intervals after feeding was statistically significant ($F=23.65$; $df=7$; $p<0.05$) and intestinal amylase activity decreased after 6 hours post-feeding, except for the posterior part of the intestine (Table 3). The difference in amylase enzyme levels measured in different parts of the gastrointestinal tract of the samples was also statistically significant ($F=28.1$; $df=3$; $p<0.05$) (Table 2). When both time and different gastrointestinal tract sections were evaluated together, the statistical difference was significant in terms of amylase enzyme level ($F=3.19$; $df=21$; $p<0.05$).

According to the trypsin enzyme activity results, the highest trypsin activity was seen in the anterior. This was followed by the middle, posterior, and stomach, respectively ($F=160.54$; $df=3$; $p<0.05$) (Table 2). Although time-dependent changes between trypsin levels were statistically significant, ($F=184.8$; $df=7$; $p<0.05$) There were minor differences in trypsin activity in all sections at 72nd and 96th hours after feeding and were not statistically significant (Table 3). When the temporal and regional changes in trypsin enzyme level were evaluated together, the differences were statistically significant ($F=11.5$; $df=21$; $p<0.05$).

Pepsin enzyme in the stomach, front and middle reached the highest activity at the 3rd and 6th hours after feeding, followed by feeding at the 45th-minute and 12th-hour, respectively. The highest pepsin activity in the gastrointestinal tract was obtained in the stomach (Table 2). Differences in pepsin enzyme levels in different parts of the gastrointestinal tract ($F=302$; $df=3$; $p<0.05$) and differences in pepsin values measured at different times after feeding ($F=335.4$; $df=3$; $p<0.05$) were also statistically significant.

The highest lipase activity in the stomach and anterior sections was observed at the 3rd hour after feeding with very small differences. Lipase activity in the foregut was higher at the 3rd hour after feeding than in other sections. Lipase enzyme levels were also observed in different digestion sections ($F=40.1$; $df=3$; $p<0.05$) and at different times ($F=65.84$; $df=7$; $p<0.05$) were statistically different.

Table 1. The enzymatic course of the gastrointestinal tract of Black Sea salmon, U mg⁻¹

Sections	Pepsin	Trypsin	Amylase	Lipase
45th minute				
Stomach	0.65±0.01 ^a	0.21±0.02 ^c	0.52±0.05 ^a	0.08±0.01 ^{ab}
Anterior	0.50±0.02 ^b	0.57±0.03 ^a	0.60±0.03 ^a	0.10±0.01 ^a
Middle	0.35±0.03 ^c	0.47±0.03 ^b	0.61±0.02 ^a	0.09±0.01 ^{ab}
Posterior	0.19±0.03 ^d	0.23±0.03 ^c	0.12±0.02 ^b	0.05±0.01 ^b
3rd hour				
Stomach	0.79±0.02 ^a	0.25±0.02 ^d	0.47±0.03 ^c	0.10±0.01 ^b
Anterior	0.61±0.03 ^b	0.68±0.05 ^a	0.61±0.02 ^b	0.14±0.01 ^a
Middle	0.44±0.02 ^c	0.54±0.04 ^b	0.73±0.02 ^a	0.10±0.01 ^b
Posterior	0.23±0.02 ^d	0.36±0.03 ^c	0.16±0.01 ^d	0.04±0.01 ^c
6th hour				
Stomach	0.73±0.01 ^a	0.25±0.01 ^d	0.41±0.03 ^c	0.08±0.01 ^a
Anterior	0.56±0.02 ^b	0.63±0.03 ^a	0.54±0.03 ^b	0.11±0.01 ^a
Middle	0.41±0.03 ^c	0.52±0.03 ^b	0.67±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a
Posterior	0.24±0.03 ^d	0.33±0.02 ^c	0.14±0.02 ^d	0.04±0.01 ^b
12th hour				
Stomach	0.57±0.01 ^a	0.20±0.02 ^c	0.37±0.04 ^a	0.06±0.01 ^{ab}
Anterior	0.47±0.02 ^b	0.53±0.03 ^a	0.42±0.04 ^a	0.08±0.01 ^a
Middle	0.29±0.03 ^c	0.44±0.04 ^b	0.36±0.05 ^a	0.07±0.01 ^a
Posterior	0.15±0.02 ^d	0.26±0.02 ^c	0.09±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b
24th hour				
Stomach	0.32±0.02 ^a	0.12±0.01 ^c	0.23±0.02 ^a	0.05±0.01
Anterior	0.28±0.02 ^a	0.35±0.03 ^a	0.27±0.03 ^a	0.06±0.01
Middle	0.20±0.01 ^b	0.28±0.03 ^b	0.29±0.03 ^a	0.04±0.01
Posterior	0.12±0.02 ^c	0.18±0.01 ^c	0.06±0.01 ^b	0.03±0.00
48th hour				
Stomach	0.18±0.02 ^{ab}	0.09±0.00 ^c	0.17±0.01 ^a	0.03±0.00
Anterior	0.21±0.03 ^a	0.21±0.02 ^a	0.18±0.02 ^a	0.04±0.01
Middle	0.14±0.02 ^{bc}	0.18±0.02 ^{ab}	0.19±0.02 ^a	0.03±0.01
Posterior	0.09±0.01 ^c	0.15±0.02 ^b	0.05±0.01 ^b	0.02±0.00
72nd hour				
Stomach	0.07±0.02 ^b	0.08±0.01	0.06±0.02	0.02±0.00
Anterior	0.12±0.02 ^a	0.07±0.02	0.10±0.02	0.03±0.00
Middle	0.09±0.00 ^{ab}	0.11±0.02	0.11±0.01	0.03±0.00
Posterior	0.07±0.01 ^b	0.06±0.01	0.09±0.02	0.02±0.00
96th hour				
Stomach	0.05±0.01 ^b	0.05±0.00	0.04±0.01	0.02±0.00
Anterior	0.07±0.00 ^a	0.03±0.01	0.06±0.01	0.03±0.00
Middle	0.06±0.01 ^{ab}	0.05±0.01	0.06±0.01	0.02±0.00
Posterior	0.05±0.01 ^b	0.03±0.01	0.05±0.01	0.02±0.00

Mean values in a column with different superscripts were significantly different at p<0.05. Values are given as means with standard errors (n=5). Each time was evaluated separately.

Table 2. Temporal variation of the enzymatic activity in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon, U mg⁻¹

Time	Pepsin	Trypsin	Amylase	Lipase
Stomach				
45 th minute	0.65±0.01 ^c	0.21±0.02 ^b	0.52±0.05 ^a	0.08±0.01 ^b
3 rd hour	0.79±0.02 ^a	0.25±0.02 ^a	0.47±0.03 ^{ab}	0.10±0.01 ^a
6 th hour	0.73±0.01 ^b	0.25±0.01 ^a	0.41±0.03 ^{bc}	0.08±0.01 ^b
12 th hour	0.57±0.01 ^d	0.20±0.02 ^b	0.37±0.04 ^c	0.06±0.01 ^c
24 th hour	0.32±0.02 ^e	0.12±0.01 ^c	0.23±0.02 ^d	0.05±0.01 ^{cd}
48 th hour	0.18±0.02 ^f	0.09±0.00 ^c	0.17±0.01 ^d	0.03±0.00 ^{de}
72 nd hour	0.07±0.02 ^g	0.08±0.01 ^{cd}	0.06±0.02 ^e	0.02±0.00 ^e
96 th hour	0.05±0.01 ^g	0.05±0.00 ^d	0.04±0.01 ^e	0.02±0.00 ^e
Anterior				
45 th minute	0.50±0.02 ^{bc}	0.57±0.03 ^{bc}	0.60±0.03 ^a	0.10±0.01 ^{bc}
3 rd hour	0.61±0.03 ^a	0.68±0.05 ^a	0.61±0.02 ^a	0.14±0.01 ^a
6 th hour	0.56±0.02 ^{ab}	0.63±0.03 ^{ab}	0.54±0.03 ^a	0.11±0.01 ^b
12 th hour	0.47±0.02 ^c	0.53±0.03 ^c	0.42±0.04 ^b	0.08±0.01 ^c
24 th hour	0.28±0.02 ^d	0.35±0.03 ^d	0.27±0.03 ^c	0.06±0.01 ^d
48 th hour	0.21±0.03 ^e	0.21±0.02 ^e	0.18±0.02 ^d	0.04±0.01 ^{de}
72 nd hour	0.12±0.02 ^f	0.07±0.02 ^f	0.10±0.02 ^e	0.03±0.01 ^e
96 th hour	0.07±0.00 ^f	0.03±0.01 ^f	0.06±0.01 ^e	0.03±0.01 ^e
Middle				
45 th minute	0.35±0.03 ^b	0.47±0.03 ^{ab}	0.61±0.02 ^b	0.09±0.01 ^a
3 rd hour	0.44±0.02 ^a	0.54±0.04 ^a	0.73±0.02 ^a	0.10±0.01 ^a
6 th hour	0.41±0.03 ^a	0.52±0.03 ^{ab}	0.67±0.02 ^{ab}	0.09±0.01 ^a
12 th hour	0.29±0.03 ^b	0.44±0.04 ^b	0.36±0.05 ^c	0.07±0.01 ^a
24 th hour	0.20±0.01 ^c	0.28±0.03 ^c	0.29±0.03 ^c	0.04±0.01 ^b
48 th hour	0.14±0.02 ^d	0.18±0.02 ^d	0.19±0.02 ^d	0.03±0.01 ^b
72 nd hour	0.09±0.00 ^{de}	0.11±0.02 ^{de}	0.11±0.01 ^e	0.03±0.00 ^b
96 th hour	0.06±0.01 ^e	0.04±0.01 ^e	0.06±0.01 ^e	0.02±0.00 ^b
Posterior				
45 th minute	0.19±0.03 ^{ab}	0.23±0.03 ^{bc}	0.12±0.02 ^{ab}	0.05±0.01 ^a
3 rd hour	0.23±0.02 ^a	0.36±0.03 ^a	0.16±0.01 ^a	0.04±0.01 ^{ab}
6 th hour	0.24±0.03 ^a	0.33±0.02 ^a	0.14±0.02 ^{ab}	0.04±0.01 ^{ab}
12 th hour	0.15±0.02 ^{bc}	0.26±0.02 ^b	0.09±0.01 ^{bc}	0.04±0.01 ^{abc}
24 th hour	0.12±0.02 ^{cd}	0.18±0.01 ^{cd}	0.06±0.01 ^{bc}	0.03±0.00 ^{bcd}
48 th hour	0.09±0.01 ^{cde}	0.15±0.02 ^d	0.05±0.01 ^c	0.02±0.00 ^{cd}
72 nd hour	0.07±0.01 ^{de}	0.06±0.01 ^e	0.09±0.02 ^c	0.02±0.00 ^{cd}
96 th hour	0.05±0.01 ^e	0.03±0.01 ^e	0.05±0.01 ^c	0.02±0.00 ^d

Mean values in a column with different superscripts were significantly different at p<0.05. Values are given as means with standard errors (n=5). Each section was evaluated separately.

It was determined that the correlation between the time-dependent changes of digestive enzyme levels in different parts of the gastrointestinal tract was significant and strong in a positive direction (Table 3).

Table 3. The correlation between time-dependent change of digestive enzyme levels in digestive tract section

Enzymes	Pepsin	Trypsin	Amylase	Lipase
Pepsin		0.6**	0.64**	0.8**
Trypsin	0.6**		0.63**	0.82**
Amylase	0.64**	0.63**		0.67**
Lipase	0.8**	0.82**	0.67**	

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

4. DISCUSSION

We preferred to use the anterior, middle, and posterior sections of the fish intestine when evaluating the studies conducted by the researchers (Albrecht et al., 2001; Deguara et al., 2003; Khojasteh et al., 2009; Deshmukh et al., 2015; Bocina et al., 2017; Gioda et al., 2017; Tian et al., 2019).

The increase in digestive enzyme activities post-feeding indicated that enzyme secretion was stimulated by the presence of nutrients in the gastrointestinal tract (Caruso et al. 2008). In our study, the activities of digestive enzymes in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon were found at different levels at all gastrointestinal sections including the stomach, and significantly increased post-feeding. Pepsin enzyme is active in fish with stomach, but not in stomachless fish and Mediterranean fish (Susilo et al. 2018). Deguara et al. (2003) reported that the activity of pepsin in the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) was only present in the stomach. Whereas, in our study, the activity of pepsin enzymes was observed even in the anterior, middle, and posterior sections of the intestine besides the stomach. Additionally, the pepsin activity in the gastrointestinal tract of the *Rhamdia quelen* and *Pimelodus maculatus*, which are omnivorous species, was highest in the stomach (Almeida et al. 2018). A similar result was obtained in our study. This condition started to change at the 24th-hour post-feeding, and it changed in favor of the anterior part at 72nd and 96th hours post-feeding. This can be explained by the fact that the digestive activity in the stomach decreases depending on time and the enzymatic activity continues in this section for a while as the digestive contents are pushed into the anterior intestine over time. The trypsin activity in the intestine of *Pimelodus maculatus* was higher compared to the stomach (Duarte et al. 2015). Similarly, the activity of the trypsin enzyme of the gilthead sea bream was significantly lower in the stomach than in other sections of the intestine (anterior, middle, and posterior) (Deguara et al. 2003). A similar result was obtained in our study. In a previous study, Barlaya et al. (2016) reported that the activity of trypsin enzyme in the anterior intestine was higher than middle and posterior intestine (Coccia et al. 2011). In an additional study, Gioda et al. (2017) reported that the trypsin activity was highest in the anterior for *Ctenopharyngodon idella* (Herbivore), in the middle intestine for *Leporinus obtusidens* (Omnivore), in the posterior intestine for *Rhamdia quelen* (Omnivore). However, trypsin was highest in all intestine portions for *Hoplias malabaricus* (Carnivore). In our study, the highest trypsin activity was obtained in the anterior intestine until the 48th hour post-feeding, and this course of activity remained the same in all sections at the 72nd and 96th hours. Tian et al. (2019) found that the trypsin activity in anterior and middle sections of the intestine in carp (*Gymnocypris przewalskii*) were maximum levels at 2nd-hour post-feeding, and then to the basic level at 8 hour after feeding. Caruso et al. (2008) reported that the activity of trypsin enzyme in the intestine of European eel (*Anguilla anguilla*) reached its highest level 8th hour post-feeding, and the activity level remained unchanged until 24th hours post-feeding. Amylase enzyme in fish is localized throughout the gastrointestinal tract (Barlaya et al. 2016). The amylase enzyme activity was higher in the anterior and middle intestines for *Ctenopharyngodon idella* (Herbivore), in the anterior intestine for *Leporinus obtusidens* (Omnivore), but very low in all intestine portions for *Hoplias malabaricus* (Carnivore) (Gioda et al. 2017). In our study, while the amylase activity was highest in the middle intestine at 3th and 6th hours post-feeding, there was no difference in

the stomach, anterior and middle sections as the time passed post-feeding was prolonged. Fountoulaki et al. (2005) reported that amylase activity in the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) increased significantly at 5 h post-feeding. Tian et al. (2019) found that the amylase activity in the anterior section of the intestine in carp (*Gymnocypris przewalskii*) were maximum levels at the 2nd hour post-feeding, and then decreased to the basic level at 6th hour post-feeding. In a previous study, Barlaya et al. (2016) reported that the activity of amylase enzyme in the anterior intestine of Indian major carp (*Labeo rohita*) was higher than in the middle and posterior intestine. In an additional study, Coccia et al. (2011) reported that amylase activity, the highest among carbohydrates, was the highest in the intestine as compared to the stomach in the Crayfish (*Cherax albidus*). The activity of the amylase enzyme was similar to each other in the anterior, middle, and posterior sections of the intestine, whereas had significantly lower activity in the stomach (Deguara et al. 2003). In our study, the posterior section of the intestine of Black Sea salmon had the lowest amylase activity until 48th hour post-feeding. Also, our results with the activity course of the amylase in the stomach were consistent with the results of Caruso et al. (2008) found that the amylase activity in the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*) was progressively decreased until 24th hours post-feeding. Similar to our study, Weinrauch et al. (2019) reported that lipase activity was determined at all gastrointestinal sections and was significantly higher in the anterior section when compared to the posterior section. Lipase activity of *Cherax albidus* was higher in the intestine compared to the gastric juice (Coccia et al. 2011). Moreover, lipase enzyme activity in the posterior intestine of *Labeo rohita* was higher than in the anterior section (Iqbal et al. 2018). However, the activity of lipase enzyme in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*.) was higher in the anterior section as compared to pseudostomach and posterior intestine (Klahan et al. 2009). The lipase enzyme in the anterior intestine and pyloric caeca had more activity in the sections of the gastrointestinal tract of *Totoaba macdonaldi* (Gonzalez-Felix et al. 2018). In our study, while lipase activity was the highest level in the anterior section at the 3rd-hour post-feeding, there were no differences in the stomach, anterior and middle sections as the time passed post-feeding was prolonged. Tian et al. (2019) reported that the activity lipase enzyme in the anterior section of the intestine in carp (*Gymnocypris przewalskii*) were maximum levels at 2nd-hour post-feeding, and then decreased to the basic level at 6th-hour post-feeding. Moreover, Caruso et al. (2008) reported that lipase activity in the intestine of European eel (*Anguilla anguilla*) was highest at 8th-hour post-feeding, and progressively decreased over time.

5. CONCLUSION

To conclude, pepsin activity was at the highest level in the stomach and gradually decreased towards the end of the gastrointestinal tract. The amylase enzyme in the stomach was the enzyme with the highest activity after pepsin among the enzymes studied, and its activity in the stomach was higher than the posterior section. Trypsin enzyme was more intensely secreted in the anterior section. This was followed by the middle intestine. A similar conclusion can also be said for the lipase enzyme.

It can be said that protein, carbohydrate and lipid digestion in the Black sea salmon begins in the stomach, and the anterior intestine contributed more to the digestion of nutrients. Also, the response of digestive enzyme activity in the gastrointestinal tract of Black Sea salmon to feeding was quite fast. Indeed, digestive enzyme activity reached the highest levels at 3rd-hour post-feeding. However, enzyme activities decreased progressively by time after 3rd-hour post-feeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out within the project named "Investigation of possibilities of using some phytobiotic added feeds in feeding of Black Sea trout "

FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by General Directorate of Agricultural Research and Policies, TAGEM/HAYSUD/2017/A11/P-01/3.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

Both of the authors equally contributed to the present study.

ETHICAL STATEMENT

This study was approved by the Central Fisheries Research Institute Animal Experiments Local Ethics Committee (2017/1).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data is not shared.

REFERENCES

- Albrecht, M. P., Ferreira, M. F. N., & Caramaschi, E. P. (2001). Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *Journal of Fish Biology*. 58, 419–430. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1462>
- Almeida, A.P.G., Zardo, E.L., Toni, C., Behr, E.R., da Silv, L.P., Vieira, J.P., Loro, V.L., & Baldissertotto, B. (2018). Composition of gastrointestinal content, protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (*Teleostei: Actinopterygii*) with two different feeding habits. *Zoologia*. 35, e13286. <https://doi.org/10.3897/zoologia.35.e13286>
- Barlaya, G., Sridhar, N., Kushwaha, J. P., & Gangadhar, B. (2016). Digestive enzyme activities in different size groups and segments of the digestive tract in *labeo rohita* (day, 1878). *Journal of Aquaculture & Marine Biology*. 4(5).
- Bieth, J. & Metais, P. (1968). The simultaneous presence of trypsin and trypsin inhibitors in some pathological effusions. *Clinica Chimica Acta*, 22, 639-642.
- Bocina I, Santic Z, Restovic I, & Topic S. 2017. Histology of the digestive system of the garfish *Belone belone* (Teleostei: Belonidae). *The European Zoological Journal*. 84(1), 89-95. <https://doi.org/10.1080/11250003.2016.1276977>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Caruso, G., Denaro, M. G., & Genovese, L. (2008). Temporal changes in digestive enzyme activities in the gastrointestinal tract of European eel (*Anguilla anguilla*) (Linneo 1758) following feeding. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 41(4), 215-228, <https://doi.org/10.1080/10236240802492931>
- Caruso, G., Denaro, M. G., & Genovese, L. (2009). Digestive Enzymes in Some Teleost Species of Interest for Mediterranean Aquaculture. *The Open Fish Science Journal*, 2, 74-86.
- Coccia, E., Varricchio, E., & Paolucci, M. (2011). Digestive Enzymes in the Crayfish *Cherax albidus*: Polymorphism and Partial Characterization. *International Journal of Zoology*, 2011, 310371. <https://doi.org/10.1155/2011/310371>
- Deguara, S., Jauncey, K., & Agius, C. (2003). Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*. 62, 1033–1043. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00094.x>

- Deshmukh M. R., Chirde S. G., & Gadhikar Y. A. (2015). Histological and histochemical study on the stomach and intestine of catfish *heteropneustes fossilis* (bloch 1794). *G.J.B.A.H.S.* 4(1), 16-23.
- Duarte, S., Bemquerer, M., & Araújo, F. G. (2015). Enzymatic Activity in the Gastrointestinal Tract of *Pimelodus maculatus* (Teleostei, Siluriformes) in Two Neotropical Reservoirs with Different Trophic Conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 58(4) 605-612.
- Fountoulaki, E., Alexis, M. N., Nengas, I., & Venou, B., (2005). Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 36, 1243–1251.
- Gioda, C. R., Preto, A., Freitas, C. S., Leitemperger, J., Loro, V. L., Lazzari, R., Lissner, L. A., Baldisserotto, B. & Salbego, J. (2017). Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural*, Santa Maria, 47(3), e20160113. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160113>
- Gonzalez-Felix, M. L., Santana-Bejarano, E. B., Perez-Velazquez, M., & Villalba-Villalba, A. G. (2018). Partial characterization, quantification and activity of pancreatic lipase in the gastrointestinal tract of *Totoaba macdonaldi*. *Archives of Biological Sciences.*, 70(3), 489-496. <https://doi.org/10.2298/ABS180202009G>
- Infante, J. Z. & Cahu, C. L. (1994). Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109, 209-212.
- Iqbal, K.J., Ashraf, M., Javid, A., Chaudhry, M.S., Khan, N., Majeed, H., & Abbas, F. (2018). Effect of different feed ingredients on digestive enzymes activity and on the histology of liver and intestine in *Labeo rohita* Hamilton, 1822. *Indian Journal of Fisheries*, 65(4): 93-101. <https://doi.org/10.21077/ijf.2018.65.4.62647-11>
- Khojasteh S. M. B., Sheikhzadeh F., Mohammadnejad D., & Azami A. (2009). Histological, Histochemical and Ultrastructural Study of the Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Applied Sciences Journal*, 6(11), 1525-1531.
- Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., & Engkagul, A. (2009). Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Kasetsart Journal - Natural Science*, 43, 143 - 153.
- Munilla-Moran, R., & Saborido-Rey, F. (1996). Digestive Enzymes in Marine Species. I. Proteinase Activities in Gut from Redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(2), 395-402.
- Murtaza, M., Abdullah, S., Hassan, W., Abbas, K., Naz, H., & Zia, M. A. (2016). Studies on amylase and lipase activity in fishes fed with diet containing different feed ingredients. *Punjab University Journal of Zoology*, 31 (2), pp. 165-169.
- Solovyev, M.M., Kashinskaya, E.N., Izvekova, G.I., & Glupov, V.V. (2015). pH values and activity of digestive enzymes in the gastrointestinal tract of fish in lake Chany (*West Siberia*). *Journal of Ichthyology*, 55(2). 251–258.
- Susilo, U., Sukardi, P., & Affandi, R. (2018). The age dependent activities of digestive enzymes in Rasbora, *Rasbora lateristriata* Blkr., (Pisces: Cyprinidae). *Molekul*, 13(1), 80 – 91. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2018.13.1.418>
- Tian, H., Meng, Y., Li, C., Zhang, L., Xu, G., Shi, Y., Shi, J., Qi, H., & Ma, R. (2019). A study of the digestive enzyme activities in scaleless carp (*Gymnocypris przewalskii*) on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Aquaculture Reports* 13, 100174. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.10.002>
- Versaw, K. W., Cuppet, L. S., Winters, D. D., & Williams., L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54, 1557-1558.
-

- Weinrauch, A.M., Schaefer, C.M., & Goss, G.G. (2019). Activity and post-prandial regulation of digestive enzyme activity along the Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*) alimentary canal. *PLoS ONE* 14(4): e0215027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215027>
- Worthington, T. M. (1982). Pepsin enzymes and related biochemicals. Freehold, NJ: Worthington Diagnostic System Inc. Retrieved from <http://www.worthington-biochem.com/index/manual.html>
-

Orta Ege Denizi'nde Yüzer Ağ Kafes Sistemlerinde Yerleşen Makro alg ve Makro omurgasız Türler Üzerine Bir Ön Araştırma

A Preliminary Study on Macroalgae and Invertebrate Species Settling in Floating Net Cage Systems in the Central Aegean Sea

Ali Ulaş^{1,*}, Serpil Serdar¹, Şükrü Yıldırım¹, Didem Göktürk²

¹ Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Bornova, İzmir

² İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi, Laleli, İstanbul

*Sorumlu yazar: ali.ulas@ege.edu.tr

Geliş: 08.11.2021

Kabul: 21.12.2021

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Ulaş, A., Serdar, S., Yıldırım, Ş. & Göktürk, D. (2022). Orta Ege Denizi'nde yüzer ağ kafes sistemlerinde yerleşen makro alg ve makro omurgasız türler üzerine bir ön araştırma. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 247-258. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1020852>

Özet: Ocak-2015 ile Şubat 2018 tarihleri arasında Orta Ege Denizi, İzmir Körfezi güneybatısındaki Balıklıova kıyısında yer alan ağ kafes ünitelerinde yürütülen bu çalışmada, ağ kafes ünitelerinin yüzdürücü kafes, ağ ve halatlar gibi farklı bölümlerine tutunmuş makroalg ve makro omurgasızların oluşturduğu makro fouling organizmaların tanımlanması ve yoğunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Örneklemeler serbest dalış ve tüplü dalışlar ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda 9'u Mollusca, 4'ü Arthropoda ve 2'si Echinodermata filumlarına ait olan toplam 15 adet makro omurgasız ile Chlorophyta ve Rhodophyta filumlarına ait 6 adet alg türü tespit edilmiştir. *Mytilus galloprovincialis* ve *Balanus* sp. en yoğun rastlanan canlılar olarak belirlenmiş olup *Ulothrix*, *Ulva*, *Ceramium* genuslarına ait türlerin de derinliğe bağlı değişerek dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir. Deniz ekosisteminde yapay habitatlar olarak düşünülebilecek bu tip ünitelerin makro fouling açısından farklı türlere yaşam alanı oluşturduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler

- Ege Denizi
- Yüzer ağ kafes sistemi
- Makro omurgasız
- Makro alg
- Biofouling

Abstract: This study was conducted between January 2015 to February 2018 in farm cage units located in Balıklıova shores in South-west of Izmir Bay, the Aegean Sea to identify species diversity of some macroalgae and macroinvertebrates attached to different parts of cage units such as floating tubes, net, ropes and to determine their densities. Sampling studies were carried out by scuba and skin divers. A total of 15 macroinvertebrate species, 9 of which belong to the Mollusca, 4 to the Arthropoda and 2 to the Echinodermata phylum, and 6 algae species to the Chlorophyta and Rhodophyta phylum were identified. *Mytilus galloprovincialis* and *Balanus* sp. were determined as the most abundant species. The species which belong to *Ulothrix*, *Ulva*, *Ceramium* genus were also observed their distribution depending on the depth. It has been observed that such units, which can be considered as artificial habitats in the marine ecosystem, create habitats for different species in terms of macrofouling.

Keywords

- Aegean Sea
- Floating net cage
- Macroinvertebrates
- Macroalgae
- Biofouling

1. GİRİŞ

Üst Paleolitik çağdan beri (Gordon, 1998), insanların kendi kendisinin ihtiyaçlarını gidermek amacıyla gerçekleştirdiği balıkçılık faaliyetleri, bugün dünya çapında geniş bir sektör haline gelmiştir (Hoşsucu, 1991). 3000 yıllık bir geçmişe sahip olan akuakültürün, ticari olarak 50 yıllık bir geçmişi olan kafeste balık yetiştiriciliği konusu da kısa bir zaman içinde çok büyük gelişmeler



kaydetmiştir (Beveridge,1987). Günümüzde dünya su ürünleri üretim miktarı 178,5 milyon tona ulaşmıştır. Bu üretimin 96,4 milyon tonu avcılık, 82,1 milyon tonu ise yetiştiricilik faaliyetleriyle sağlanmaktadır (FAO 2018). Yetiştiricilik konusunda yaşanan uluslararası gelişmeler ile Türkiye’de de üretim son on yılda hızlı bir gelişme göstermiştir. Yetiştiriciliğin desteklenmesi sonucunda 1971 yılında sadece bir adet olan yetiştiricilik tesisi, 2017 yılında 2853 adede ulaşmıştır. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK, 2019) verilerine göre Türkiye balıkçılık üretimi 836,524 ton olarak gerçekleşmiştir. Bu üretimin % 44,6’sı balıkçılık yoluyla, % 55,4’ü ise yetiştiricilik yoluyla üretilmiştir.

Kafesler ilk olarak balıkçılar tarafından canlı balıkları yeterli miktarlarda elde bulundurmak amacıyla kullanılmıştır. Zira bu şekilde balıkçılar pazara götürülecek miktarda balık tutana kadar yakaladıkları canlı balıkları bu kafesler içine stoklayarak pazara taşıma işinde kullanmışlardır. İlk elde tutma tipi kafesler, bitkisel yapılardan özellikle kamışlardan yapılmış olup, bunlar balık tuzaklarının ya da kuzuluk olarak adlandırılan yapıların daha küçük bir benzeri olarak dünyanın çeşitli bölgelerinde özellikle Güneydoğu Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılmıştır (Beveridge,1987). Balıkları canlı olarak saklamak için kullanılan kafesler daha sonra boy ve ağırlıkça büyüyebilecekleri besleme ve büyütme işlerinin yapıldığı canlı stoklama araçları olarak kullanılmıştır (Dikel, 2002). Modern kafes sistemlerinin gelişmesi ise özellikle salmon çiftçilik endüstrisinin gelişmesiyle beraber son 20 – 30 yıl içinde gerçekleşmiştir. Bu amaçla onshore (kıyıya yakın) sularda korunaklı alanlar için kafesler dizayn edilmiş olup, offshore (kıyı ötesi) kafeslerin gelişmesi onshore kafeslerin gelişmesine paralel olarak son 10 – 15 yılda gerçekleşmiş ve çeşitli modeller test edilmiştir (Scott ve Muir, 2000). Başlangıçta kurulan onshore işletmelerinin yoğunluğu; turizm, deniz işletmeciliği ve çevresel lobilerin baskıları nedeniyle azaltılmıştır. Aynı zamanda onshore üretim yerlerinin de düşük oranda büyüme ve yüksek oranda hastalık riskine sahip oldukları da kaydedilmiştir. Bu nedenle günümüzde artık çoğunlukla offshore kafes sistemleri kullanılmaktadır.

Deniz üzerinde tekne, şamandıra veya kıyıda bulunan iskele ayakları gibi yapay substratların zamanla birçok deniz canlısına ev sahipliği yaptığı, yapay bir habitat oluşturduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda fouling olarak da adlandırılabilen bu durum, katı yüzeyler üzerinde istenmeyen malzeme birikmesi olarak tanımlanır ve söz konusu materyaller canlı organizmalar (fauna ve flora elemanları) tarafından oluşturulursa biyofouling olarak adlandırılmaktadır ve zamanla biyofouling gelişir ve geniş alana yayılır (Bülbül ve Filik, 2019). Alg, Polychaeta, Bivalvia, Cirripedia, Bryozoa ve Tunicata gibi sesil organizmaları içeren gruplar primer makrofoulingi, bu türlerin arasında veya üzerinde yaşayan ve fouling olayına daha sonra katılan gruplar da sekonder makrofoulingi oluşturmaktadır (Houghton, 1978; Relini 1990; Koçak vd., 1998). Deniz kafes sistemlerinde ve özellikle ağlarda gelişen biyolojik topluluklar, gemilerdeki foulinglere kıyasla daha karakteristiktir ve özellikle makroalglerle ilişkilendirilen önemli bir problemdir (Braithwaite ve Mcevoy, 2005). Dünyada biofoulingin deniz balıkçılığı yetiştiriciliğinde sistemlerde ciddi sorunlara yol açtığı bildirilmiştir (Hodson ve ark., 1995; 1997; 2000). Genellikle oluşturdukları ağırlık ve istenmeyen yüzeylerin kaplanması nedeniyle bazı yapılar için negatif gelişim olarak değerlendirilen bu canlılar, zaman zaman yüzeylerin kazınması suretiyle temizleme amacıyla yapılardan uzaklaştırılmaktadır. Türkiye su ürünleri yetiştiricilik sektöründe de yüzer ağ kafes sistemlerinde gözlenen bu canlılar, ağ kafes yüzerliğine negatif yönde etki etmeleri, ağ gözlerini kapatarak su sirkülasyonunun azalmasına neden olmaları gibi olumsuz etkileri ile gündeme gelmektedirler. Bununla birlikte denizdeki yüzeylere tutunan bu canlıları denizel ekosistemin ve besin zincirinin önemli bir bölümünü oluşturdukları da unutulmamalıdır.

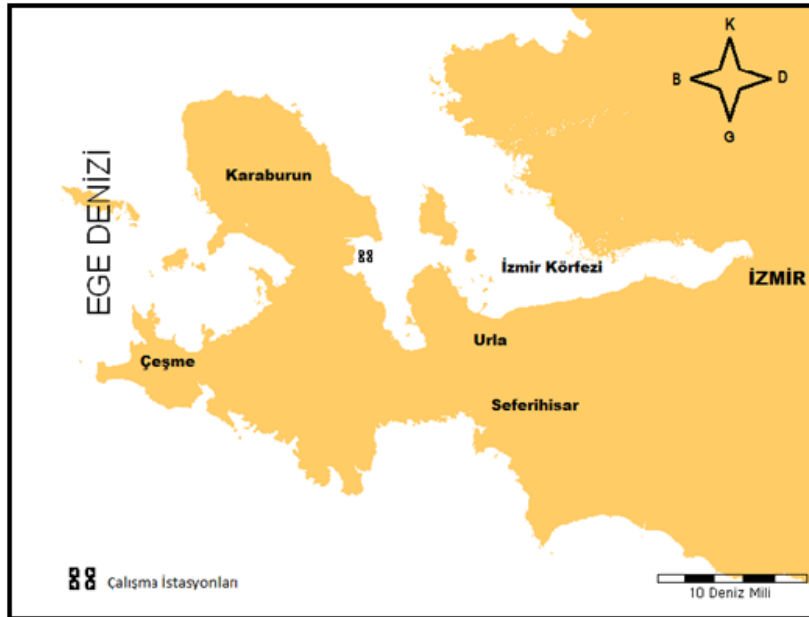
Dünyada denizlerde yapılan yetiştiricilik sistemlerindeki makrofouling organizmalar ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar olmakla birlikte (Houghton, 1978; Hodson vd., 1995; Shanmao 1998; Hodson vd., 2000; Braithwaite ve Mcevoy, 2005; Cook vd., 2006; Mhaddolkar 2017), ülkemizde spesifik olarak yüzer ağ kafes sistemlerindeki makroalg ve makroomurgasız türler üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ek olarak, Ege Denizi Türk karasularında farklı alanlarda habitat, ekosistem, tür çeşitliliği ve dağılımı, kirlilik, balıkçılık gibi pek çok farklı konuda bölgedeki makroalg

ve makroomurgasız türleri de içinde barındıran çeşitli çalışmalar mevcut olmakla beraber yine spesifik olarak yüzer ağ kafes sistemleri üzerindeki canlılarla ilgili yapılmış bir çalışmaya erişilememiştir. Dolayısıyla, bu çalışma Orta Ege Denizi'nde yer alan 300 ton kapasiteli bir levrek ve çipura deniz balıkları üretim çiftliği işletmesindeki yüzer ağ kafes sistemi bölümlerinde tutunan makroalg ve makroomurgasız türlerin belirlenmesi ve sistem bölümlerine göre dağılımlarının incelenmesi amacıyla geliştirilebilir bir pilot çalışma olarak yürütülmüştür.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Çalışma sahası ve yüzer ağ kafes sisteminin özellikleri

Bu çalışma Orta Ege Denizi'nde yer alan İzmir Dış Körfezi Balıklıova kıyısında, $38^{\circ} 26' 56,77''$ K – $26^{\circ} 36' 30,98''$ D; $38^{\circ} 36' 51,77''$ K – $26^{\circ} 36' 57,40''$ D; $38^{\circ} 26' 43,07''$ K – $26^{\circ} 36' 25,74''$ D; $38^{\circ} 26' 43,55''$ K – $26^{\circ} 36' 53,13''$ D koordinatları arasında yer alan ağ kafes ünitelerinde yürütülmüştür (Şekil 1). 300 ton kapasiteli levrek ve çipura üretim işletmesidir ve 20 m çapında 15 adet ağ kafes ünitesi mevcuttur. Ağ kafes ünitelerinin bulunduğu derinlik 30 m, kafeslerin ağ derinliği ise 15 metredir (Şekil 2a). Ağ kafes sistemi, yüzdürücü borular, mooring sistemi, halatlar ve ağdan oluşmaktadır. Çalışmanın materyalini ağ kafes sistemlerinin bu farklı yapılarıdaki bölümlerine tutunarak yaşayan makroomurgasızlar ve algler oluşturmaktadır. Demirlemede kullanılan tonoz ve çapalar dalış emniyeti açısından örneklenemeyeceği için değerlendirme dışı tutulmuştur.



Şekil 1. Çalışmanın yürütüldüğü bölge.

Yüzdürücü borular, yüksek yoğunluklu polietilen malzemeden sıcak enjeksiyon ve çekme yöntemiyle üretilmekte ve içine strofor malzeme doldurularak, çeşitli çap ve kalınlıkta üretilen borulardır (Şekil 2b). Farklı çaplarda dairesel pozisyonda 2'li veya 3'lü olarak kaynak yapılmakta, sistemin ağ ve halat ağırlığını yüzdürebilecek kapasitede kullanıma sunulmaktadır. Ağ kafes yüzdürücü boruları ile demirleme çapaları arasında gerilimi birçok noktada paylaşan ve dengeleyen bir sistem olan mooring sistemi ise üzerine yüzdürücü bağlanmış dairesel bir çerçeveden oluşmaktadır (Şekil 2c). Farklı yönlerden gelen halatlar bu çembere bağlanarak sistemin dengede durmasını sağlamaktadır. Tüm sistemi, demirleme çapalarına ve kafeslerin birbirine bağlanabilmesi için çeşitli çaplarda ve Poliamit, Polietilen, Polipropilen, Polivinilklorür gibi çeşitli materyallerden yapılmış halatlar kullanılmaktadır. Halatlar genellikle bağlantı yerindeki aşınmayı önlemek için rodensa ve kilit ile zincir ve mooring sistemine bağlanmakta, sadece yüzdürücü kafes çerçevesine düğüm atılarak

bağlanmaktadır. Deniz balıkları üretiminde kafes borular içine donatılan ağ havuzlar ise balık yetiştiriciliğinin en önemli enstrümanını oluşturmaktadır. Çeşitli materyal, kalınlık ve göz açıklığından oluşan ağlar buldukları ortamda birçok canlı türüne yapay habitat oluşturmaktadır. Çalışmada incelen sistemdeki ağlar ise Poliamid (PA) materyalden, 210 denye ve 8, 12 ve 14 mm göz açıklığına sahiptir.



Şekil 2 a, b ve c. Yüzer ağ kafes üniteleri (a), kafes yapımında kullanılan polietilen borular (b) ve mooring sistemi (c).

2.2. Veri Toplama ve Değerlendirme

Ocak-2015 ile Şubat 2018 tarihleri arasında Orta Ege Denizi'nde sürdürülen arazi çalışmalarında Ege Üniversitesi Sualtı Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ait 11 m boyunda 135 hp gücüne sahip EGE DERİN isimli eğitim gemisi ve Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine ait 4,60 m boyunda 50 hp gücünde hızlı bot ARGE kullanılmıştır. Ağ kafes sistemlerinin farklı bölüm ve derinliklerinde tutunarak yaşayan canlıların birim alanda tespit edilmesinde, hem serbest hem tüplü dalış yapılarak örnek toplama ve sualtı kamerası ile görüntü analizi yöntemleri kullanılmıştır. Özellikle ağ üzerinde bulunan algerin kazınarak alınamaması sebebiyle sualtı görüntü cihazı olan GoPRO Hero 4 Black Edition ile görüntüler alınmıştır. Çalışma boyunca toplam 15 örnekleme gününde iki balıkadam toplamda 42 saat dip zamanı ile 32 m derinliğe kadar örnekleme yapmıştır. Alınan örnekler % 3'lük nötralize formaldehit çözeltisiyle fikse edilerek laboratuvar ortamına taşınmış, tür tayinleri ve birey sayıları tespit edilmiştir. Türlerin büyüklüklerine göre bazı türler çıplak göz ile daha küçük boyutlu türler ise binoküler mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Tür tayinlerinde Tebble (1966), Fischer vd. (1987), Poppe ve Goto (1993) ve Palomares ve Pauly (2021)'den yararlanılmıştır. Güncel sistematik bilgileri World Register of Marine Species (WoRMS, 2021)'den kontrol edilerek listelenmiştir. Elde edilen sayısal değerlerin incelenmesinde ve çok değişkenli analizlerin hesaplanmasında Primer v6.1.13 (Clarke ve Gorley, 2006) ve Microsoft Excel paket programları kullanılmıştır. Çalışma süresince ayrıca su sıcaklıkları Suunto D6i dalış bilgisayarı ile kaydedilmiştir.

3. BULGULAR

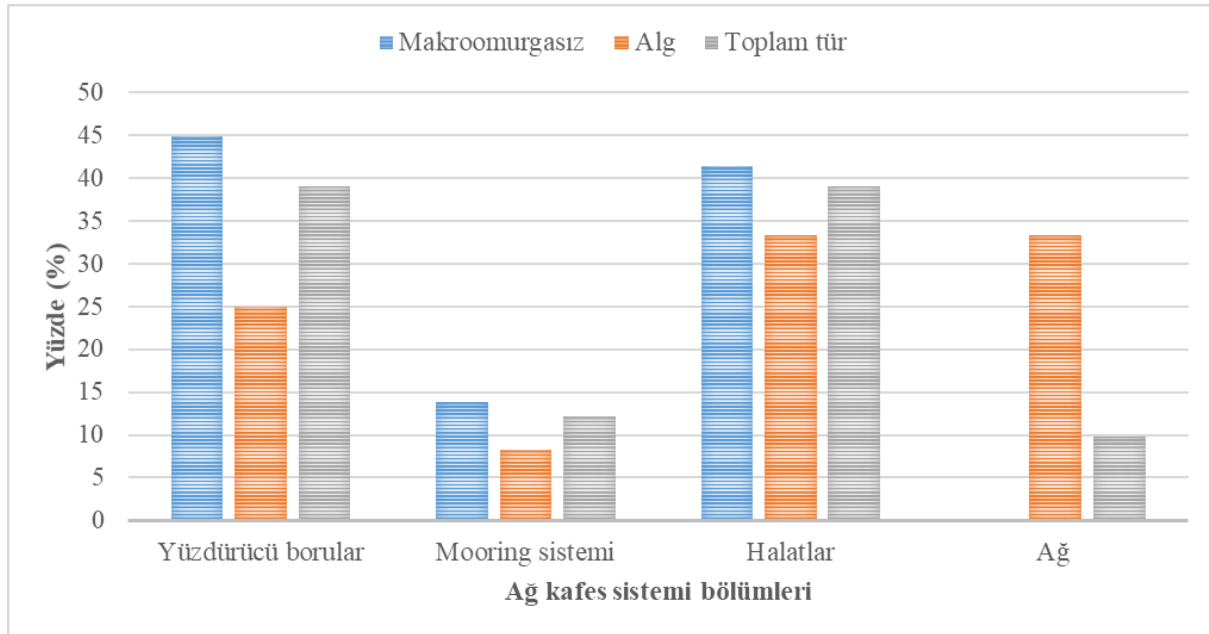
Çalışma sonunda 9 adedi Mollusca, 4 adedi Arthropoda, 2 adedi Echinodermata filumlarına ait 13 familyadan toplam 15 adet makroomurgasız türü (Tablo 1) ile Chlorophyta ve Rhodophyta filumlarına ait 6 adet alg türü (Tablo 2) tespit edilmiş olup, incelenen toplam biomas 87 kg'dır. Kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve tragona olarak isimlendirilen 1 adet *Balanus* sp. türü en yoğun rastlanan türler olarak belirlenmiştir. Örneklenen makroomurgasız ve alg türlerinin yüzer ağ kafes sistemi bölümlerine göre toplam veri üzerinden hesaplanan sayıca yüzde frekans dağılımı Şekil 3'te verilmiştir. Çalışma boyunca kaydedilen su sıcaklığı değerlerine bakıldığında, ortalama 14,5 °C ile Ocak ve Şubat ayları en soğuk, 27 °C ile Ağustos en sıcak ve tüm çalışma boyunca kaydedilen sıcaklık ortalaması da 19 – 21 °C olarak ölçülmüştür.

Tablo 1. Ağ kafes sistemlerinde tespit edilen makroomurgasız türleri.

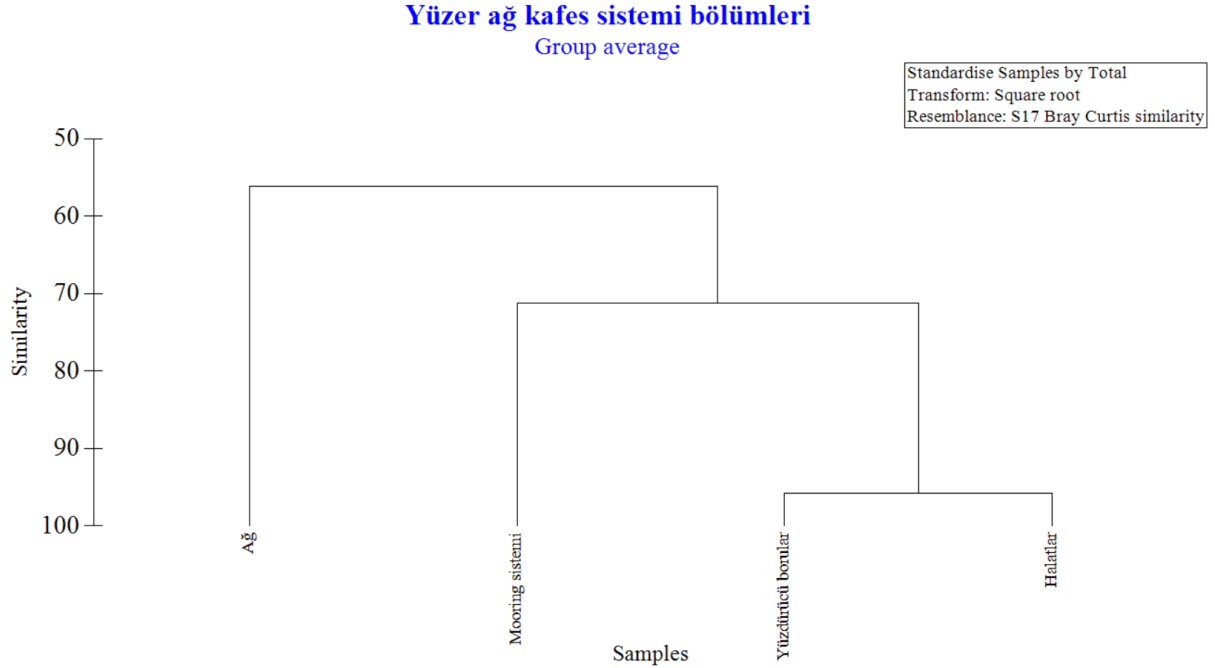
Filum	Klas	Familiya	Tür
Mollusca	Bivalvia	Arcidae	<i>Arca noae</i> Linnaeus, 1758
		Anomiidae	<i>Anomia ephippium</i> Linnaeus, 1758
		Chamidae	<i>Chama gryphoides</i> Linnaeus, 1758
		Hiatellidae	<i>Hiatella arctica</i> (Linnaeus, 1767)
		Mytilidae	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819
			<i>Modiolus barbatus</i> (Linnaeus, 1758)
			<i>Musculus costulatus</i> (Risso, 1826)
		Ostreidae	<i>Ostrea edulis</i> Linnaeus, 1758
			Margaritidae
		Arthropoda	Malacostraca
Pilumnidae	<i>Pilumnus hirtellus</i> (Linnaeus, 1761)		
Porcellanidae	<i>Porcellana platycheles</i> (Pennant, 1777)		
Thecostraca	Balanidae		<i>Balanus</i> sp.
Echinodermata	Ophiuroidea		Ophiuridae
	Echinoidea	Parechinidae	<i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)

Tablo 2. Ağ kafes sistemlerinde tespit edilen alg türleri.

Filum	Klas	Familiya	Tür
Chlorophyta	Ulvophyceae	Ulotrachaceae	<i>Ulothrix speciosa</i> (Carmichael) Kützing, 1849
		Ulvaceae	<i>Ulva compressa</i> Linnaeus, 1753
			<i>Ulva lactuca</i> Linnaeus, 1753
			<i>Ulva rigida</i> C.Agardh, 1823
Rhodophyta	Florideophyceae	Ceramiceae	<i>Ceramium ciliatum</i> (J.Ellis) Ducluzeau, 1806 <i>Ceramium</i> sp.

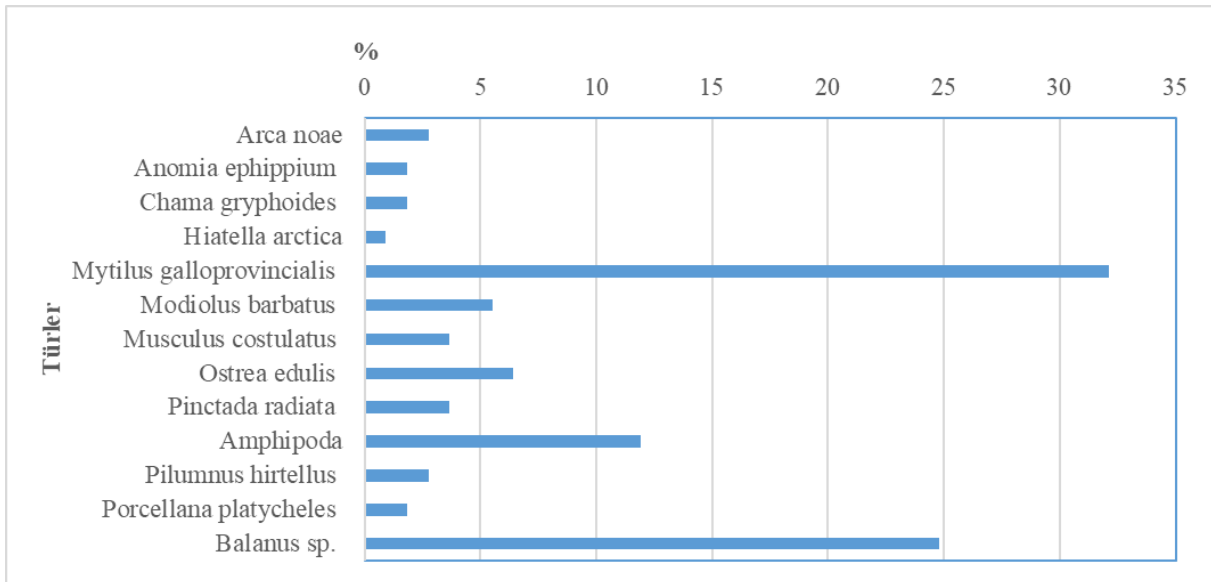
**Şekil 3.** Örneklenen türlerin yüzer ağ kafes sistemi bölümlerine göre sayıca yüzde dağılımı.

Yüzer ağ kafes sistemi bölümlerinde tespit edilen türlerin Bray-Curtis benzerlik analizi hesaplarına göre oluşturulan sayısal bolluk kümelenme dendogramı Şekil 4'te gösterilmiştir. Buna göre sistemin ağ bölümü tek başına bir grup oluştururken, yüzdürücü borular ve halatların % 95,66'lık en yüksek benzerlik oranı ile farklı bir grup oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. Türlerin Bray-Curtis benzerlik analizine dayalı yüzer ağ kafes sistemi bölümlerine göre kümelenme dendogramı.

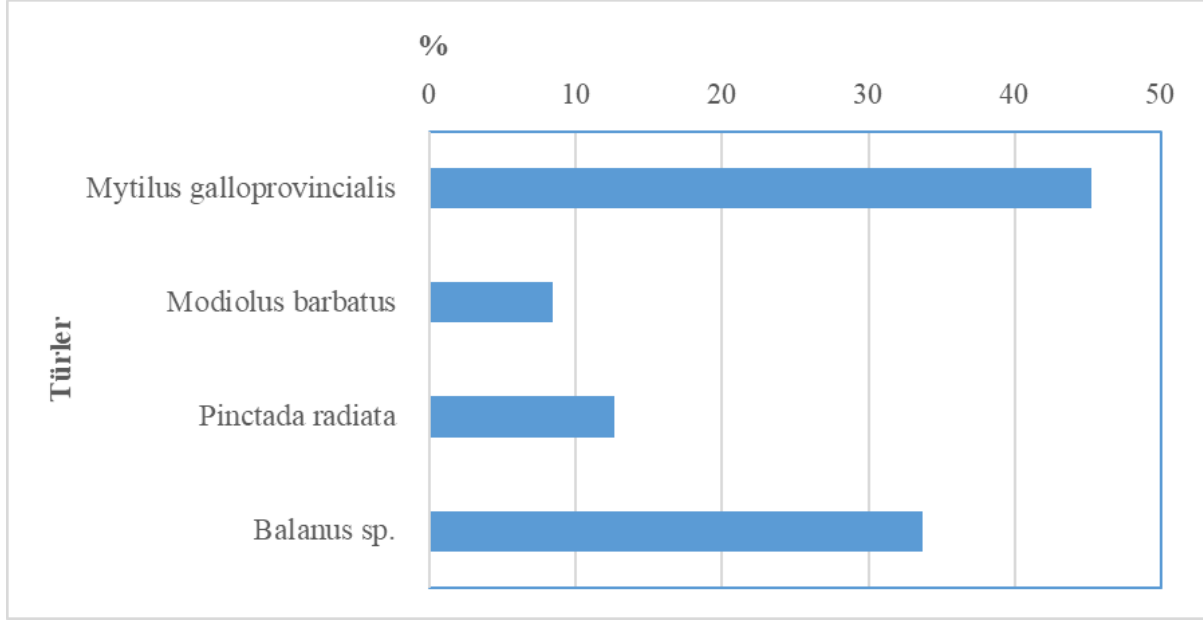
En fazla sayıda türün bulunduğu tespit edilen yüzdürücü borulara tutunan makroomurgasız türler içinde *M. galloprovincialis* ilk sırada yer alırken ikinci sırada *Balanus* sp. ve üçüncü sırada da Amphipoda türlerine rastlandığı belirlenmiştir (Şekil 5). Yüzdürücü borulara tutunan alg türleri incelendiğinde ise toplam üç tür tespit edilmiş ve bunlar arasında en yoğun rastlanan türün *U. lactuca* olduğu ve bunu benzer çevresel koşulları tercih eden *U. rigida* ve *U. compressa* türlerinin takip ettiği belirlenmiştir.



Şekil 5. Yüzdürücü borulara tutunan makroomurgasız türlerin sayıca yüzde dağılımları.

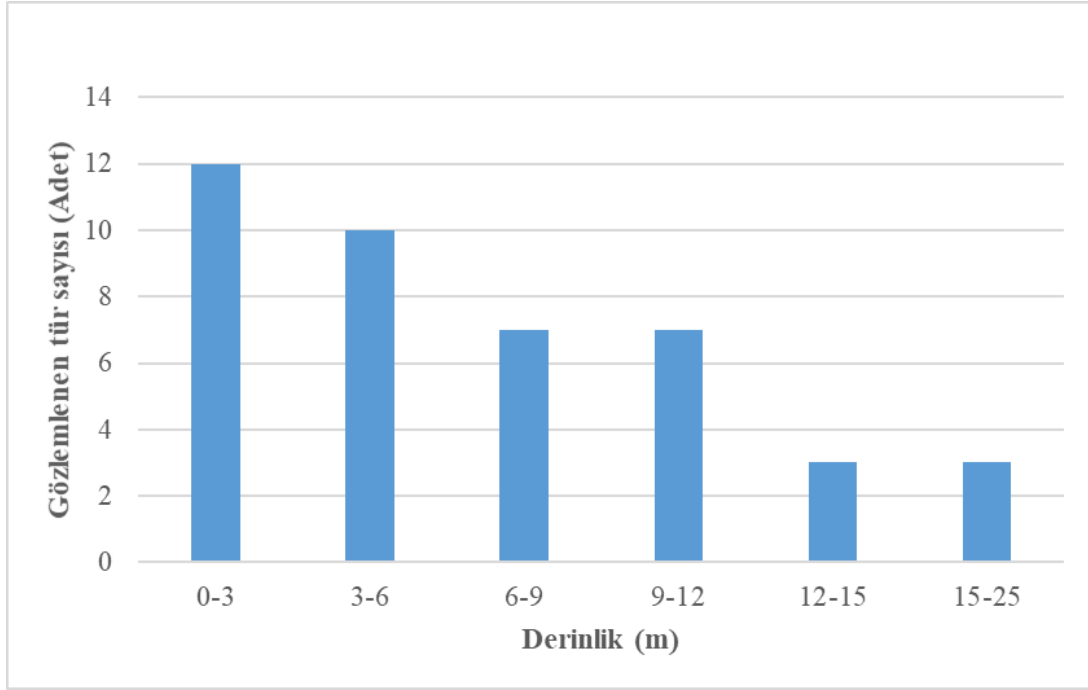
Mooring sistemi 5 – 8 m derinlikte ve yapısında metal halkalar barındırdığından özellikle sert bir yere sabitlenerek yaşayan kabukluların tercih ettiği bir alan olarak gözlemlenmiştir. Bulunduğu

derinlikte ışığın yeterli oluşu ve su sirkülasyonunun çok oluşu bu bölgedeki kabuklu türlerinin yoğun yerleşimine imkân sağlamaktadır. Mooring sisteminde tespit edilen *M. galloprovincialis*, *M. barbatus*, *P. radiata* ve *Balanus* sp. makroomurgasız türlerine ait sayıca yüzde dağılım frekansı Şekil 6'da gösterilmektedir. Mooring sistemine yerleşen alg türlerine bakıldığında ise sadece *C. ciliatum* ve *Ceramium* sp. türlerinin derinlik, suyun ışık geçirgenliği ve organik madde miktarıyla ilişkili olarak sınırlı, çok yoğun olmayan bir yerleşime sahip olduğu dalışlar sırasındaki sualtı gözlemlerinde izlenmiştir.



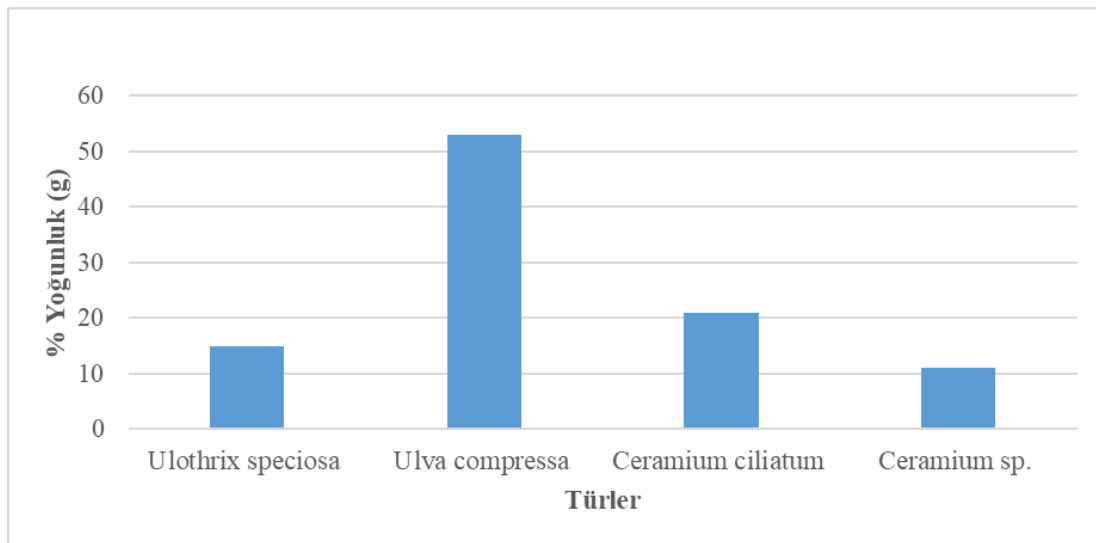
Şekil 6. Mooring halkası üzerinde belirlenen makroomurgasız türlerin sayıca yüzde dağılımları.

Yüzer ağ kafes sistemlerinde yer alan halatlar farklı derinliklerde, su yüzeyinden zemindeki sabitleme demirlerine (Yaklaşık 40 – 60 m) kadar uzanabilmektedirler. Bu nedenle doğal olarak, halatlardaki tür yerleşimi su yüzeyinde yoğun ve zengin, derinlere doğru gidildikçe ise tür ve birey sayısı bakımından fakirleştiği gözlemlenmiştir. Halatlar üzerinde yerleşim göstererek tespit edilen makroomurgasız tür dağılımının derinliğe göre değişimi Şekil 7'de verilmiştir. Bununla birlikte halatlar üzerinde en yoğun tespit edilen makroomurgasız tür % 64 ile *M. galloprovincialis* olup, bunu % 12 ile *Balanus* sp., % 4 ile *Amphipoda*, % 3 ile *P. lividus* ve % 7 ile diğer makroomurgasızlar izlemiştir. Alg türlerinin yerleşim ve dağılımlarına bakıldığında ise yüzeye yakın ışığın bol olduğu bölgelerde Chlorophyta filumuna mensup *U. lactuca*, *U. rigida* ve *U. comprezza* türlerine rastlanırken, ışığın azaldığı derinliklerde Rhodophyta filumundan *C. ciliatum* türüne rastlanmaktadır. *Ulva* genusuna ait türler toplamda % 83'lük bir dağılım gösterirken (*U. lactuca*: % 44; *U. rigida*: % 21; *U. comprezza*: % 18) *C. Ciliatum* türünün % 17'lik bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 7. Halatlar üzerinde derinliğe göre tespit edilen makroomurgasız tür sayısı dağılımı.

Ağ kafes sistemlerinde en geniş yüzey alanına ve esnek bir yapıya sahip olan ağlardır. Yüze yakın olmaları ve su sütununda salınarak organik maddece zengin bölümde bulunmalarının etkisiyle alg türlerine iyi ev sahipliği yaptıkları gözlemlenmiştir. Bu materyal üzerindeki flora gelişimi çoğunlukla balık çiftliklerinde istenmeyen ağ gözü kapanmalarına ve ağ kafes içindeki su sirkülasyonunun azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle yüzer kafes sistemlerinin dalgıçlar tarafından düzenli olarak fiziki temizleme yapılmaktadır. Bu düzenli temizleme genellikle 4 – 7 haftada bir yapıldığından ağlar üzerinde makroomurgasız türlerine rastlanmamıştır. Makroomurgasız türlerin yerleşimini ve tutulumunu engelleyen bu duruma rağmen alg türleri için aynı şeyin söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. Ağlar üzerinde hiç makroomurgasız türüne rastlanmazken, bazı alglerin yerleşim gösterdikleri gözlemlenmiştir. Ağlarda rastlanan algler için birim alanda türlerin ağırlık açısından yoğunluk dağılımına bakıldığında *U. compressa* türünün ilk sırada yer aldığı, bunu sırasıyla *C. Ciliatum*, *U. speciosa* ve *Ceramium sp.* türlerinin takip ettiği tespit edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Ağlar üzerine tutunan alglerin birim alanda yoğunluk dağılımı.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Denizde su ürünleri üretimi yapan çiftliklerin en önemli yatırım maliyeti yüzer ağ kafes sistemleridir ve bu sistemlerin bileşenleri yüzeyden 80-100 m derinliklere kadar uzanabilmektedir. Bu yapı yerleşimi vertikal deniz sütununda birçok canlının tutunup yaşayabileceği yüzeyler oluşturmaktadır. Price ve Morris (2013) kıyısız alanlarda ya da açık denizlerde bulunan balık çiftliklerinin genellikle plankton, bentik fauna, balıklar, deniz memelileri veya mercanlar gibi serbest olarak bulunan doğal ortam elemanları için bir çeşit barınma yeri durumunda olduğunu bildirmişlerdir. Balıkların beslenmesi için kafeslere atılan yemler ve balıkların metabolik atıkları bu bölgelerde nutrient seviyesinin artmasına neden olmakla birlikte, bu durum ortamda dağılım gösteren ve besin zincirinin ilk halkasını oluşturan fitoplankton miktarı artışına da katkı sağlamaktadır (Porter vd., 1987). Buna bağlı olarak da farklı materyallere sahip bu yapılar suyu süzerek beslenen (filter feeding) özellikle bivalvia türlerinin yoğun yerleşimine ev sahipliği yapmaktadır (Porter vd. 1987; Braithwaite ve McEvoy, 2005). Ortamda uygun sıcaklık ve uygun besin bulunması nedeniyle yerleşmek üzere ekolojik ortam bulan bu canlı toplulukları yüzer sistemleri ağırlıkları ve ağ gözünü kapatan yoğun yerleşimleri nedeniyle işletmeleri zaman zaman olumsuz etkilemektedir. Fakat aynı zamanda burada var olan nutrient yükü bu canlılar tarafından indirgenmektedir. (Weston vd., 1990; Jahani vd., 2018). Kafes sistemlerinin yer aldığı bölgelerin biyoçeşitliliği ile ilgili olarak yapılan incelemelerde çeşitli zooplankton türleri de rapor edilmiştir. Özellikle küçük balıkların besinini oluşturan çift kabuklu larvaları, bazı echinoderm larvaları ve zooplankton türleri besin zincirinin ikinci halkasını oluşturarak bu bölgeye önce küçük balıkların ve ardından büyük balıkların gelmesini sağlamaktadır (Price and Morris 2013).

Orta Ege Denizi'nde yapılan bu pilot çalışmada yüzer ağ kafes sisteminde Mollusca, Arthropoda ve Echinodermata filumuna ait 15 makroomurgasız tür ile Chlorophyta ve Rhodophyta filumlarına ait 6 makroalg türünden oluşan toplam 21 makro fouling tür tespit edilmiştir. Türkiye sularında yüzer ağ kafes sistemlerindeki makro fouling türlerin tespiti ile ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte yabancı sularda yapılan bazı çalışmalarda bu çalışmada da tespit edilen ortak genuslar ve türler bulunmaktadır. Buna göre Shanmao vd. (1998)'nin Jinzhou Bölgesi'ndeki deniz çiftliğinde yürüttükleri çalışmada toplam 82 tür tespit edilmiş olup, bunlar arasında genus seviyesinde *Ulva*, *Ostrea*, *Balanus*, *Porcellana*, *Ophiura*, Amphipoda spp. ve tür seviyesinde de *U. lactuca* ve *M. galloprovincialis* tespit edilen ortak makro fouling organizmalardır. Mhaddolkar vd., (2017)'nin Hindistan'ın batı kıyılarında yer alan kafes sistemlerinde yürüttükleri derinliğe bağlı dağılımı inceleyen bir diğer çalışmada da yedi filuma ait toplam 21 makro fouling tür tespit etmişlerdir ve bunlar arasında *Balanus* sp. ve *Modiolus* sp. bu çalışmada da tespit edilen benzer organizmalardır. *Balanus* sp. bu çalışmada % 29 ile ikinci sırada yer alan baskın tür iken, Mhaddolkar vd., (2017)'nin yaptıkları çalışmada % 29,74; % 51,25 ve % 49,63'lük oranlarla çalıştıkları her derinlik için baskın tür olarak rapor edilmiştir. Ayrıca derinlikle birlikte fouling organizma topluluklarının önemli bir değişiklik gösterdikleri raporlanmıştır (Nellis ve Bourget, 1996; Svane vd., 2016; Mhaddolkar vd., 2017). Bu çalışmada da derinliğe bağlı olarak gözlemlenen tür sayısında değişim olduğu kaydedilmiş olup, 0-3 m derinliğin % 29 ile en fazla, 15-25 m derinliğin ise % 7 ile en az dağılıma sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu varyasyonların ayrıca kafeslerin bulunduğu bölgesinin sıcaklık, tuzluluk, ışık yoğunluğu, besin mevcudiyeti, çözünmüş oksijen koşulları ve suyun akımı gibi birçok çevresel parametrenin de etkisi altında oldukları unutulmamalıdır (Braithwaite ve Mcevoy, 2005; Kassah, 2012).

Yüzer ağ kafes sistemlerindeki yüzdürücü borular buldukları yer itibarıyla su yüzeyine en yakın yapılardır. Sistemin zaman zaman su içinde zaman zaman su dışında kalan, ışık ve su yüzeyindeki besleyici maddelerden en çok yararlanan bölümdür. Bu nedenle çalışmada yüzdürücü borular en çok tür ve birey barındıran bölüm olarak dikkati çekmektedir (Makroomurgasız tür sayısı: % 45, Makroalg tür sayısı: %25). Bunu takip eden hatlar ise (Makroomurgasız tür sayısı: % 41, Makroalg tür sayısı: % 33) farklı derinliklerde yer alan yapay habitatlardır ve bu nedenle yüzdürücü borular ile aralarındaki

tür benzerliği Bray-Curtis benzerlik analizine göre % 95 olarak tespit edilmiştir. Ağ kafes sistemlerinde tutunan makroalg türlerinin kullanılmayan yemler ve balıkların metabolik atıklarının neden olduğu azot ve fosfor miktarındaki artışın indirgenmesinde katkı sağladığı bildirilmekle birlikte *Ulva* türlerinin ortamda bulunan fosforun % 8,9'unu ve azotun da % 24'ünü indirgeyebildikleri rapor edilmiştir (Hernandez vd., 2005). Böylece ortamda bulunan bu makroalg türleri suyun kalitesini arttırabilen bir eleman olarak ve ekonomik olarak da ağ kafeslerin yan ürünleri olarak düşünülebilir. Özellikle son yıllarda makroalglerin ilaç ve kozmetik bakım ürünlerinde hammadde olarak kullanımlarının artması da bir diğer ekonomik fayda olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca kafes sistemlerinde kayda değer populasyon oluşturan çift kabuklu türlerin uygun yöntemler ile toplanıp pazarlanmaları da yeni bir ekonomik girdinin oluşmasını sağlayabilir. Ek olarak bu sistemlerin bulunduğu ortamlar çeşitli balık türleri için cezbedici bölgeler haline gelebilirler ve böylece bölgedeki biyoçeşitliliğin artmasına olanak sağlayıp ekonomiye kazandırılacak avlanabilir tür sayısı ve miktarına da katkıda bulunabilirler. Dolayısıyla makro fouling organizmaların sisteme ağırlık yapması, su değişim oranını azaltması ve çalışma zorluğu yaratmasının yanı sıra bu türlerin bazılarının su kalitesine olan kısmi olumlu katkıları ve ayrıca ekonomik fayda olarak değerlendirilebilecekleri de göz ardı edilmemelidir. Fakat yine de deniz çiftliklerindeki kafes operasyonlarında düzgün ve kaliteli yem kullanımı ve yemlemenin yanında, sürekli izleme çalışmaları da yapılarak, birim alandan çevre ile dost maksimum faydanın sağlanması gerekmektedir. Sonuç olarak bu pilot çalışma bulguları ile Orta Ege Denizi'nde yüzer ağ kafes sistemleri üzerinde tespit edilen bazı makroalg ve makrooomurgasız türlerden oluşan makro fouling organizmaların tespiti yapılarak bu girift ve çok çıktılı konuyla ilgili ileride yapılacak olan kapsamlı çalışmalar için temel bilgi birikimine büyük katkı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2015/SAUM/001 numaralı proje ile desteklenmiştir. İskandil Su Ürünleri İşletmesine arazi çalışmalarının gerçekleştirilmesinde verdikleri destek için teşekkür ederiz. Ayrıca Doç. Dr. İlker Aydın ve Doç. Dr. Dr. Gamze Turan'a proje çalışmasına olan pozitif destek ve ilgilerinden dolayı teşekkür ederiz.

FİNANS

Bu çalışma 2015/SAUM/001 proje numarası ile Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

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

YAZAR KATKILARI

Kurgu: AU; Metodoloji: AU, SS,ŞY; Deneyin gerçekleştirilmesi: AU, DG; Veri analizi: AU, DG, SS; Makale yazımı: AU, ŞY, Denetleme: Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

ETİK ONAY BEYANI

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

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

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

KAYNAKLAR

- Beveridge, M. (1987). *Cage Aquaculture. A division of Blackwell Scientific Publication*. Fishing News Book, Oxford.
- Braithwaite, R., A., & McEvoy, L., A. (2005). Marine biofouling on fish farms and its remediation *Advances in Marine Biology*, 47, 215-252.
- Bülbül, Z., & Filik, N. (2019). Gemi yapımında kullanılan ahşap malzemelerde oluşan biyofilm ve fouling. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 7(1), 1-6.
- Clarke, K. R. & Gorley, R. N., 2006, PRIMER v6: User Manual/Tutorial, PRIMER-E, Plymouth.
- Cook, E. J., Black, K. D., Sayer, M. D. J., Cromey, C. J., Angel, D. L., Spanier, E., Tsemel, A., Katz, T., Eden, N., Karakassis, I., Tsapakis, M., Apostolaki, E. T., & Malej, A. (2006). The influence of caged mariculture on the early development of sublittoral fouling communities: a pan-European study. *ICES Journal of Marine Science*, 63(4), 637-649.
- Dikel, S. (2002). *Su Ürünlerinde Mekanizasyon*. II. Baskı Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Adana.
- FAO (2018). *The State of World's Fisheries and Aquaculture*, Rome. 200p.
- Fischer, W., Schneider, M., & Bauchot, M.L. (1987). Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire (Zone De Pêche 37), Révision 1. *Méditerranée et mer Noire*, (2), 1529p.
- Gordon, C. (1998). *Tarihte Neler Oldu* (Çev: Mete Tunçay-Alaeddin Şenel), Kırmızı Yayınları, İstanbul.
- Hernandez, I., Fernandez-Engo, M. A., Perez-Llorens, J. L., & Vergara, J. J. (2005). Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus auratus* waste waters. *Journal of Applied Phycology*, (17), 557-567.
- Hodson, S. L., Burke, C. M. & Bissett, A. P. (2000). Biofouling of fish-cage netting: The efficacy of a silicone coating and the effect of netting colour. *Aquaculture*, 184(3-4), 277-290.
- Hodson, S. L., Burke, C. M., & Lewis, T. E. (1995). In situ quantification of fishcage fouling by underwater photography and image analysis. *Biofouling*, 9(2), 145-151.
- Hodson, S. L., Lewis, T. E., & Burke, C. M. (1997). Biofouling of fish-cage netting: efficacy and problems of in situ cleaning. *Aquaculture*, 152(1-4), 77-90.
- Hoşsucu, H. (1991). *Balıkçılık (Av Araçları ve Avlanma Yöntemleri)*. VII. Baskı, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Yüksekokul Yayınları, İzmir.
- Houghton, D. R., (1978). Marine fouling and offshore structures. *Ocean Management*, 4(2-4), 347-352.
- Jahani, N., Madiseh, S. D., Nabavi S. M. B., & Isapour, F. (2018). Determination of the effects of marine fish cage culture on benthic communities of Ghazale Creek (NW of Persian Gulf) using benthic indices. *Research & Reviews: Journal of Ecology and Environmental Sciences*, 6(2), 1-7.
- Kassah, J., E. (2021). *Development of biofouling on salmon cage nets and the effects of anti-fouling treatments on the survival of the hydroid (Ectopleura larynx)* (Ellis & Solander, 1786). Master's Thesis. Norwegian University of Science and Technology Faculty of Natural Sciences and Technology. Trondheim, 65.
- Koçak, F., Ergen, Z., & Çınar, M. E. (1998). Bodrum limanında (Ege denizi) fouling gelişimi. *Bodrum Yarımadası Çevre Sorunları Sempozyumu Bildiriler Kitabı*. (1), 139-146.
- Mhaddolkar S. S., Loka, J., Philipose, K. K., & Dineshbabu, A. P. (2017). Experimental studies on macro fouling communities on net panels at marine cage farm of Karwar, India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(2), 184-187.
- Nellis, P., & Bourget, E. (1996). Influence of physical and chemical factors on settlement and recruitment of the hydroid Tubularia larynx. *Marine Ecology Progress Series*, (140), 123-139.

- Palomares, M. L. D., & Pauly, D. (2021) SeaLifeBase. World Wide Web electronic publication. www.sealifebase.org, version (08/2021).
- Poppe, G. & Goto, Y. (1993). *European Seashells* (2), ConchBooks Wiesbaden: Hemmen.
- Porter, C., B., Krom, M., D., Robbins, M., G., Brickell, L., & Davidson, A. (1987). Ammonia excretion and total N budget of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture*, 66(3), 287-97.
- Price, C., S., & Morris, J. A., Jr. (2013). *Marine cage culture and the environment: Twenty-first century science informing a sustainable industry*. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS (164).
- Relini, G., (1990). Inseadimento di organismi marini di substrato duro in ambienti portuali mediterranei. *Memorie di Biologia Marina e di Oceanografia*, (10) 61-70.
- Scott, D. C. B. & Muir, J. F. (2000). Offshore cage systems: A practical overview. In: J. Muir, & B. Basurco, *Mediterranean offshore mariculture, Options Méditerranéennes* (B), 79-89. Zaragoza, Etudes et Recherches (CIHEAM).
- Shanmao, C., Congyao, Z., Guofan, Z., & Yujing, W. (1998). Study on species composition of fouling organisms on mariculture cages [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 4.
- Svane, I., Cheshire, A., & Barnett, J. (2006) Test of an antifouling treatment on tuna fish cages in Boston Bay, Port Lincoln, South Australia. *Bio-fouling*, 22(4), 209-219.
- Tebble, N. (1966). *British Bivalve Seashells*. Trustees of The British Museum (Natural history), London.
- TÜİK (2019). *Su Ürünleri İstatistikleri*. TÜİK Yayını, Çankaya-Ankara.
- Weston, D. G. (1990). Quantitative examination of macrobenthic community changes along an organic enrichment gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 61(3), 233-244.
- WoRMS Editorial Board. (2021). World Register of Marine species. VLIZ: <http://www.marinespecies.org>
-

Avrupa Deniz Levreği (*Dicentrarchus labrax*) Pilorik Sekasından Tripsin Enziminin Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu

Purification and Partial Characterisation of Trypsin from Pyloric caeca of the Seabass (*Dicentrarchus labrax*)

Nihat Karasu^{1,*}, Ali Günlü²

¹ Tarım ve Orman Bakanlığı, Muğla İli, Menteşe İlçe Müdürlüğü, Muğla

² Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri İşleme Teknolojisi A.B.D, Muğla

*Sorumlu Yazar: nihatkarasu@hotmail.com

Geliş: 13.12.2021

Kabul: 01.04.2022

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: Karasu, N. & Günlü, A. (2022). Avrupa Deniz Levreği (*Dicentrarchus labrax*) pilorik sekasından Tripsin enziminin saflaştırılması ve kısmi karakterizasyonu. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 259-272. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1036035>

Özet: Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) pilorik sekasından tripsin enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi (%30-%60) ve bir boyut dışlama kromatografisi olan Sephacryl S-200 kolonu kullanılarak saflaştırılmış; saflığı, sıcaklık ve pH'ya hassaslığı hesaplanarak karakterize edilmiştir. Avrupa deniz levreğinden tripsin enzimi 52,71 kat saflaştırılmış olup, %8,60 verimlilik oranına sahiptir. Enzimin molekül büyüklüğü SDS-PAGE elektroforez analizi sonucu 24 kDa molekül büyüklüğünde tek bant olarak tespit edilmiştir. Tripsin enzimi substrat olarak BAPNA (*N*_α-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) kullanılarak yapılan stabilite analizlerinde pH 8,0 ve 55 °C'de optimal aktivite göstermiştir. Ancak, aktivitesinin 50 °C'den sonra %30 ve fazlasını, 70 °C'de ise tamamını kaybetmiştir. En iyi stabiliteyi pH 7,0-10,0 arasında göstermiştir. Böylece Avrupa deniz levreğinden geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktivite gösteren, farklı sanayi dallarında kullanılabilecek tripsin enzimi elde edilmiştir. Bulgular, sıcaklık ve pH faktörlerinin tripsin enzimi aktivitesini önemli düzeyde etkilediğini göstermiştir (P<0,05).

Anahtar kelimeler

- *Dicentrarchus labrax*
- pilorik seka
- tripsin
- BAPNA
- saflaştırma

Abstract: Trypsin was isolated from pyloric caeca of European seabass (*Dicentrarchus Labrax*) by ammonium sulphate fractionation (30-60%) and size exclusion (Sephacryl S 200) gel filtration chromatography. The enzyme was purified at a rate of 52.71 fold with a yield of 8.60%. The molecular weight of the enzyme was estimated using a low molecular weight marker (Sigma Low Range M3193) and wide molecular weight marker (Sigma Wide Range S8445). The molecular weight of the purified trypsin was estimated to be 24 kDa by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-Page) gel electrophoresis, which showed only one band in bromophenol blue staining. The optimum temperature and pH for the trypsin activity were 55 °C and pH 8.0, respectively. The enzyme was extremely stable in the pH range of 7.0-10.0 and highly (70%) stable up to 50 °C after 30 minutes incubation. *N*_α-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) was used as a substrate for all activity and stability analyzes. Data of the study showed that temperature and pH factors that significantly affect trypsin enzyme activity.

Keywords

- *Dicentrarchus labrax*
- pyloric caeca
- trypsin
- BAPNA
- purification

1. GİRİŞ

Denizel ortam, genetik olarak çok çeşitli türleri barındırdığı için farklı özellikteki enzimlerin elde edilmesinde en önemli kaynak olarak görülmektedir. Deniz ortamı, ekstrem koşulları da



taşıyabildiğinden deniz canlılarından elde edilen enzimler de bu şartlara uyum göstermiştir (Zhou vd., 2011; Fouz vd., 2021).

Balık, karides, kabuklular gibi deniz canlılarının sindirim sistemlerinden elde edilen hidrolitik enzimler eşsiz biyoteknolojik potansiyeli olan protein molekülleridir. Sindirim enzimlerinin özelliklerinin elde edildikleri türlere ve organa göre farklılık göstermesi, çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin, salmon balığının mide suyundan elde edilen Zonase X isimli ticari enzim insan vücudundaki eski derilerin uzaklaştırılarak derinin yenilenmesini sağlamaktadır (Sarkar vd., 2010).

Balıklar poikilotermik canlılar olduğu için yaşamlarını devam ettirebilmeleri için sindirim enzimlerinin ortamın sıcaklığına adapte olması gerekir. Soğuğa dayanıklı balık türlerin genelde sıcak kanlı hayvanlara göre düşük sıcaklıkta daha yüksek enzimatik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ahsan ve Watabe, 2001; Yang vd., 2009; Fouz vd., 2021).

Türkiye su ürünleri üretimi 2020 yılı için 785.811 ton olarak gerçekleşmiştir. Toplam üretimin %69'u yetiştiricilik kaynaklı, geri kalan kısmı ise avcılık kaynaklı gerçekleşmiştir (Anon, 2021a). Türkiye su ürünleri yetiştiricilik sektöründe ekonomik olarak en önemli türler sırasıyla Avrupa deniz levreği (%35,34), gökkuşuğu alabalığı (%30,36) ve (%26,05) çipuradır (Anon, 2021b). Avrupa deniz levreği Moronidae familyasına ait bir tatlı su balığıdır (Lopez ve ark., 2015). *D. labrax* Akdeniz ülkelerinde de yetiştiriciliği yapılan önemli bir kültür türüdür. Beyaz eti, düşük yağ içeriği ve arzu edilen aroma gibi kalite özellikleri sayesinde pazardaki yeri giderek artmaktadır (Kocatepe ve Turan, 2012; Alparslan ve ark., 2014). Balıklar işlendikten sonra deri ve kemik gibi atıklar oluşmaktadır (Kamer ve ark., 2018). Baş, deri, iç organlar, kemik, kan ve bağlı su gibi balık artıkları avlanan balıkların %70-80'ini oluşturmaktadır. Bu kaynaklar çok iyi enzim potansiyeli oluşturmaktadır. Balık artıklarından enzimlerin eldesi hem düşük maliyeti hem de yüksek ticari değerinden dolayı son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmektedir (Klomklo, 2008). Deniz canlılarından elde edilen enzimler, kara canlılarından da elde edilebilmektedir. Fakat moleküler ağırlık, aminoasit kompozisyonları, optimum sıcaklık ve pH, stabilite ve katalitik güç gibi karakteristik farklılıkları vardır (Kim ve Dewapriya, 2014; Poonsin vd., 2019; Anati, vd., 2021).

Proteinlere özgü sindirim enzimleri etkili oldukları peptit bağına göre endo ve ekzopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar. Proteinlerin parçalanmasında görevli olan, peptit veya proteinlerin iç kısımlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize ederek daha kısa peptitleri oluşturan pepsin, tripsin, kimotripsin gibi enzimlere endopeptidaz denir. Proteinlerin parçalanmasında görevli olan, peptit veya proteinlerin son kısımlarındaki peptit bağlarının hidrolizini katalize ederek serbest amino asitleri oluşturan karboksipeptidaz ve aminopeptidaz gibi enzimlere ise ekzopeptidaz denmektedir (Kim ve Dewapriya, 2014). Ticari peptidazlar dünyada enzim piyasasının %60'ını oluşturan önemli bir gruptur. Balık sindirim sisteminden elde edilen en önemli enzim de tripsindir (Liu ve ark, 2011, Silva ve ark., 2011). Suda yaşayan canlılardan elde edilen tripsin enziminin molekül büyüklüğü, diğer memelilerden elde edilen tripsin enzimleri gibi 22-30 kDa arasındadır (Khandagale ve ark., 2013).

Su ürünlerinden elde edilen proteolitik enzimlerinden tripsin, gıda sanayisinde deniz ürünü aroma üretimi ve balık sosu üretiminde, süt endüstrisinde peynir üretiminde, boya sanayisinde parlak renk eldesinde, sağlık ve eczacılıkta tedavi edici, yara kapatıcı ve veteriner ilacı olarak, deterjan endüstrisinde ise temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır (Kim ve Dewapriya, 2014). Tripsin gibi alkali proteazlar yüksek sıcaklık, alkali pH, oksidasyon ajanları gibi zorlu koşullarda yüksek aktivite gösterdiği için çoğu endüstriyel uygulamalarda yüksek sıcaklıkta kullanılmaktadır (Ktari ve ark., 2012).

Tripsin ve kimotripsin gıda endüstrisinde besin takviyesi olarak ve sağlık endüstrisinde ise pankreas tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle tripsin biyomedikal deneylerde hücre ayırıcı olarak ve başarılı bir şekilde deterjan enzimi olarak kullanılmaktadır. Özellikle kan, yumurta, süt ürünleri gibi maddelerden protein hücrelerinin uzaklaştırılması konusunda oldukça başarılıdır. Yapılan çalışmalarda bu enzimlerin 1 saat boyunca deterjanlarla temasından sonra bile %80 oranından katalitik aktivite

gösterdiği tespit edilmiştir (Esposito vd., 2009). Bu dikkat çekici endüstriyel önemden dolayı saf tripsin ve kimotripsin yüksek ticari talep görmektedir.

Su ürünleri işleme endüstrisi atıklarının önemli kısmını oluşturan iç organlar günümüzde yem hammaddesi ve gübre üretiminde kullanılmakta, bir kısmı da kullanılmadan atılmaktadır. Balık iç organlarında midenin çıkış bölümünde veya bağırsakların başlangıcında yer alan, sayıları 1-200 arasında değişen uçları kapalı parmak biçiminde uzantıları olan ve sindirim enzimlerinin iyi bir kaynağını oluşturan organ pilorik sekadır ve sindirim enzimlerinin önemli kaynağını oluşturmaktadırlar. Bu çalışma ile Avrupa deniz levreği (*D. labrax*) pilorik sekasından yüksek saflıkta tripsin enziminin saflaştırılması, enzimin gıda, sağlık, kimya gibi farklı endüstrilerde kullanım olanağını belirleyen optimum pH ve sıcaklık dayanımının (stabilitesi) belirlenmesi ve böylece bölge-ülke ekonomisine yüksek katma değerli bir ürünün kazandırılabilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Hammadde ve Örnekler

Araştırmada kullanılan Avrupa deniz levreği işleme artıkları (kafa, omurga ve iç organlar) Milas/Muğla bölgesinde bulunan yerel işleme fabrikalarından (NOORDZEE Su Ürünleri İşleme tesisi) temin edilmiştir. Hasat sonrası hemen işlenmiş balıklardan alınan atıklar buzlanmış strafor kutulara yerleştirilmiş ve vakit geçirilmeden soğuk zincir kuralları içerisinde Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri İşleme Teknolojisi Laboratuvarına getirmiştir. Yaklaşık 60 kg Avrupa levrek balığı artığından elde edilen pilorik sekalar saf su ile temizlenerek bir kısmı analiz için ayrılmış, geri kalanı ise -80 °C'de saklanmışlardır. Her bir balıktan ayrılan pilorik sekaların ortalama ağırlığı 10.35±0.45 g'dır.

2.2. Enzim Ekstraktı Hazırlama

Avrupa deniz levreği pilorik sekaları (16g) 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, %0,9 NaCl tamponu (80 ml) ile ortalama 1 dakika homojenize (IKA Ultratrax Homojenizatör, Staufen, Almanya) edilmiştir (Solovyev vd., 2021). Homojenat, 600 g hızda 4 °C'de 15 dakika santrifüj (Hanil Supra-22K, Kore) edilmiş, sıvı üst faz (süpernatant) alınarak ham enzim ekstraktı olarak kabul edilmiştir. Enzim saflaştırma için ayrılan fazda otolizi önlemek için materyal -80 °C'de saklanmıştır (Balti vd., 2009; Khandagale vd., 2009; Silva vd., 2009; Freitas-Junior vd., 2012; Fouz vd., 2021; Anati vd., 2021).

2.3. Enzim Saflaştırma

Ham enzim ekstraktı 45 °C'de 30 dakika su banyosunda (Mammert WNB22) tutulmuştur. Su banyosundan sonra hemen soğutulan ekstrakt 13000 g'de 4 °C'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı üst faz ayrılmıştır. Sıvı üst faz %0-30, %30-60 ve %60-90 doyumlukta amonyum sülfat ile muamele edilerek tüm proteinler çöktürülmüştür. Ön çalışmalarda tripsin enzimin en bol bulunduğu çöktürme aralığının %30-60 arası olduğu belirlenmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürme işlemi sonrası örnek 4 °C'de bir gün bekletilmiş, sıvı üst faz 13000 g'de 4 °C 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra sıvı üst faz dökülmüş ve kalan çökelti (pellet), ortalama 3 ml 0,01 M Tris-HCl, pH 8, %0,9 NaCl tamponu ile sulandırılmıştır. 0.01 M Tris-HCL- %0,9 NaCl tamponunda tamamen çözündürülen örnekler fazla tuzun uzaklaştırılması amacı ile diyaliz torbasına (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, Thermo Scientific) yerleştirilmiştir. 20 kat fazla hacimde en az 2 kere değiştirilmek suretiyle aynı tampona karşı diyaliz işlemi 1 gece boyunca 4 °C de devam edilmiştir. Diyaliz işlemi sonrası örnek 0,22 µ şırınga filtreden (Millex-GP) geçirilerek kolona yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Son olarak örnek, tripsin enziminin yüksek saflıkta eldesi için otomatik protein saflaştırma cihazına (GE Healthcare AktaPrime Plus) bağlı Hi-Prep 16/60 Sephacryl S200 HR (GE Healthcare) kolonuna yüklenmiştir. Cihaz, 42 ml h⁻¹ akış hızı ve 0,5 mPa kolon basıncı ayarlanarak çalıştırılmış, kolon çıkışında örnek mikroprotein, spesifik enzim aktivitesi ve elektroforetik analizler için 2 ml'lik hacimler halinde toplanmıştır. Her bir hacimde yapılan analizler sonucunda spesifik enzim aktivitesi birbirine yakın olarak hesaplanan bölüntüler birleştirilmiş ve Amicon Ultra-15 (Merck Millipore

UFC900308) ultra santrifüj tüplerinde 5000 g, 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün üstünde kalan sıvı kısım alınmıştır. (Silva vd., 2009; Ünlüsayın vd., 2009; Barkia vd., 2010; Freitas-Junior vd., 2012; Ktari vd., 2013).

2.4. Total Protein Hesaplama

Örneklerin toplam protein içerikleri Mikroprotein Kit (Sigma TP0300) ile Lowry vd., (1951) ve Peterson (1977) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır.

Kör deney için de bir deney tüpüne 1 ml saf su eklenmiş, diğer deney tüplerine de 1 ml seyreltilmiş örnek alınmıştır. Standarda, köre ve örnek tüplerine 0,1 ml %0,15'lik DOC (deoxycholate) ilave edilerek iyice karıştırılmış, 10 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 0,1 ml %72'lik TCA (trichloroacetic acid) eklenip tekrar iyice karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra çözeltiler 20000 g 4°C de 15 dk santrifüj edilmiş, elde edilen çökelti 1 ml Lowry ajanı ile çözündürülmüştür. 1 ml saf su ile durulanan örnekler 20 dakika oda sıcaklığında bırakılarak her tüpe Folin Ciocalteu's Phenol Reagent çalışma solüsyonundan 0,5'er ml ilave edilerek renk oluşumu için 30 dakika beklenmiştir. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201V, Japonya) küvetlerine alınan solüsyonlar en yüksek absorbans değerinin elde edildiği dalga boyu olan 700 nm'de analiz edilmiştir. Tüm okumalar 30 dakika içinde tamamlanmıştır. Bovin serum albimin standart kullanılarak hazırlanmış kalibrasyon eğrisine karşılık gelen protein konsantrasyonlarına karşı örneklerin absorbans değerleri kodlanarak protein içerikleri µg/ml cinsinden tespit edilmiştir (Lowry vd., 1951; Peterson, 1977).

2.5. Spesifik Enzim Aktivitesi

Spesifik enzim aktivite analizi için örnekler, dimethylsulphoxide (DMSO) ile hazırlanan 8 mM N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) (30µl), enzim (30µl) ve 0,01 M Tris-HCl-%0,9 NaCl (140µl) tamponu beraber oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 410 nm dalga boyunda Multiskan GO Microplate Spectrophotometre UV/Vis (Thermo-Scientific 51119300) cihazında okuması yapılmıştır. Çıkan sonuçlar aşağıdaki formüle göre total aktivitesi hesaplanmıştır (Freitas-Junior vd., 2012; Charu ve Ragini, 2020).

$$\frac{(A - A_0) \cdot \text{Toplam örnek hacmi (ml)} \cdot 1000 \cdot df}{8800 \cdot \text{İşlem zamanı (dak)} \cdot \text{Enzim Mik (ml)}} \Rightarrow \text{Total Aktivite}$$

A= Örnek absorbans değeri A₀=Kör absorbans değeri

2.6. Sodium Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-Page)

Örneklerin tanımlanabilmesi için bir sonraki aşama olan SDS-Page elektrofrez analizi Laemmli (1970) metoduna bağlı kalınarak %4 yığıma ve %12 ayırma jeli kullanılarak yapılmıştır. Örnekler yığıma jel kuyucuğunda 25 µg protein olacak şekilde 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, %10 SDS, Gliserol ve bromfenolblue ile hazırlanan yükleme tamponu ile karıştırılarak 100 °C'de 4 dakika ısıtılarak denatürasyonu sağlanmıştır. Bromfenolblue jelin en alt kısmına gelinceye kadar 30 mA direnç uygulanmıştır. Elektrofrez uygulamasında Sigma Aldrich S8445 ve Sigma Aldrich M3193 protein markerlar kullanılmıştır. Elektrofrez işlemi sonrası jeller, %0,15 commassie blue R-250, %40 metanol ve %7 asetik asit bulunan boya çözeltisi içerisinde su banyosunda 4 saat kadar boyanmıştır. Jeldeki fazla boya, %5 metanol ve %7,5 asetik asit içeren çözelti ile her 20 dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle, bir saat boyunca yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Jel boyadan arındırıldığında çözeltilerden çıkarılmış ve beyaz ışık altında bantlar gözlemlenmiştir.

2.7. Optimum pH ve Sıcaklık Analizleri

Optimum pH analizinde 0.01 M sodyum asetat (pH 4-6), 0,01 M Tris-HCl (pH 7-9), ve 0,01 M Glisin-NaOH (pH 10) tamponları kullanılmıştır. Analiz, total aktivite metodu ile aynıdır. 140µl Tampon 30 µl örnek ile karıştırıldıktan sonra 30 µl BAPNA (8µM) eklenerek 10 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak 410 nm dalga boyunda mikroplate reader cihazında okuma yapılmıştır (Balti vd., 2009; Barkia vd., 2010; Silva vd., 2011; Poonsin vd., 2019).

Optimum sıcaklık analizinde 30, 40, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C sıcaklıklarda (Binder BD53 İnkübatör) 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 tamponunda yine aynı şekilde 410 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

2.8. Sıcaklık ve pH Stabilite Analizleri

pH stabilite analizinde, optimum pH analizinde 0,01 M sodyum asetat (pH 4-6), 0,01 M Tris-HCl (pH 7-9), ve 0,01 M Glisin-NaOH (pH 10) tamponları kullanılmıştır. Fakat bu analizde enzim ile tampon 1:1 oranında karıştırılmış ve 25 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonra total aktivite analizi yapılmıştır. 140µl tampon 30 µl örnek ile karıştırıldıktan sonra 30 µl BAPNA (8µM) eklenerek 10 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. Son olarak 410 nm dalga boyunda mikropate reader cihazında okuma yapılmıştır (Van Hau ve Benjakul., 2006; Silva vd., 2011; Khangembam ve Chakbarti, 2015; Poonsin vd., 2019).

Sıcaklık stabilite analizinde ise, Tris-HCl pH 8.0 tamponu ile enzim 1:1 oranında karıştırılmıştır. 30-40-50-55-60-65-70°C sıcaklıklarda su banyosunda (Memmert WNB45) 30 dakika bekletilmiştir ve hemen buza konularak sıcaklığı 25 °C' ye düşürülmüştür. Sonra total aktivite analizi yapılmıştır (Van Hau ve Benjakul., 2006; Silva vd., 2011; Zamani ve Benjakul., 2015).

Okumaların hepsi 410 nm dalga boyunda mikropate reader cihazında yapılmıştır. Hesaplamalar yukarıda "Total Aktivite Analizi" başlığı altında belirtilen formül ile yapılmıştır.

2.9. İstatiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 23 istatistiki paket programından yararlanılmış ve sonuçlar, faktöriyel deneme desenine varyans kaynakları kullanılarak $P < 0,05$ önem düzeyinde test edilmiştir. Faktörlerin seviye ortalamalarının arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan testi kullanılmıştır. Tüm analizler üç tekrarlı analiz sonuçlarının ortalaması ve standart hatası olarak verilmiştir.

3. SONUÇ ve TARTIŞMA

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından tripsin üç aşamalı saflaştırma (Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz ve Sephadex G200) ile elde edilmiş ve bulgular Tablo 1'de verilmiştir. Bu çalışmada ham enzim ekstraktı (1,13 Units/mg protein) saflaştırmanın ilk basamağında farklı bölüntülerde amonyum sülfat (%0-90) ile çöktürülmüştür. Çökeltinin en yüksek spesifik tripsin aktivitesini gösterdiği aralıktaki (%30-60) bölüntü alınarak diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Tripsin amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz basamaklarında 2-3 kat saflaştırma ve %10-20 verimlilik rakamları yakalanmıştır (Tablo 1). Benzer çalışmalarda 1-2 kat saflaştırma ve %30-60 arası verimlilik rakamları yakalanmıştır (Silva vd., 2011; Freitas Junior vd., 2012; Ktari vd., 2012; Semiz vd., 2013; Khandagale vd., 2017). Verimlilik değerlerinin benzer çalışmalardan düşük olması avrupa deniz levreği ham ekstraktının total aktivite sonuçlarının yüksekliğinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

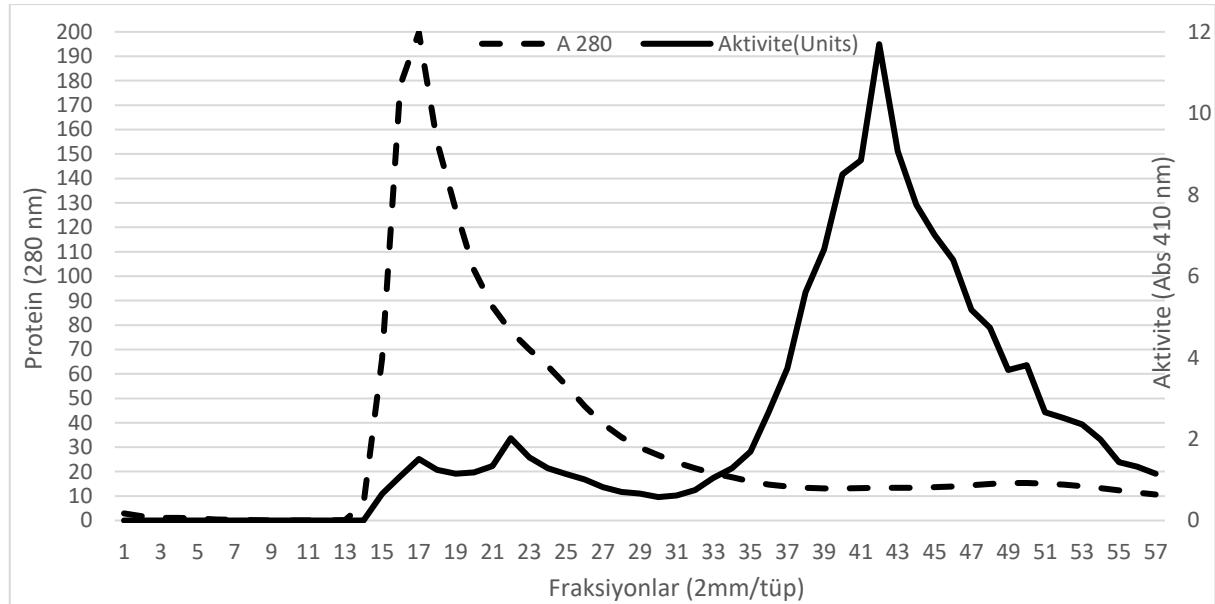
Çalışma sonuçlarına göre diyaliz işlemi sonucunda saflaştırma katsayısı 1,87'den 2,30'a çıkmıştır (Tablo 1). Bu sonuçlar diyalizin spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısını arttırdığını göstermektedir. Bir gece diyalizde bekletilen ekstrakt bir sonraki saflaştırma aşaması olarak boyut dışlama kromatografisi (Sephacryl S-200) kolonuna yüklenmiştir. Kolondan geçirilen örneğin daha sonra mikro plaka okuyuculu spektrofotometre ile (Multiskan GO Microplate Spectrophotometre) 410 nm dalga boyunda aktivite belirlenmesi için ölçümler yapılmıştır. Boyut dışlama kolon kromatografisi grafiğinde bir büyük bir de çok küçük iki pik elde edilmiş yapılan aktivite testleri sonucunda en yüksek aktivitenin belirlendiği bölüntüler 40-44 numaralı tüplerde tespit edilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından tripsin enziminin saflaştırma aşaması analiz sonuçları

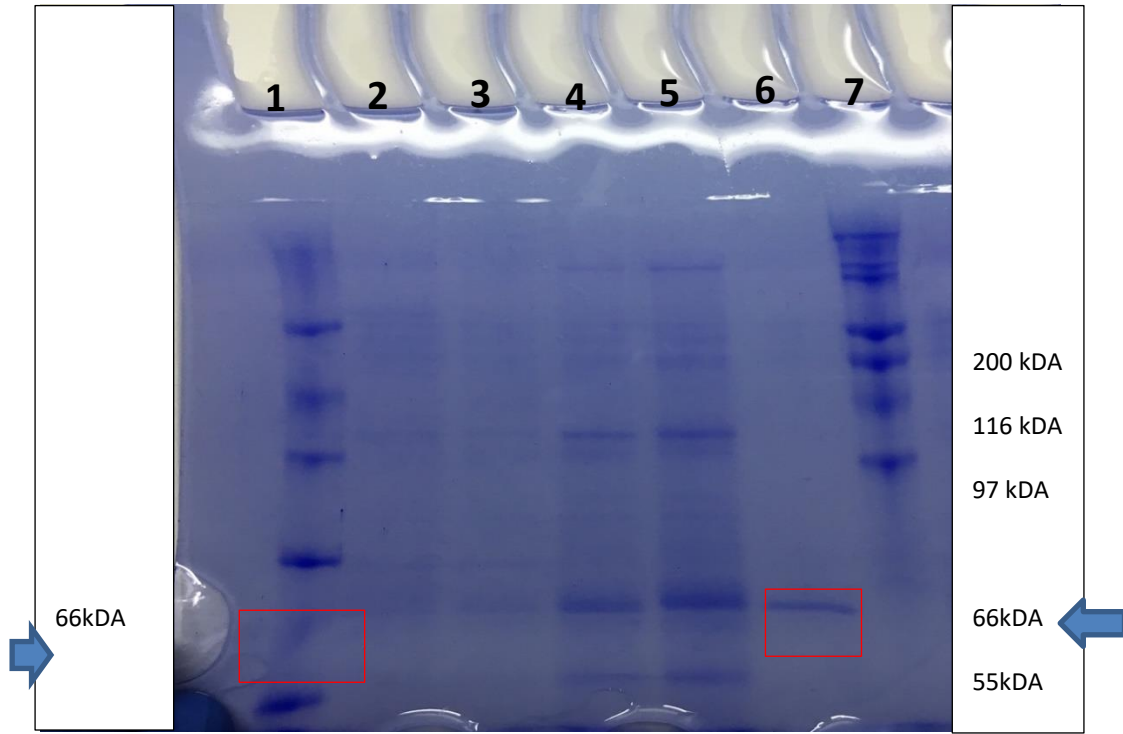
AŞAMA	Total Protein (mg)*	Total Aktivite (Unit)*	Spesifik Aktivite (U/mg)*	Verimlilik (%)*	Saflaştırma*
Ham ekstrakt	470,52 ±15,03 ^a	533,51 ±12,20 ^a	1,13 ±0,02 ^b	100,00 ±0,00 ^a	1,00 ±0,00 ^b
Enzim aktifleştirme	421,21 ±8,64 ^b	534,53 ±10,36 ^b	1,27 ±0,02 ^b	100,19 ±0,43 ^b	1.12 ±0,04 ^b
Amonyum Sülfat Çöktürme	41,63 ±1,56 ^c	87,59 ±1,54 ^c	2,11 ±0,11 ^b	16,41 ±0,56 ^c	1,87 ±0,10 ^b
Diyaliz	22,83 ±0,96 ^d	59,43 ±1,10 ^d	2,60 ±0,13 ^b	11,14 ±0,18 ^d	2,30 ±0,13 ^b
Sephadex G200	0,77 ±0,08 ^e	45,86 ±1,04 ^d	59,26 ±1,97 ^a	8,60 ±0,20 ^e	52,71 ±3,93 ^a

*Ortalama ±Standart hata (N=3), Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak önemli fark vardır (P<0,05).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından farklı saflaştırma aşamalarında tripsin enziminin aktivitesi, spesifik aktivitesi, verimlilik ve saflaştırma katsayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Aynı şekilde, tripsin enzimi total protein değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 1).

**Şekil 1.** Boyut dışlama kromatografisi (Sephacryl S 200) sonrası bölüntülerin aktivite ve toplam protein grafiği

Örneklerin kolon kromatografisi sonrasında 52,71 kat saflaştırılma, %8,60 verimlilik ve 59,26 units/mg tripsin spesifik aktivite değerlerine ulaşıldığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Enzimin saflık kontrolü için yapılan SDS PAGE analizinde Tripsin enzimine ait tek bant (24 kDA) görüntülenmiştir (Şekil 1).



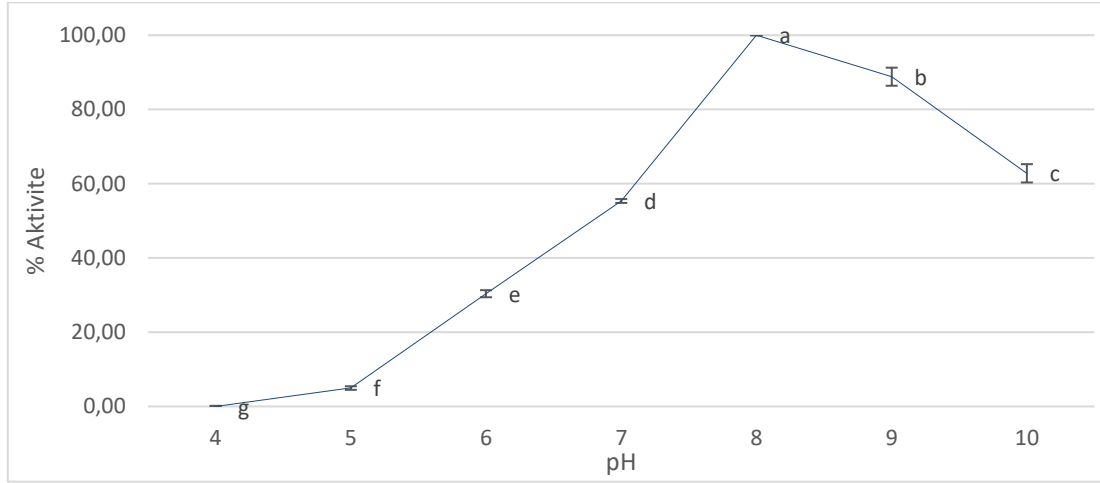
Şekil 1. Avrupa deniz levreği (*D.labrax*) pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin SDS-Page Jel Görüntüsü (1. Düşük molekül ağırlığındaki marker, 2.Ham ekstrakt, 3. Enzim aktifleştirme, 4. Amonyum sülfat ile çöktürme, 5. Diyaliz, 6. Sephadex G200, 7. Yüksek molekül ağırlığındaki marker)

Genel olarak balıklardan elde edilen tripsin enziminin molekül büyüklüğü 22-28 kDa arasında olduğu belirtilmiştir (Ktari vd., 2012). Avrupa deniz levreğinden saflaştırılan tripsinin molekül ağırlığı *Epinephelus coioides* (Liu vd., 2012), Kaliforniya Körfezi'nde bulunan pasifik uskumrusu (Valdez-Melchor vd., 2013), pasifik beyaz karides (Sephan vd., 2015), *Labeo rohita* (Charu ve Ragini, 2020) ve *Coryphaena hippurus* (Dos Santos vd., 2020) gibi su ürünlerinden elde edilen tripsin ile yüksek benzerlik göstermektedir.

Yapılan benzer çalışmalarda tripsin enziminin saflaştırma katsayısı *Boops boops*'da 8,7 kat (Barkia vd., 2010), *Salaria basilisca*'da 4,2 kat (Ktari vd., 2012), *E. coioides*'de 161,85 kat (Liu vd., 2012), Karadeniz hamsisinde (*Engralius encrasicolus*) 6,23 kat (Temiz vd., 2013), pasifik uskumrusunda (*Scomberomorus sierra*) 11,93 kat (Valdez-Melchor vd., 2013), *Cirrhinus mirgala*'da 35,64 kat (Khangembam ve Chakbarti, 2015), beyaz karideste 50,4 kat (Sephan vd., 2015), *Sardinella longiceps*'de 23,5 kat (Khandagale vd., 2017) ve *C. hippurus*'te 2,99 kat (Dos Santos vd., 2020) olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımıza göre Avrupa deniz levreğinden tripsin enziminin saflaştırma katsayısı 52,71 kat olarak bulunmuş olup diğer balık türlerinde yapılan çalışmaların çoğundan yüksek oranda saflaştırma yaptığımız ortaya çıkmaktadır. Liu vd., (2012) çalışmasında saflaştırma katsayısının yüksek olmasının sebebi 3 basamak kolon kullanılması olduğu düşünülmektedir.

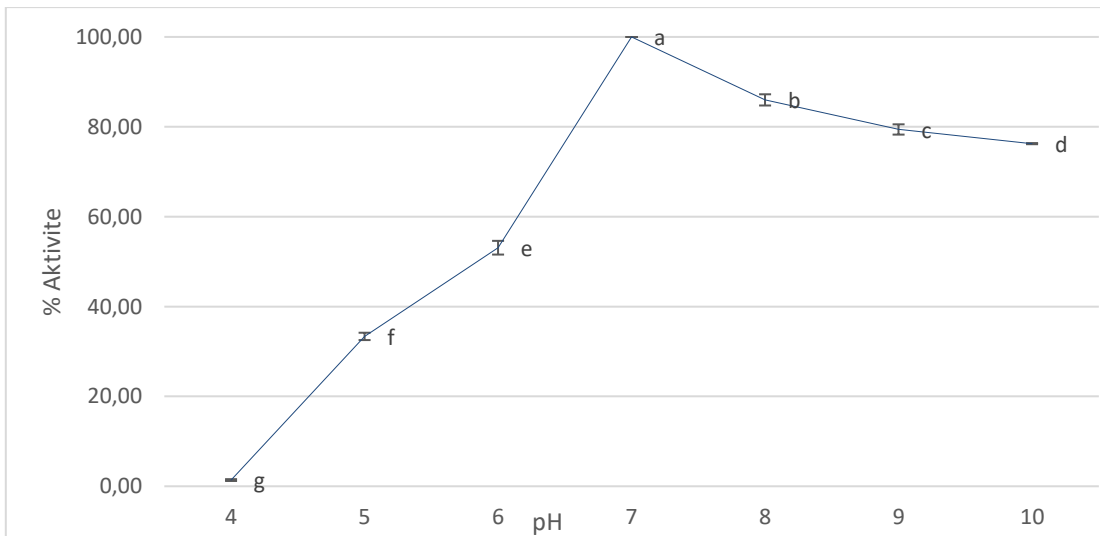
Çalışma bulgularımıza göre saflaştırılan tripsin enziminin spesifik aktivitesi 59,26 units/mg proteindir (Tablo 1). Bu da *Sepia officinalis* (Balti vd., 2009), *B. boops* (Barkia vd., 2010), *Diapterus rhombeus* (Silva vd., 2011), *Salaria basilisca* (Ktari vd., 2012), Karadeniz hamsisi (Temiz vd., 2013), *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), *Luphiosilurus alexandri* (Santos vd., 2016), *Rutilus frisii* Kutum'dan (Hasebi vd., 2020) çok yüksek olup; *S. longiceps* (Khandagale vd., 2017) ile 2 adet boyut dışlama kolonu basamağı uygulanmış *Theragra chalcogramma* (Kishimura vd., 2008)'nin elde ettiği tripsin enziminin spesifik aktivitesine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Tripsin enziminin endüstriyel anlamda kullanımını belirleyen en önemli özelliği pH ve sıcaklık stabilitesidir. Bu kapsamda, Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin pH ile sıcaklık stabilite testleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 2 ve 3'te sunulmuştur.



Şekil 2. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. (Sodyum asetat_pH 4-6, Tris-HCl_pH 7-9 ve Glisin-NaOH_pH 10)(Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır (P<0,05)).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan analiz sonuçlarına göre pH 4'den pH 8'e kadar spesifik aktivite düzenli olarak artmış (P<0,05), takiben pH 9 ve 10'da da önemli (P<0,05) oranda azaldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Sonuç olarak enzimin optimum pH değeri pH 8 olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Siniperca chuatsi* (Lu vd., 2008), *Gadus macrocephalus* (Fuchise vd., 2009), *D. rhombeus* (Silva vd., 2011), *E. coioides* (Liu vd., 2012), Pasifik uskumru (Valdez-Melchor vd., 2013), *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), beyaz karides balığı (Sephan vd., 2015), *Engraulis achoita* (Lamas vd., 2017), *C. hippurus* (Dos Santos vd., 2020), *L. rohita* balığı (Charu ve Ragini, 2020) gibi farklı su ürünlerinden elde edilen tripsin enziminin optimum pH değerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaların optimum pH sonuçları da bulgularımız ile uyumludur.

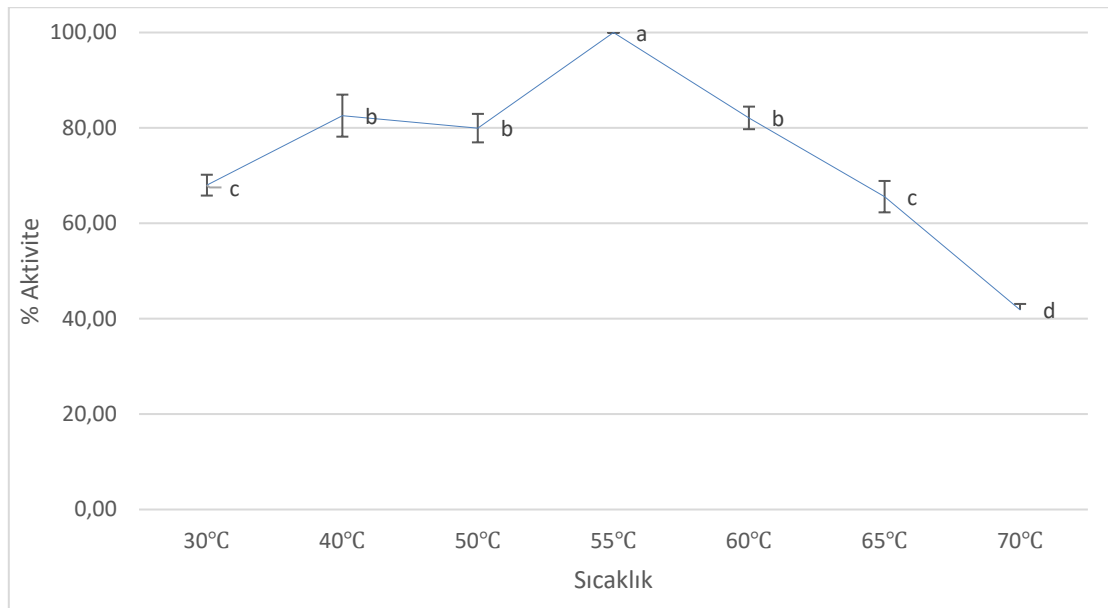


Şekil 3. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsinin, farklı pH'lar da 25 °C'de, 30 dak. inkübasyon sonrası stabilitesi. (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır (P<0,05)).

Avrupa deniz levreği pilorik sekasından yüksek saflıkta elde edilen tripsin enziminin farklı pH'lar da 25 °C'de, 30 dk. inkübasyon sonrası stabilitesi Şekil 3'te verilmiş olup en iyi stabilite değeri pH 7,0 de belirlenmiştir. Bu sonuca göre pH 4'ten pH 7'ye kadar stabilite önemli ($P<0,05$) oranda artmış, sonra pH 7'den pH 10'a doğru önemli ($P<0,05$) oranda azalarak %76,25'ya düşmüştür (Şekil 3). Sonuçlar tripsin enziminin pH 7-10 arasındaki spesifik aktivitesinin diğer pH değerlerine göre önemli oranda yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 3).

Yapılan benzer bir çalışma da sucul canlılardan elde edilen tripsinin pH 7,5-10,0 arasında stabil kaldığı bildirilmiştir (Freitas-Junior vd., 2012). Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin pH stabilitesi, *S. chuatsi* (Lu vd., 2008), *G. macrocephalus* (Fuchise vd., 2009), *B. boops* (Barkia vd., 2010), *D. rhombeus* (Silva vd., 2011), beyaz karides balığı (Sephan vd., 2015), *S. longiceps* (Khandagale vd., 2017), *C. hippurus* (Santos vd., 2020) ve *Arapima gigas* (Freitas-Junior vd., 2021) türleri ile benzer stabilite aralığı gösterdiği, *E. coioides* (Liu vd., 2012)'in bulgularından farklı olarak daha geniş aralıkta stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımızdan farklı olarak *Pricanthus macracanthus* (Van Hau ve Banjakul, 2006), *A. gigas* (Freitas-Junior vd., 2012) ve *S. basilisca* (Ktari vd., 2012) türlerinden elde edilen tripsinlerin daha geniş pH aralığında stabilite gösterdiği belirlenmiştir. Bu farkın sebebi olarak balık türlerinin farklılığı ve türlerin yaşama ortamı farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

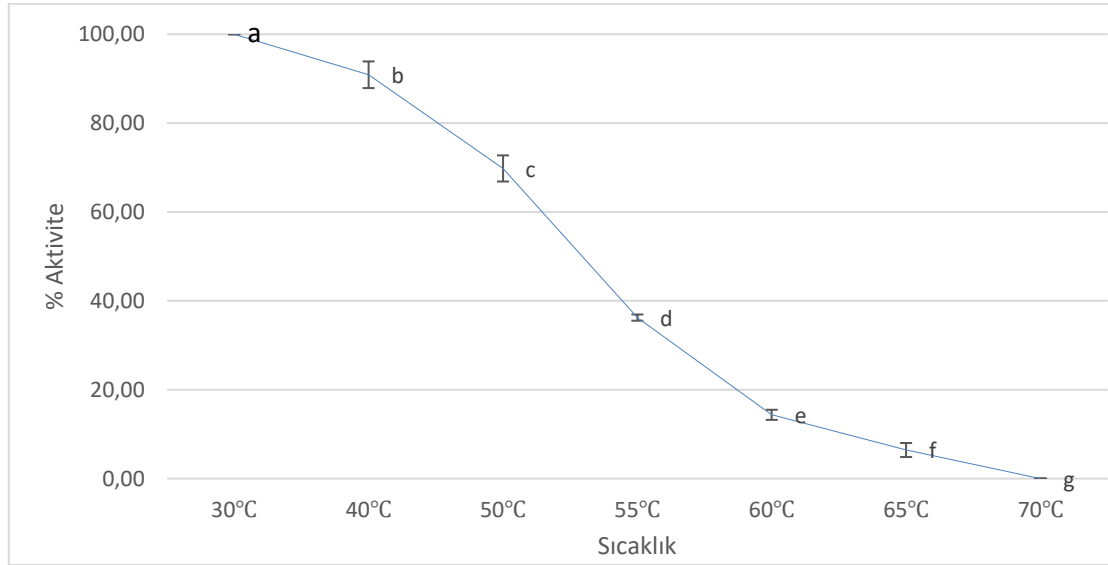
Sıcaklığın Avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enzimi üzerine etkisi total aktivite formülü ile hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4 ve 5'te sunulmuştur.



Şekil 4. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır ($P<0,05$)).

Çalışma bulgularımıza göre pilorik sekadan saflaştırılan tripsinin optimum spesifik aktivite gösterdiği sıcaklık 55 °C olarak tespit edilmiştir. Bu sıcaklıktan sonra düzenli olarak aktivitede düşüşler belirlenmiş olup, enzimin 70 °C'de %60 oranında aktivite kaybına uğradığı belirlenmiştir (Şekil 4). Bulgularımızla uyumlu şekilde *S. basilisca* balığının iç organlarından elde edilen tripsinin optimum sıcaklığı 55 °C olup, 70°C'de aktivitesinin yarısını kaybettiği bildirilmiştir (Ktari vd., 2012). Benzer şekilde Silva vd. (2011) tarafından saflaştırılan tripsin enziminin optimum sıcaklığı 50-55 °C aralığında olup, 70 °C'de aktivitenin %80'i kaybolmuştur. Diğer bir çalışmada da *P. macracanthus* balığı pilorik sekasından elde edilen tripsinin ise 55 °C'de en yüksek aktiviteyi göstermiş olduğu, aktivitesini 70 °C'de %90 oranında kaybettiği bildirilmiştir (Van Hau ve Banjakul, 2006). Ayrıca

Pasifik uskumru (Valdez-Melchor vd., 2013), beyaz karides (Sephan vd., 2015), *E. achoita* (Lamas vd., 2017), *C. hippurus* (Santos vd., 2020) gibi farklı deniz ürünlerinde yapılan tripsin enziminin optimum sıcaklık sonuçları ile bulgularımız benzerdir. *C. mirgala* (Khangembam ve Chakbarti, 2015), *Colossoma macropomum* (Balti vd., 2010), *B. boops* (Barkia vd., 2010) ve *L. rohita* (Charu ve Ragini, 2020)'da yapılan çalışma sonuçlarına göre daha yüksek sıcaklıklarda aktivitenin korunduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. Avrupa deniz levreği pilorik sekasından saflaştırılan tripsin enziminin 25°C'de, 30 dak. inkübasyon sonrası stabilitesi. (Farklı harflerle gösterilen değerler arasında istatistiki olarak fark vardır (P<0,05)).

Çalışma bulgularımıza göre avrupa deniz levreği pilorik sekasından elde edilen tripsin enziminin 30 dakika farklı sıcaklıklarda su banyosunda inkübasyon sonucunda 30°C'de en yüksek spesifik aktiviteyi göstermiş olduğu ve 70°C'de tamamen denatüre olarak stabilitenin kaybolduğu belirlenmiştir. Özellikle 50°C'den sonra aktivitenin yüksek hızda azaldığı görülmüştür (Şekil 5). Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak, Balti vd. (2009) *S. officinalis* mürekkep balığının hepatopankreasından elde edilen tripsin enziminin spesifik aktivitesinde 50°C'den sonra hızlı bir düşüş görüldüğünü ve 70°C'de tamamen denatüre olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, *B. boops* (Kopez) balığından saflaştırılan tripsin enziminin 55°C'den sonra hızlı bir aktivite kaybettiği, 60°C'de 15 dakika sonra ise tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir (Barkia vd., 2010). *E. coioides* balığından elde edilen tripsin enziminin sıcaklığa dayanıklılığı 50°C'den sonra azalmış olup, 70°C'de %80'i kaybolmuştur (Liu vd., 2012). *S. longiceps* iç organlarından elde edilen tripsin üzerinde yapılan stabilite deneylerinde 50°C'den sonra spesifik aktivitenin hızla azaldığı ve 70°C'de %90'ını kaybettiği görülmüştür (Khandagale vd.,2017). Tirsi balığından elde edilen tripsinin ise 50°C'den sonra yüksek aktivite kaybı yaşadığı, 60°C'de ise tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir (Zamani vd., 2017).

Elde edilen tripsin enzimi sıcaklık stabilitesi Sephan ve ark., (2015) ve Freitas-Junior vd., (2012) haricinde benzerlik göstermiştir. Sephan ve ark., (2015) ve Freitas-Junior vd., (2012) tarafından elde edilen tripsinlerin sıcaklık stabilitesi elde ettiğimiz tripsinin stabilitesinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunların sebebi söz konusu araştırmadaki analiz farklılıkları olduğu düşünülmektedir. Araştırma metodunda stabilite analizinde 30 dakika su banyosunda tutulurken, belirtilen yazarların analizlerinde 15 dakika su banyosunda tutulduğu görülmüştür.

Sonuç olarak Avrupa levrek balığı ülkemizde ve bölgemizde yetiştiricilik üretiminde ekonomik olarak önemli bir tür olup önemli miktarda işlenerek değerlendirilmekte ve bunun sonucunda yüksek miktarda iç organ atıkları ortaya çıkmaktadır. Mevcut çalışmamızla deniz levreği sindirim sistemi

pilorik sekasından üç aşamalı saflaştırma yöntemi uygulanarak yüksek saflıkta tripsin enzimi saflaştırılmıştır. Böylece söz konusu balık atıklarından pek çok endüstri için kullanım olanağı sunan, katma değeri yükseltilmiş ürün geliştirilmiştir. Sindirim enzimlerinin kullanımını belirleyen en önemli unsur olan pH ve sıcaklık stabilite testleri de yapılarak saflaştırılan tripsin enzimlerinin kara hayvanlarından saflaştırılana göre daha geniş pH ve sıcaklık aralıklarından stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. Avrupa deniz levreği balığından elde ettiğimiz tripsin enzimi literatürde bildirilen çoğu su ürünleri ve kara hayvanlarından saflaştırılan enzimlerden daha iyi özellikler göstermiştir. Saflaştırılan tripsin enziminin geniş sıcaklık ve pH değeri aralığına sahip olduğu göz önüne alındığında deterjan, boya, sağlık ve gıda endüstrisi gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanımı mümkün olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Nihat KARASU'nun Doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir. Çalışma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 16/156 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alparslan, Y., Hasanhocaoğlu, H., Metin C., & Baygar, T., 2014. Determination of meat quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sold at different selling areas, *Emirates Journal of Food Agriculture*, 26(3), 293-301. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16528>
- Anati, N. J., Siti Roha, A. M., & Normah, I., 2021. African catfish (*Clarias gariepinus*) visceral protease: its specific activity and molecular weight at different purification stages. *Food Research*, 5(2), 120-128. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(2\).447](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).447)
- Anonim, 2021a. T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Su Ürünleri İstatistikleri. www.tarimorman.gov.tr. 11 sayfa.
- Anonim, 2021b. *Su Ürünleri 2020 Bülteni*. Türkiye İstatistik Kurumu. www.data.tuik.gov.tr. 37252.
- Balti, R., Barkia, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M., 2009. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterisation. *Food Chemistry*, 113, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.059>
- Barkia, A., Bougatef, A., Nasri, R., Fetoui, E., Balti, R., & Nasr., M., 2010. Trypsin from the viscera of bogue (*Boops boops*): Isolation and characterisation. *Fish Physiology Biochemical*, 36, 893-902. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9365-z>
- Charu, B & Ragini, G., 2020. Optimization and characterization of trypsin of *Labeo rohita* from its visceral waste. *GSC Advanced Research and Reviews*, 3(2), 39-47. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2020.3.2.0041>
- Dos Santos, D. M. R. C., Dos Santos, C. W. V., De Souza, C. B., De Albuquerque F. S., Oliveira, J. M. S., & Pereira, H. J. V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): purification, characterisation and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*, 25, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101584>
- Fouz, M. F., Sumanarathne, A. S., Seneviratne, V. N., & Rajapakse, S., 2021. Investigation of enhancement in thermal stability of trypsin in modified Mg/Al layered double hydroxides. *Ceylon Journal of Science*, 50(1), 29-38. <http://doi.org/10.4038/cjs.v50i1.7844>
- Freitas-Júnior A. C. V., Costa H. M. S., Icimoto M. Y., Machado, M. F. M., Ferreira, J. C., De Oliveira, V. M. S. B. B., Buarque, D. S., & Bezerra, R. S., (2021). Substrate specificity, physicochemical and kinetic properties of a trypsin from the giant Amazonian fish pirarucu (*Arapima gigas*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102073. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102073>

- Freitas-Júnior A. C. V., Costa H. M. S., Marcusci, M., Ícimoto M. Y., Hirata I. Y., Marcondes M., Carvalho, L. B. Jr, Oliveira, V., & Bezerra, R. S. (2012). Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chemistry*, 133(4), 1596–1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.056>
- Fuchise, T., Kishimura, H., Sekizaki, H., Nonami, Y., Kanno, G., Klomklao, S., & Benjakul, S., 2009. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chemistry*, 116, 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.078>
- Hasebi, Z., Motamedzadegan, A., Madani, R., & Zamani, A., 2020. Extraction and purification of trypsin from intestine of Caspian kutum (*Rutilus frisii* Kutum) and calculation of its kinetic parameters and half life. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28(5),1-13. <https://doi.org/10.22092/ISFJ.2019.119548>
- Khandagale, S. A., Sorojini, B. K., Kumari, S., Sumanjoshi S. D., & Nooralabettu, K. 2015. Isolation, purification and biochemical characterization of trypsin from Indian mackerel (*Rastralliger kanagartha*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(4), 354-367. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.777864>
- Khandagale, S. A., Mundodi, L., & Sorojini, B. K. 2017. Isolation and characterization of trypsin from fish viscera of oil sardine (*Sardinella longiceps*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 5(2), 33-37.
- Khangembam, B. K., & Chakrabarti, R. 2015. Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. *Food Chemistry*, 175(2015) 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.140>
- Kim, K. S., & Dewapriya, P., 2014. *Enzymes from fish processing waste materials and their commercial applications. seafood processing by-products*. New-York, ABD.
- Klomklao, S. (2008). Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30, 37–46.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., & Benjakul, S., 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 682-689.
- Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakuş, S., & Chun, B. S., 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 106, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.056>
- Kocatepe, D., & Turan, H. 2012. Chemical composition of cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) muscle. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51(1): 33-39.
- Ktari, N., Khaled B. H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., & Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry*, 130, 467-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.015>
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 – 685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamas, D. L., Yeannes, M. I., & Massa, A. E. 2017. Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita*: partial purification and characterization. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 98(2), 103 – 112. <https://doi.org/10.5114/bta.2017.68309>
- Liu, C. H., Shiu, Y. L., & Hsu., J. L. 2012. Purification and characterization of trypsin from the pyloric ceca of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Physiology Biochemical*, 38, 837-848. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9571-3>
-

- Lopez, R., Pontual, H., Bertignac, M., & Mahevas., S. 2015. What can exploratory modelling tell us about the ecobiology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a comprehensive overview. *Aquatic Living Resources*, 28, 61-79. <https://doi.org/10.1051/alr/2015007>
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lu, B. J., Zhou, L. G., Cai, Q. F., Hara, K., Maeda, A., Su, W. J., & Cao, M. J. 2008. Purification and characterisation of trypsin from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chemistry*, 110, 352-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.010>
- Marcuci, M., Esposito, T. S., Machado, M. F. M., Hirata, I. Y., Silva, M., Oliviera, V., & Bezerra, R. S. 2010. Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2010) 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.155>
- Olives-Burrola, H., Ezequieea-Brauer, M. J., Rouzaud-Sandez, O., & Pacheco-Aguliar, R. 2001. Proteaz activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical sierra *Scomberomorus concolor*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 51-64.
- Poonsin, T., Simpson, B. K., Benjakul, S., Visessanguan, W., Yoshida, A., Osatomi, K., & Klomkiao, S., 2019. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8130(18), 1-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.122>
- Santos, D. M. R. C., Santos, C. W. V., De Souza, C. B., De Albuquerque, F. S., Oliveira, J. M. S., & Pereira, H. J. V. 2020. Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish): Purification, characterization and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25(2020), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101584>
- Sarkar S, Pramanik A, Mitra A, & Mukherjee J. (2010). Bioprocessing data for the production of marine enzymes. *Marine Drugs*, 8(4), 1323–1372. <https://doi.org/10.3390/md8041323>
- Sephan, T., Benjakul, S., & Kishimura, H. 2015. Purification and characterization of trypsin from hepatopancreas of pacific white shrimp. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 388-397. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12147>
- Shahidi, F., Janak & Kamil, Y. V. A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2001), 435–464.
- Silva, J., Esposito, T., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R., & Bezzerra, R. 2011. Purification and partial characterisation of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry*, 129, 777-782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.019>
- Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Rogozhin, E. A., & Moyano, F. J. 2021. Seasonal changes in kinetic parameters of trypsin in gastric and agastric fish. *Fish Physiology and Biochemistry volume*, 47, 381-391. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00919-0>
- Temiz, H., Üstün, Ş. N., Turhan, S., & Aykut, U. 2013. Partial purification and characterization of alkaline proteases from the Black Sea anchovy (*Engralius encrasicolus*) digestive tract. *African Journal of Biotechnology*, 12(1), 56-63. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2900>
- Ünlüsayın, M., Erdilal, R., & Çağatay, T. 2009. Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler. *Journal of FisheriesSciences.com*, 3(4), 298-309.
- Valdez-Melchor, R. G., Ezquerra-Brauer, J. M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Castillo-Yanez, F. J., Cardenas-Lopez, J. L., 2012. Purification and partial characterization of trypsin from the viscera of tropical Sierra (*Scomberomorus sierra*) from the gulf of califronia. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 694-701. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00667.x>

- Van Hau, P., & Benjakul, S. 2006. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Pricanthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry* 30, 478-495.
- Villalba Villalba, A. G., Ramirez-Suarez, J. C., Pacheco-Aguilar, R., Valenzuela-Soto, E. M., Lugo-Sanchez, M. E., & Figueroa-Soto, C. G. 2012. Purification and Characterization of Chymotrypsin from Viscera of Vermiculated Sailfin Catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 121–130. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9684-3>
- Yang, F., Su, W. J., Lu, B., Wu, T., Hara, K., & Cao, M. 2009. Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry*, 116, 860-866. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.035>
- Zamani, A., Madani, R., Rezaei, M., & Benjakul, S. 2017. Antioxidative activity of protein hydrolysate from the muscle of common kilka (*Chipeonella cultriventris caspia*) prepared using the purified trypsin from common kilka intestine. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(1), 2-16. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1073822>
- Zamani, A., & Benjakul, S. 2012. *Trypsin from unicorn leatherjacket (Aluterus monoceros) pyloric caeca: purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity*. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Environmental, Malayer University. IRAN.
- Zhou L., Budge S. M., Ghaly A. E., Brooks M. S., & Dave, D. (2011). Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), 104–123. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2011.104.123>
-

İzmir Körfezi'nde Yabani Mercan Balığı (*Pagellus acarne* Risso, 1827)'nin Üreme Özellikleri

Reproductive Properties of Axillary Seabream (*Pagellus acarne* Risso, 1827) in İzmir Bay

Dilek İlhan^{1,*}, Sencer Akalın¹, Tuncay Murat Sever¹

¹Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova-İzmir, Türkiye

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

Geliş: 16.12.2021

Kabul: 25.03.2022

Yayın: 01.06.2022

Alıntılama: İlhan, D., Akalın S. & Sever, T. M. (2022). İzmir Körfezi'nde Yabani Mercan Balığı (*Pagellus acarne* Risso, 1827)'nin üreme özellikleri. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 273-282. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1037401>

Özet: Bu çalışmada, İzmir Körfezi'nden Ekim 2012-Eylül 2013 tarihleri arasında aylık olarak ticari balıkçılardan elde edilen yabani mercan balığı (*Pagellus acarne* Risso, 1827)'nin üreme özellikleri araştırılmıştır. Araştırma süresince toplam 1031 adet yabani mercan balığı incelenmiştir. Örneklerin total boy ve ağırlıkları dişi bireylerde 11,9-20,8 cm ile 23,95-114,50 g, erkek bireylerde ise 11,1-19,4 cm ile 19,62-102,9 g arasında dağılım göstermiştir. Dişi:erkek oranı 1,17:1 olarak hesaplanmıştır. Protandrik hermafrodit olarak karakterize edilen bu türün, gonadosomatik indeks (GSI) değerlerine göre, araştırma bölgesindeki üreme periyodunun Eylül-Aralık ayları arasında olduğu tespit edilmiştir. Bir dişinin bir defada bıraktığı yumurta miktarının, 14504-56401 adet/birey arasında değiştiği gözlenmiştir. Olgunlaşmış yumurta çapları 200-1020 µm arasında değişim göstermiştir.

Anahtar kelimeler

- *Pagellus acarne*
- Gonadosomatik indeks
- Fekondite
- İzmir Körfezi

Abstract: In the study, the reproductive biology of the axillary seabream (*Pagellus acarne* Risso, 1827) was investigated between October 2012 and September 2013 in İzmir Bay from the samples of commercial catches. A total of 1031 specimens were examined in the study period. The total length and weight distribution of the specimens were 11.9-20.8 cm – 23.95-114.5 g for females and 11.1-19.4 cm – 19.62-102.9 g for males and the sex ratio (female:male) was 1.17:1. The gonadosomatic index (GSI) values showed that the reproduction period of this protandric species was from September to December in the study area. The fecundity of females in one batch was estimated as between 14504-56401. The ripened egg diameter ranged from around 200 to 1020 µm.

Keywords

- *Pagellus acarne*
- Gonadosomatic index
- Fecundity
- İzmir Bay

1. GİRİŞ

İzmir Körfezi, Ege Denizi'nin en önemli balıkçılık alanları arasındadır. Körfez, dip yapısı ve biyo-ekolojik özelliklerinin uygunluğu açısından hem iyi bir av sahası hem de pek çok ekonomik türün yumurtlama alanını oluşturmaktadır (Kocataş & Bilecik, 1992).

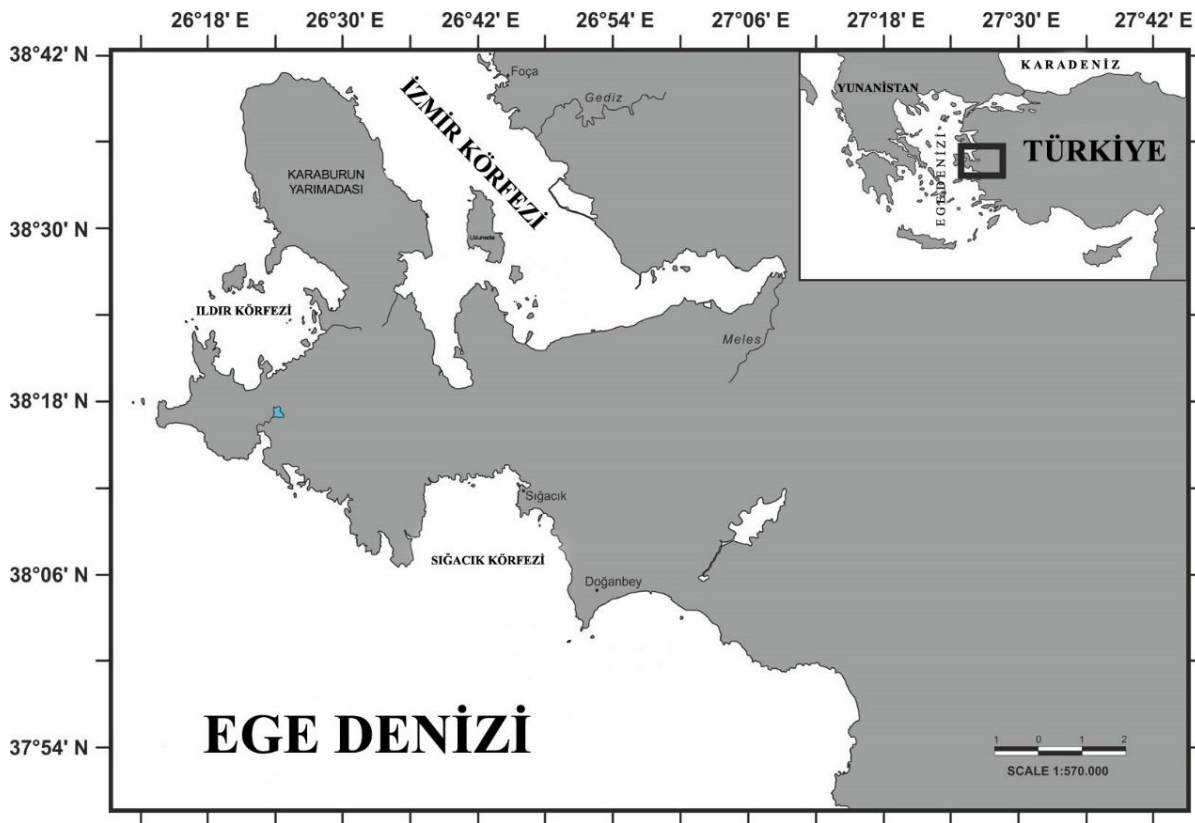
Yabani mercan balığı (*Pagellus acarne*), Ege Denizi'ndeki payı kalitatif açıdan oldukça önem taşıyan Sparidae familyasına ait bir türdür. Özellikle deniz çayırı yatakları ile kumlu dip yapısına sahip 500 m'ye kadarki (genellikle 40-100 m) derinliklerde demersal olarak yaşamaktadır (Whitehead vd., 1986).

Balık popülasyonlarının biyolojik özelliklerinin incelenerek, stok durumlarının saptanması, balıkçılık biyolojisi çalışmalarının en önemli konusunu oluşturur. Özellikle ekonomik türlerin stok

miktarlarının tespiti, ekonomik açıdan en yüksek oranda ve stoğa zarar vermeden değerlendirilebilmesi, kaynakların korunması ve devamlılığının sağlanması için gereklidir (Bingel, 1985).

Araştırma materyalini oluşturan yabancı mercan balığının biyolojisi ve büyümesi üzerine gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma (Coupe, 1952; Mater, 1976; Lê-Trong Phàn & Kompowski, 1972; Andaloro, 1982; Domanevskaya, 1982; Domanevskaya & Patokina, 1984; Santos vd., 1995; Özaydın, 1997; Tosunoğlu vd., 1997; Pajuelo & Lorenzo, 2000; Coelho vd., 2005; Velasco vd., 2011; Soykan vd., 2015; Öztekin vd. 2015; İlhan, 2018; İnnal & Katselis, 2019; Yedier vd., 2019) ile türün üreme özellikleri ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (Stergio vd., 1997; Pajuelo & Lorenzo, 2000; Zoubi, 2001; Velasco vd., 2011; Bensahla Talet vd., 2013; Despoti & Stergiou, 2013; Boufersaoui & Harchouche, 2015; Dragičević vd., 2015; Bensahla Talet vd., 2017 ve Bentata-Keddar vd., 2020).

Bu çalışma ile *Pagellus acarne*'nin, İzmir Körfezi'ndeki (Orta Ege Denizi) üreme özellikleri incelenmiştir. Ayrıca bu araştırma Ege Denizi için türün yumurta çaplarının bildirildiği ilk çalışmadır.



Şekil 1. Araştırma bölgesi

2. MATERYAL ve METOT

İzmir Körfezi'nden (Şekil 1) örneklenen *Pagellus acarne* bireylerinin total boyları ($\pm 0,1$ cm) ölçülmüş, vücut ve gonad ağırlıkları $\pm 0,0001$ g hassasiyetli terazi ile tartılmıştır. Dişi:erkek oranları arasında istatistiksel açıdan fark olup olmadığını saptamak amacıyla Ki-kare (χ^2) testi, dişi ve erkek bireylerin boy ve ağırlık bakımından farklı olup olmadıklarını belirlemek için student-t testi uygulanmıştır (Sümbüloğlu & Sümbüloğlu, 1997). Bireylerin cinsiyeti ve olgunluk safhaları gonadların dış görünüşüne bakılarak makroskopik olarak gerçekleştirilmiştir. Türün üreme aktivitesinin belirlenmesi amacıyla dişi bireylerin ovaryum gelişimleri Holden & Rait (1974) tarafından tanımlanan kriterler esas alınarak 5 safhada incelenmiştir.

Gonadların morfolojik gelişim durumlarına göre, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bireylerin oranları tespit edilmiştir. Bu oranların boy grupları içerisinde % 50'den fazlasının olgun olduğu boy, ilk eşeyssel olgunluk boyu olarak kabul edilmiştir (Avşar, 1993).

GSI değerlerinin hesaplanmasında; $GSI = (Gonad\ ağırlığı / Vücut\ ağırlığı) \times 100$ eşitliğinden yararlanılmıştır (King, 1995).

İlk üreme boyunun hesaplanması için önce dişi ve erkek bireyler birer cm'lik gruplara ayrılmış ve bu boy gruplarındaki II., III. ve IV. gonad safhasına sahip bireylerin tüm bireyler içindeki oranı (%) hesaplanmıştır. Bu değerlere lojistik bir eğri uygulanmış ve eğride Y eksenindeki % 50 değerine karşılık gelen X eksen değeri, bireylerin % 50'sinin olgunlaşmış olduğu boy, yani ilk eşeyssel olgunluk boyu olarak kabul edilmiştir. $P = 1 / (1 + \exp[-r(L-Lm)])$ lojistik eğri denklemi kullanılmıştır (King, 1995). Burada, P: Olgunlaşmış birey oranı, r: Eğrinin eğimi, Lm: Olgunluk boyundaki ortalama boyu veya bireylerin % 50'sinin üreme durumunda olduğu boyu ifade etmektedir.

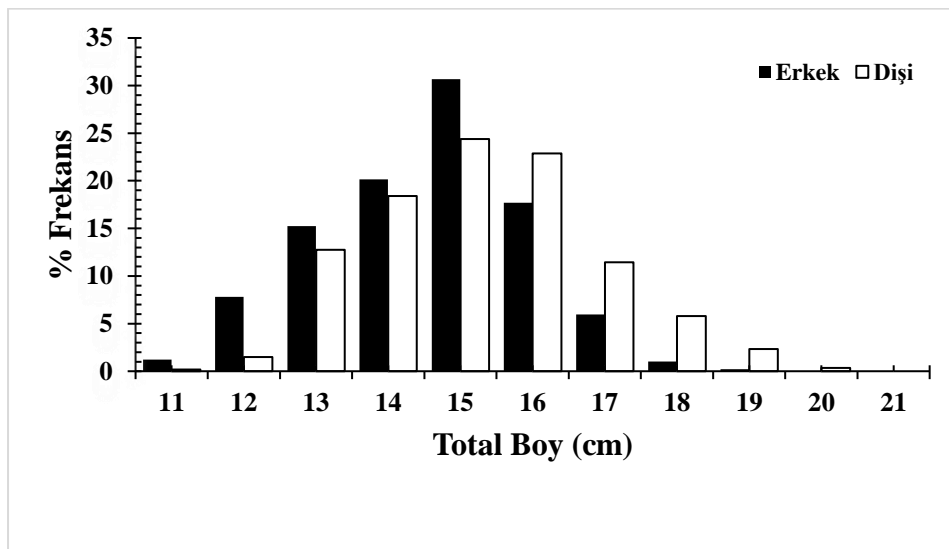
Yumurta verimliliği Bagenal (1978)'in önerdiği gravimetrik yöntemle saptanmıştır. Bu amaçla ovaryumların anterior, orta ve posterior bölümlerinden alınan alt örnekler (0,1 g) Gilson çözeltisine (100 ml % 60'lık etil alkol, 800 ml saf su, 15 ml % 80'lik nitrik asit, 18 ml glasiyal asetik asit ve 20 g cıva klorür) konulmuş, 48 saat aralıklarla çalkalanmış ve yumurtaların bağ dokudan ayrılması sağlanmıştır. Yumurtaların sayımı stereo mikroskopta yapılmış ve ortalama yumurta sayısı $F = n \times (G / g)$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Avşar, 2005). Burada; F, mutlak yumurta verimliliği; G, gonad ağırlığı (g); g, alt örneğin ağırlığı (g); n, alt örnekteki yumurta sayısı (adet)'dir. Fekonditenin tespiti için; belirlenen yumurta sayıları ovaryum ağırlıklarıyla oranlanmıştır.

Yumurta çapı ölçümleri ise binoküler mikroskop altında (4x10) mikrometrik oküler yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

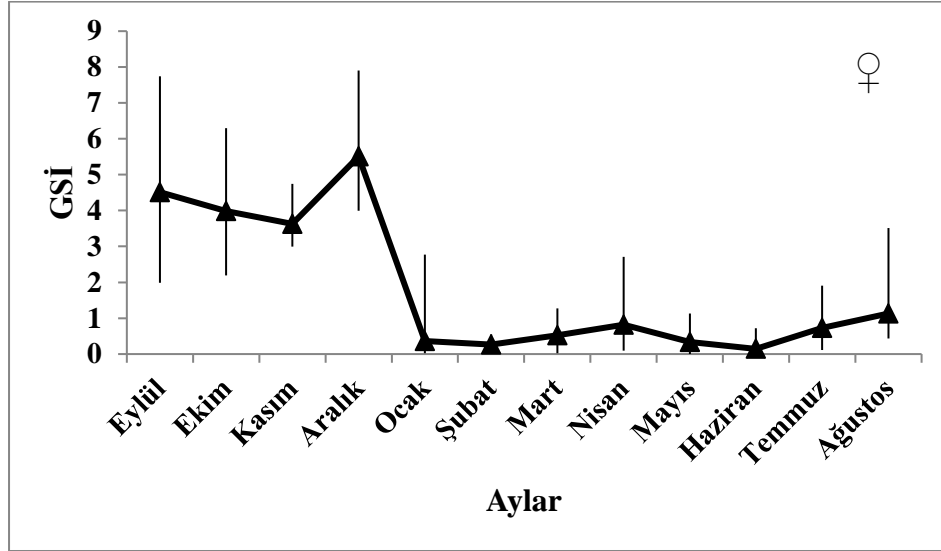
Bu çalışmada, İzmir Körfezi'nden Ekim 2012-Eylül 2013 tarihleri arasında aylık olarak ticari balıkçılardan temin edilen *Pagellus acarne* türüne ait 523 dişi, 447 erkek ve 61 cinsi olgunluğa ulaşmamış ya da cinsiyeti belirlenememiş olmak üzere toplam 1031 adet birey incelenmiştir.

Tüm örnekleme periyodu boyunca dişi:erkek oranı 1,17:1 olarak hesaplanmıştır. Uygulanan χ^2 analizi sonucunda, tüm yıl boyunca avlanan örneklerdeki dişi:erkek oranları arasında istatistiksel açıdan fark olduğu saptanmıştır ($\chi^2 = 29,818 < \chi^2_{10,005} = 3,84, p < 0.05$).



Şekil 2. İzmir Körfezi'nden örneklenen *Pagellus acarne* bireylerinin boy frekans dağılımları

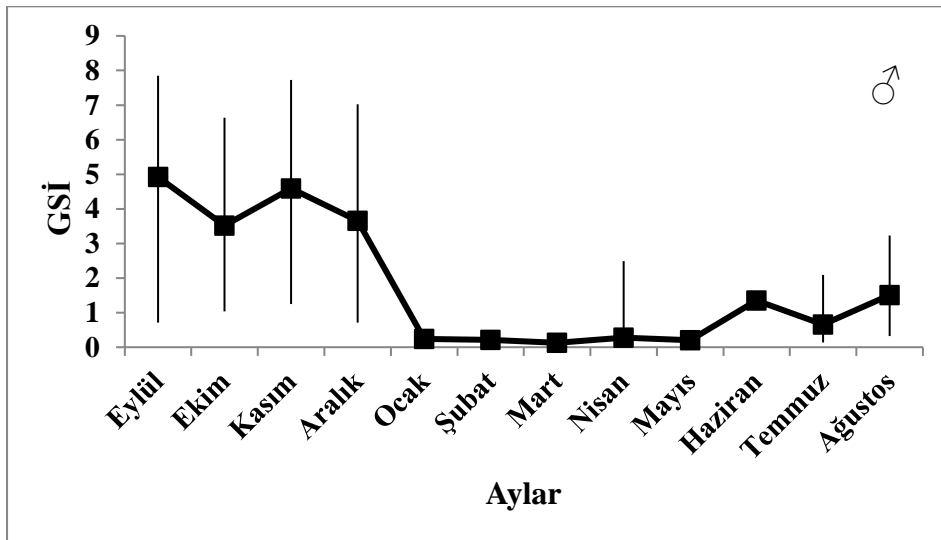
Araştırma süresince incelenen bireylerden, cinsiyeti belirlenen 523 adet dişi bireyin total boyları 11,9-20,8 cm, ağırlıkları 23,95-114,50 g arasında değişim göstermiştir. 447 adet erkek bireyin ise 11,1-19,4 cm ile 19,62-102,9 g arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2). Uygulanan student-t testi sonucunda dişi ve erkek bireyler arasında, ağırlık bakımından istatistiksel açıdan fark olduğu ($t=8,525$, $p<0,05$), ancak boy bakımından önemli bir farkın bulunmadığı saptanmıştır ($t=1,448$, $p>0,05$). En fazla bireye hem dişi (% 30,7) hem de erkeklerde (% 24,4) 15.0 cm'lik boy grubunda rastlanılmıştır.



Şekil 3. İzmir Körfezi'ndeki *Pagellus acarne*'nin dişi bireylerinin aylara göre Gonadosomatik İndeks Değerleri (GSI)

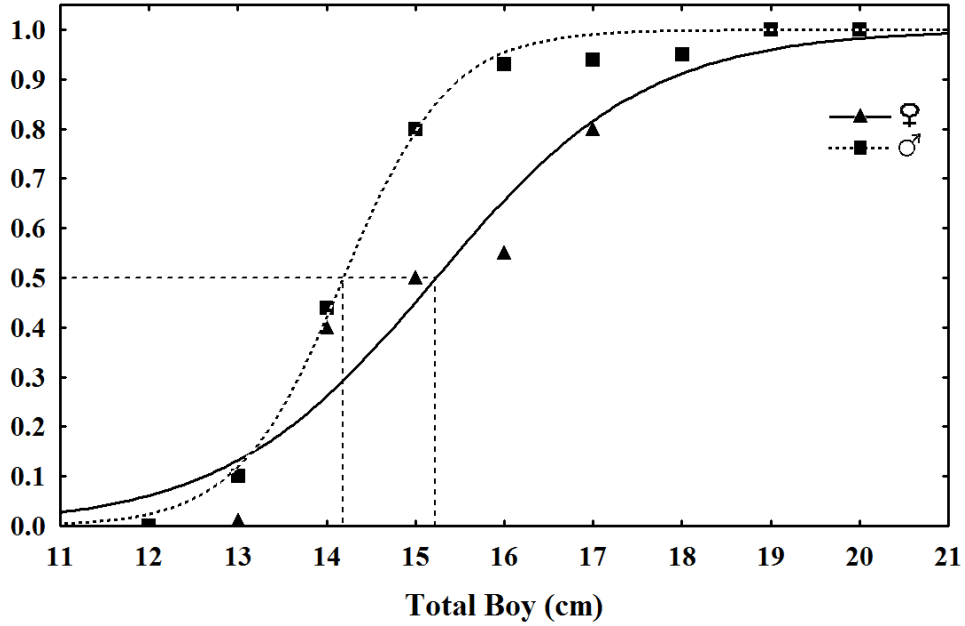
Yabani mercan balığının körfezdeki üreme periyodunu belirlemek amacıyla hesaplanan, aylara göre minimum, maksimum ve ortalama gonadosomatik indeks değerleri incelendiğinde, hem dişi hem de erkek bireylerde GSI değerlerinin Eylül ayında artmaya başladığı, dişilerde Aralık, erkeklerde ise Eylül ve Kasım aylarında en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür (Şekil 3, 4).

Bu verilere göre türün araştırma bölgesindeki en yüksek yumurtlama aktivitesinin Eylül'den Aralık sonuna kadar gerçekleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. İzmir Körfezi'ndeki *Pagellus acarne*'nin erkek bireylerinin aylara göre Gonadosomatik İndeks Değerleri (GSI)

Bu türün araştırma bölgesindeki ilk üreme boyu; erkek bireyler için 14,18 cm ve dişi bireyler için 15,23 cm olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. İzmir Körfezi'ndeki *Pagellus acarne*'nin dişi ve erkek bireylerinin ilk üreme boyları

Araştırma bölgesindeki yabancı mercan bireylerinin fekonditesinin belirlenmesi amacıyla, olgun gonada sahip 103 dişi bireyin ovaryumlarındaki yumurta sayımı sonucunda, bir dişinin bir defada bıraktığı yumurta miktarının 14504-56401 adet/birey arasında ve ortalama $25642 \pm 973,446$ olduğu belirlenmiştir. 1348 adet yumurta çapı ölçümüne göre; yumurta çaplarının ortalama $490 \pm 2,779$ μm olduğu ve minimum 200 μm ile maksimum 1020 μm arasında değiştiği tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İzmir Körfezi'nde *Pagellus acarne*'nin üreme özelliklerinin incelendiği bu çalışmada, dişi: erkek oranı 1,17:1 ile dişiler yönünde baskın bulunmuştur. Benzer şekilde, farklı denizlerde yapılmış pek çok çalışmada yabancı mercanın cinsiyet oranının dişiler lehine olduğu bildirilmiştir (Santos vd., 1995; Pajuelo & Lorenzo, 2000; Coelho vd., 2005; Dragičević vd., 2012; Soykan vd., 2015; Boufersaoui & Harchouche, 2015; Bensahla Talet vd., 2017; Gül vd., 2021). Buna karşın, bazı dağılım alanlarında bu türün erkek bireylerinin baskın olduğu rapor edilmiştir (Özaydın, 1997; Arculeo vd., 2000; Velasco vd., 2011; Yedier vd., 2019; Bentata-Keddar vd., 2020). Protandrik hermafrodit üreme özelliği gösteren türde dişi-erkek oranını öncelikle bireylerin boy dağılımlarının belirlediği muhtemeldir. Dolayısıyla örnek popülasyonda dişi oranının yüksek olması büyük boylu bireylerin sayıca fazla olmasının bir sonucudur. Bununla birlikte, araştırma bölgelerindeki mevcut avcılık baskıları sebebiyle türlerin ilk üreme boyuna daha erken ulaşmasının, veya tür içi ve türler arası beslenme rekabeti sonucu meydana gelen büyüme farklılıklarının da cinsiyet oranları üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

GSİ değerlerine göre yabancı mercan balığının araştırma bölgesindeki üremesinin dört aylık bir periyotta (Eylül'den Aralık'a kadar) gerçekleştiği belirlenmiştir. Atlas Okyanusu ve Akdeniz'in farklı bölgelerinde yapılmış çalışmalarda ise bu türün genellikle yıl içinde daha uzun bir zaman diliminde üreme faaliyeti gösterdiği bildirilmiştir (Tablo 1). Bunun, çalışma bölgemizin daha kuzeyde bulunması ve doğal olarak su sıcaklığının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde,

Pajuelo & Lorenzo (2000)'da *P. acarne*'nin, daha alçak enlemlerde kış ve ilkbahar mevsimleri arasında, yüksek enlemlerde ise yılın son aylarında yumurtlama eğilimi gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca, örnekleme derinliği, doğal veya avcılık baskısı gibi insan kaynaklı nedenlerden dolayı, örneklerimiz içerisinde en büyük boydaki bireyin (~21 cm) türün ulaşabileceği maksimum boydan oldukça küçük olması da üreme döneminin geç başlamasına sebep olabilir. Zira, birçok balık türünde ilk üreme olgunluğuna ulaşanların boy veya yaş olarak popülasyondaki büyük bireyler oldukları gözlenmektedir (Saborido-Rey & Kjesbu, 2012).

Tablo 1. *Pagellus acarne*'nin farklı denizlere ait üreme dönemleri

AYLAR											Lokalite	Araştırmacı		
O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K				
X	X							X	X	X	X	Cape Blank, Afrika	Alexseev (1969)	
X	X	X	X							X	X	X	Kuzey Batı Afrika	Stepkina (1970)
X	X	X									X	X	Kuzey Batı Afrika Kıyıları	Lê-Trong Phán & Kompowski (1972)
			X	X								X	Doğu Atlantik	Bauchot & Hureau (1986)
								X	X	X			Doğu Akdeniz	Bauchot & Hureau (1986)
			X	X	X	X	X	X	X	X			Portekiz Kıyıları	Erzini vd. (1997)
X	X	X								X	X	X	Kanarya Adaları	Pajuelo & Lorenzo (2000)
				X	X	X	X	X	X	X			Cadiz, Atlas Oky.	Velasco vd. (2011)
				X	X	X	X	X	X				Alboran, Akdeniz	
			X	X	X	X				X			Cezayir Kıyıları	Boufersaoui & Harchouche (2015)
X				X	X	X				X	X		Cezayir Kıyıları	Bensahla Talet vd. (2017)
		X	X	X			X	X	X				Batı Akdeniz	Bentata-Keddar vd. (2020)
								X	X	X	X		İzmir Körfezi	Bu Çalışma

Tablo 2. *Pagellus acarne*'nin farklı denizlere ait ilk cinsi olgunluk boyları (cm)

Araştırma Bölgesi	Total	Dişi	Erkek	Araştırmacı
Tiren ve İyon Denizi	22,0	-	-	Andaloro (1982)
Atlas Okyanusu	20,9	-	-	Lamrini (1986)
Atlas Okyanusu	-	19,7	20,9	Santos vd. (1995)
Kanarya Adaları	-	19,4	15,8	Pajuelo & Lorenzo (2000)
Cadiz, Atlas Okyanusu	-	21,5	18,4	
Alboran, Akdeniz	-	20,1	17,7	Velasco vd. (2011)
Batı Akdeniz	-	12,75	15,99	Bensahla Talet vd. (2017)
Cezayir kıyıları, Batı Akdeniz	-	16,45	16,8	Boufersaoui & Harchouche (2015)
Orta Ege Denizi	-	14,45	13,91	Soykan vd. (2015)
Batı Akdeniz	-	18,63	16,95	Bentata-Keddar vd. (2020)
İzmir Körfezi, Ege Denizi	-	15,23	14,18	Bu Çalışma

Bu çalışmada, erkeklerin dişilerden daha küçük boylarda iken cinsi olgunluğa eriştiği tespit edilmiştir. Aynı sonuç Santos vd. (1995); Pajuelo & Lorenzo (2000); Valesco vd. (2011), Soykan vd. (2015) ile Bentata-Keddar vd. (2020) tarafından da bildirilmiştir. Bunun, *P. acarne*'nin protandrik hermafrodit bir tür olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yabancı mercanın araştırma bölgesindeki ilk üreme boyu, farklı denizlere ait değerlerle birlikte Tablo 2'de verilmiştir. Atlas Okyanusu'na ait çalışmalarda türün ilk cinsi olgunluğu Akdeniz'e kıyasla daha büyük boylarda bildirilmiştir. Su sıcaklığı metabolik aktiviteyi etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Dolayısıyla, balıkların cinsel olgunluğa Akdeniz'de Atlas Okyanusu'ndakilerden daha küçük boyutta ulaşması Akdeniz suyunun okyanus suyundan daha sıcak olması ile açıklanabilir. Sıcaklığın yanı sıra, balık

türlerinin ilk üreme boylarında gözlenen farklılıklar; bölgeler arasındaki besin çeşitliliği (Nikolsky, 1963), genetik faktörler (Wootton, 1998), av baskısı ile av araçlarının seçiciliği (Jennings vd., 2001) ve ilk üreme boyunun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin farklılığı (Froese & Binohlan, 2000) gibi nedenlerden de kaynaklanmaktadır.

Araştırma bölgesindeki yabancı mercan bireylerinin farklı çalışmalarda saptanan fekondite değerleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *Pagellus acarne*'nin farklı denizlere ait fekondite miktarları

Araştırma Bölgesi	n	TL (cm)	F	Araştırmacı
Kuzey Batı Afrika Kıyıları	22	-	85000-536000	Lê-Trong Phàn & Kompowsky (1972)
Atlas Okyanusu	20	-	100000-1000000	Lamrini (1986)
	15	20,9-28,2	290070±196,617	Velasco vd. (2011)
Alboran, İspanya, Akdeniz	14	20,8-29,4	173509±183,076	Velasco vd. (2011)
Oran Körfezi, Cezayir, Akdeniz	22	16,3-26,3	19875-49125 29448±8198,12	Bensahla Talet vd. (2013)
İskenderiye Kıyıları, Mısır	-	-	9260-18889	Despoti & Stergiou (2013)
Alboran Denizi, Akdeniz	-	-	35752-783114	Despoti & Stergiou (2013)
Cádiz Körfezi, Atlas Okyanusu	-	-	19417-641957	Despoti & Stergiou (2013)
Cezayir kıyıları	-	10,8-28,1	14500-182300	Boufersaoui & Harchouche (2015)
Doğu Adriyatik	21	19,0-26,0	16472-67439	Dragičević vd. (2015)
İzmir Körfezi, Ege Denizi	103	14,2-20,8	14504-56401 25642±973,45	Bu Çalışma

Bir dişi balığın yumurta verimliliği, türe ve büyüklüğe bağlı farklılıklar göstermekle birlikte, aynı türün bireyleri arasında da değişiklik gösterebilmektedir (Demirsoy, 1993). Bununla beraber, yumurta verimliliği, balıkların tükettiği besinlerin kalitesine ve miktarına bağlı olarak da değişebilir. Tüketilen besin miktarı arttıkça yumurta verimliliği de doğru orantılı olarak artmaktadır (Avşar, 2005).

Araştırma bölgesindeki dişi yabancı mercan bireylerine ait olgunlaşmış yumurta çaplarının 200-1020 µm arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu türe ait yumurta çapı değerleri, Cezayir kıyıları için 300-800 µm (Bensahla Talet vd., 2013); Güney Atlantik'in Fas kıyıları için 250-1000 µm (Lamrini, 1986) ve Sicilya kıyıları için 107-750 µm (2. evreye ait histolojik kesitlerden) (Arculeo vd., 2000) olarak bildirilmiştir. Bu türün, Ege Denizi'nde yumurta çaplarına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma, araştırma bölgesi için yabancı mercan balığının yumurta çaplarına ait ilk veriyi içermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011/SÜF/001 nolu proje ile desteklenmiş olup, XII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi'nde ön çalışma olarak özet bildiri şeklinde sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Alexseev, F. E. (1969). Androgyny and regulation of sex structure of population of *Pagellus acarne* (Risso), in some areas of North-West African coast. *AtlantNiro*, 2, 50-71.
- Andaloro, F. (1982). Résumé de paramètres biologiques sur *Pagellus acarne* de la mer Tyrrhénienne méridionale et de la mer Ionienne septentrionale. Rapport de la première consultation technique sur l'évaluation des stocks dans la Méditerranée centrale. Tunis, 19-23 avril 1982. *Conseil*

- général des pêches pour la Méditerranée (CGPM)*. FAO, Rapport sur des pêches No 266: 89–92.
- Arculeo, M., Brusle-Sigard, S., Potoschi, A., & Riggio, S. (2000). Investigations on gonadal maturation in *P. acarne* (Pisces: sparidae) in the Strait of Messina (Sicily). *Italian Journal of Zoology*, 67, 333-337.
- Avşar, D. (1993). The Biology and population dynamical parameters of the sprat (*Sprattus sprattus phalericus* RISSO) on the southern coast of the Black Sea. Ph.D. Thesis, IMS-METU, 240 p.
- Avşar, D. (2005). Balıkçılık Biyolojisi ve Populasyon Dinamiği. Adana Nobel Yayınevi, Adana, 332 s.
- Bagenal, T. B. (1978). Fecundity. In: T.B. Bagenal (ed.), *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters*. IBP Handbook No: 3, Blackwell Scientific, London, pp. 166-178.
- Bauchot, M. L. & Hureau, J. C. (1986). Sparidae. p. 883-907. In P.J.P. Whitehead, M.-L. Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen & E. Tortonese (eds.) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Volume 2. UNESCO, Paris.
- Bensahla Talet, L., Mouffok, S., Bensahla Talet, A. & Boutiba, Z. (2013). On the fecundity of the Seabream, *Pagellus acarne* (Risso, 1827) of the western Mediterranean Sea, Algerian coasts. *Thalassas*, 29(2), 9-13.
- Bensahla Talet, L., Gherram, M., Dalouche, F., Bensahla Talet, A. & Boutiba, Z. (2017). Reproductive biology of *Pagellus acarne* (Risso, 1827) (Teleostei: Sparidae) off western Algerian waters (Western Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine*, 58, 443-452. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.D5BB353B>
- Bentata-Keddar, I., Abid-Kachour, S., Bouderbala, M. & Mouffok, S. (2020). Reproduction and growth of Axillary seabream *Pagellus acarne* (Risso, 1827) (Perciformes Sparidae) from the western Algerian coasts. *Biodiversity Journal*, 11(2), 351–358.
- Bingel, F. (1985). Balık Populasyonlarının İncelenmesi. İstanbul Üniv. Rektörlüğü, Su Ürünleri Yüksek Okulu Sapanca Balık Üretme ve İslah Merkezi. Yay. No:10, 133 s.
- Boufersaoui, S. & Harchouche, K. (2015). Dynamique de la reproduction et fecondite de *Pagellus acarne* (Sparidae) de la region Centre du littoral algerien. *Cybium*, 39(1), 59-69.
- Coelho, R., Bentes, L., Correia, C., Gonçalves, J. M. S., Lino, P.G., Monteiro, P., Ribeiro, J. & Erzini, K. (2005). Age, growth and reproduction of the axillary seabream. *Pagellus acarne* (Risso, 1827), from the south coast of Portugal. *Thalassas*, 21(1), 79–84.
- Coupe, R. (1952). Note sur *Pagellus acarne* (Risso), *ICES Journal du Conseil*, 18(1), 38-41.
- Demirsoy, A. (1993). *Yaşamın Temel Kuralları, Omurgalılar/Anamniyota*. Cilt III / Bölüm I, Meteksan A.Ş. Baskı Tesisleri, Ankara, 684 s.
- Despoti, S. & Stergiou, K. I. (2013). Fecundity of marine fishes: a review. In: Stergiou, K.I., Bobori, D.C., Tsikliras A.C. editors. More fish and more. 11th Annual FishBase Symposium. pp. 62–66.
- Domanevskaya, M. V. (1982). Specifics of the distribution of *Pagellus acarne* (Sparidae) in the Southwestern Mediterranean Sea. *Journal of Ichthyology*, 22(2), 127-130.
- Domanevskaya, M. V. & Patokina, F.A. (1984). Feeding of large-eyed dogtooth, *Dentex macrophthalmus* and Spanish bream, *Pagellus acarne* from the central-eastern Atlantic Ocean. *Journal of Ichthyology*, 24(5), 107–112.
- Dragičević, B., Grgičević, R., Stagličić, N., Dulčić, J., Matic-Skoko, S., Tutman, P., Bojanić-Varezić, D. & Pallaoro, A. (2015). Some biological parameters of *Pagellus acarne* (Risso, 1827) from the eastern Adriatic Sea. *Frontiers in Marine Science. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology*. <https://doi.org/10.3389/conf.fmars.2015.03.00077>
- Erzini, K., Goncalves, J. M. S., Bentes, L., Lino, P. G. & Ribeiro, J. (1997). *Long-line selectivity and biology of “red” seabreams (Sparidae)*. Final Report, Commission of the European Communities DG XIV/C/1, Ref. 94/059, 100 p. + appendices.

- Froese, R., & Binohlan, C. (2000). Empirical relationships to estimate asymptotic length, length at first maturity and length at maximum yield per recruit in fishes, with a simple method to evaluate length frequency data. *Journal of Fish Biology*, 56, 758-773.
- Gül, G., İşmen, A., & İhsanoğlu Arslan, M. (2021). Population structure of *Pagellus acarne* (Risso, 1927) in the North Aegean Sea. *International Journal of Environment and Geoinformatics (IJEGEO)*, 8(1), 019-027. <https://doi.org/10.30897/ijegeo.800936>
- Holden, M. J., & Raitt, D. F. S. (1974). Manual of Fisheries Science. Part 2- Methods of resource investigation and their application. *FAO Fish. Tech. Rap.* (115), Rev. 1, 214 p.
- İlhan, D. (2018). Age, growth, and diet of axillary seabream, *Pagellus acarne* (Actinopterygii: Perciformes: Sparidae), in the central Aegean Sea. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 48(4), 329-339.
- İnnal, D., & Katselis, G. (2019). Morphometric and meristic characters for axillary seabream *Pagellus acarne* from Antalya Gulf (Mediterranean-Turkey). *Turkish Journal of Health Science and Life*, 2(2),13-19.
- Jennings, S., Kaiser, M. J., & Reynolds, J.D. (2001). *Marine Fisheries Ecology*. Blackwell Science, London.
- King, M. (1995). *Fisheries Bology, Assesment and Management*. Fishing News Books. Osney Mead, Oxford OX2 OEL, England, 337 p.
- Kocataş, A., & Bilecik, N. (1992). *Ege Denizi ve Canlı Kaynakları*, T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Su ürünleri Araştırma Enstitüsü, Bodrum, 88 s.
- Lamrini, A. (1986). Sexualité de *Pagellus acarne* (Risso, 1826) (Teleostéen, Sparidae) de la côte Atlantique méridionale du Maroc (21°-26° N). *Cybium*, 10, 3-14 p.
- Lê-Trong P., & Kompowski, A. (1972). The bronze bream, *Pagellus acarne* Risso from the north west African region. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 2(1), 1-18.
- Mater, S. (1976). İzmir Körfezi ve civarı "Sparidae" popülasyonları üzerine biyolojik ve ekolojik araştırmalar. *Ege Üniversitesi İlmî Raporlar Serisi*, 201, 132: 1-53.
- Nikolsky, G. V. (1963). *The ecology of fishes* (Trans L. Birkett).1-3. Academic Press, London and New York, 352 p.
- Özaydın, O. (1997). *Ege Denizi'nde yaşayan bazı Sparid (Pisces: Sparidae) Türlerinin Biyolojisi ve Beslenme Rejimi Üzerine Araştırmalar*. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 137 s.
- Öztekin, A., Kızılkaya, B., Aslan, A., Selvi, K., Yılmaz, S., Hisar, O., & Ergün, S. (2015). Body Amino Acid Composition of Axillary seabream (*Pagellus acarne* R., 1827) Caught from Dardanelles (Çanakkale, Turkey). Proceeding of the 7th International Conference on Information and Communication Technologies in Agriculture, Food and Environment (HAICA 2015), Kavala, Greece, 17-20 Senteber, 2015.
- Pajuelo, J. G., & Lorenzo, J. M. (2000). Reproduction, age, growth and mortality of axillary seabream, *Pagellus acarne* (Sparidae) from the Canarian Archipelago. *Journal of Applied Ichthyology*. 16, 41-47.
- Saborido-Rey, F., & Kjesbu, O. S. (2012). Growth and maturation dynamics. *Digital CSIC*. pp. 26. <http://hdl.handle.net/10261/47150>
- Santos, M. M., Montero, C. C., & Erzini, K. (1995). Aspects of the biology and gillnet selectivity of the axillary seabream (*Pagellus acarne*, Risso) and common pandora (*Pagellus erythrinus*, Linnaeus) from the Algarve (south Portugal). *Fisheries Research*, 23(3-4), 223-236. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(94\)00354-Y](https://doi.org/10.1016/0165-7836(94)00354-Y)
- Soykan, O., İlkyaz, A. T., Metin, G., & Kınacıgil, H. T. (2015). Growth and Reproduction of *Boops boops*, *Dentex macrophthalmus*, *Diplodus vulgaris* and *Pagellus acarne* (Actinopterygii:

- Perciformes: Sparidae) from East-central Aegean Sea, Turkey. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 45(1), 39–55.
- Stepkina, M. W. (1970). Sparidae of Nort-West African coast. *Fish Industry*, 6, 8-10.
- Stergiou, K. I., Christou, E. D., Georgopoulous, D. Zenetos A., & Souvermezoglou, C. (1997). The Hellenic seas: physics, chemistry, biology and fisheries. p. 415-538. In A. D. Ansell, R. N. Gibson, & M. Barnes (eds.). *Oceanography and marine biology: an annual review*. UCL Press.
- Sümbüloğlu, K., & Sümbüloğlu, V. (1997). Biyolistatistik. Hatipoğlu Yayınevi, 7. Baskı, Ankara, 269s.
- Tosunoğlu, Z., Akyol, O., Metin, G., Tokaç, A., & Ünsal, S. (1997). The study on the population characteristics of three sparid species in the Gülbahçe Bay. *Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1–2), 127–143. (in Turkish with English abstract).
- Velasco, E.M., Jiménez-Tenorio, N., Del Arbol, J., Bruzón, M.A., Baro, J., & Sobrino, I. (2011). Age, growth and reproduction of the axillary seabream, *Pagellus acarne*, in the Atlantic and Mediterranean waters off southern Spain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(6), 1243–1253. <https://doi.org/10.1017/S0025315410000305>
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen J., & Tortonese E. (1986). *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. 2, Unesco, Paris, 898-899.
- Wootton, R. J. (1998). *Ecology of Teleost Fishes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Zoubi, A. (2001). Biologie de reproduction des principales espèces demersales de la Méditerranée marocaine. *Rapport du Congrès de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 36, 340.
- Yedier, S., Kontaş, S., & Bostancı, D. (2019). Marmara Denizi'nde Yaşayan *Pagellus acarne* (Risso, 1827)'nin Kondisyon Faktörü, Boy-Boy ve Boy-Ağırlık İlişkileri. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2): 82-88.
-

Novel Utilization of Fish By-Products and Wastes: Protein Hydrolysates

Balık Yan Ürünlerinin ve Atıklarının Yeni Kullanımı: Protein Hidrolizatları

Gülsüm Balçık Mısır ¹*

¹Central Fisheries Research Institute, Vali Adil Yazar Street, No:14 Kaşüstü, Yomra Trabzon, Türkiye.

*Corresponding author: gulsum61balcik@gmail.com

Received: 02.12.2021

Accepted: 21.02.2022

Published: 01.06.2022

How to Cite: Balçık Mısır, G. (2022). Novel utilization of fish by-products and wastes: Protein hydrolysates. *Acta Aquatica Turcica*, 18(2), 283-294. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1031442>

Abstract: The rapid growth of the world's population, urbanization, and increasing prosperity require better utilization of available protein resources. In addition, the development of new and sustainable resources is also very important. By 2050, the increase in protein demand in the world will cause it to double not only due to population pressure but also to the increasing awareness of the importance of proteins in a healthy diet for the elderly population. Fish and other aquatic products are important sources of protein. However, depending on the raw materials and the processes applied in the seafood processing sector, waste and by-products are generated at rates ranging from 20% to 75%. Many studies have shown that these products are important protein sources. However, the inadequate management of waste and by-products in the seafood processing sector is one of the biggest challenges facing the fish industry today. Various processes have been developed for the use of these products. An effective way to add value to these products is the production of protein hydrolyzates. Protein hydrolysates allow the release of peptides of different sizes with functional properties, various bioactivities such as antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, anti-inflammatory, or antihyperglycemic. In this article, proteins belonging to fish by-products and wastes, their functional and technological properties, hydrolysis process, technological use of hydrolysates in the food industry have been reviewed.

Keywords

- By-products
- Fish
- Protein Hydrolysates

Özet: Dünya nüfusunun hızla artması, kentleşme ve artan refah, mevcut protein kaynaklarının daha iyi kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca yeni ve sürdürülebilir kaynakların geliştirilmesi de oldukça önemlidir. 2050 yılına gelindiğinde, dünyadaki protein talebindeki artış, sadece nüfus baskısı nedeniyle değil, aynı zamanda yaşlı nüfus için sağlıklı beslenmede proteinlerin öneminin artan farkındalığı nedeniyle bunun iki katına çıkmasına neden olacaktır. Balık ve diğer su ürünleri önemli protein kaynaklarıdır. Ancak su ürünleri işleme sektöründe hammadde ve uygulanan işlemlere bağlı olarak %20 ila %75 arasında değişen oranlarda atık ve yan ürün açığa çıkmaktadır. Bu ürünlerin önemli protein kaynakları olduğu birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Buna rağmen balık işleme sektöründe atık ve yan ürünlerin yetersiz yönetimi, günümüzde balık endüstrisinin yüzleşmek zorunda olduğu en büyük sorunlardan biridir. Bu ürünlerin kullanımına yönelik çeşitli süreçler geliştirilmiştir. Bu ürünlere değer katmanın etkili bir yolu protein hidrolizatı üretimidir. Protein hidrolizatları, fonksiyonel özellikleri, antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif, antiinflamatuvar veya antihiperglisemik gibi çeşitli biyoaktivitelere sahip farklı boyutlardaki peptitlerin açığa çıkmasına izin verir. Bu makalede, balık yan ürünleri ve atıklarına ait proteinler, fonksiyonel ve teknolojik özellikleri ile hidroliz işlemi, hidrolizatların gıda sektöründe teknolojik kullanım olanakları derlenmiştir.

Anahtar kelimeler

- Yan ürün
- Balık
- Protein hidrolizatı



1. INTRODUCTION

The term by-product is defined as the product that occurs outside the intended product during production. Small-deformed fish caught in the net during fishing, non-economic, non-target species other than the target species, and discarded species during processing; the head, tail, bone, shell, scales, internal organs, blood, and other fluids are by-products.

Numerous by-products emerging in the fishing and aquaculture industries around the world are either discarded or used for non-food purposes; in the production of low-value feed products such as fish silage, fish meal oil. This results in the loss of dietary essential constituents and an increase in economic costs (Olsen et al., 2014). Seafood is consumed fresh-chilled (44%) and processed with different technologies (54%, approximately 75 million tons) (FAO, 2020). Many by-products emerge depending on the structural characteristics of the raw materials used in the processing industry and the technologies applied. These products, namely the head, internal organs, spine, skin, fins, and clipping meat, are 50-75% in the production of salting and smoking processes. It is 30-65% canned fish. These rates are around 20-50% in bivalves and 50-60% in arthropods. Fish fillet processing by-products also consist of head, viscera, skin, caudal fins, and spine, and fillet trimmings that result during the filleting process (Dekkers et al., 2011; Shirai and Ramirez-Ramirez, 2011). By-products obtained from fish processing facilities are reported to be the source of numerous valuable compounds such as collagen, gelatin, high-quality proteins and peptides and lipids, including long-chain omega-3 fatty acids, chitin, vitamins A, D, B, and especially B12, minerals such as calcium, phosphorus, iron, zinc, selenium, and iodine, enzymes, and pigments (Disney et al., 1977; Pal and Suresh, 2016). The amount of protein in by-products ranges from 20 to 80 g/100 g on average (Khiari et al., 2015; Abbey et al., 2017). Esteban et al. (2007) determined the protein value 58% and lipid value 19% in the nutrient composition of the by-products that emerged in the fish market. They also revealed that there are significant levels of minerals in these by-products. Among these minerals, calcium, phosphorus, and zinc were calculated as 5.8%, 2.4%, and 6%, respectively. Besides, it is stated that the amounts of palmitic acid and oleic acid are reasonably high. Roslan et al. (2014) reported that the by-products of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) contain 14.60% crude protein, 66.57% moisture, 5.50% oil, and 8.93% ash.

Sustainable use of fish by-products for human consumption is one of the most priorities of the aquaculture industry, FAO (2020). Innovative technologies are used to produce bioactive compounds from seafood byproducts. These components have functional properties such as emulsification, foaming, oil binding, and water retention. They have also exhibited antioxidant and antimicrobial activity. With all these advanced properties, there have been reported that these bioactive components can be used in processed foods in different ways today. They increase the value of foods and give them a "functional food" feature (Haque and Mozaffar, 1992; Diniz and Martin, 1997; Sathivel et al., 2003; Kim and Mendis, 2006; FAO, 2017).

This study is aimed to discuss the processing and potential applications of fish waste and by-products as protein hydrolysate.

1.1. Proteins in Fish By-products

Proteins are polypeptides formed by the covalent bonding of twenty standard amino acids to each other in a characteristic straight chain in a certain type, number, and sequence. Principally, animal meats are similar in terms of protein content and amino acid composition. But the fish muscle is softer than terrestrial animal meats with a lower percentage of connective tissue (Helfman et al., 2009). Protein content in fish constitutes approximately 90% of the total dry matter. Fish proteins are complex systems consisting of three groups: myofibrillar, sarcoplasmic, and stromal proteins.

Many researchers have reported that there is a significant amount of protein in fish waste along with other components. Raghavan (2008) reported the protein rate in fish wastes between 10-20% of the total protein. Fish scales are an excellent source of collagen and gelatin from the skin and spine (Nurilmala et al., 2020).

1.2. Technological and Functional Properties of Fish Proteins

Fish proteins show high functional properties as well as nutritional value. The factors that reveal the functionality of proteins are due to some of their physical, chemical, and physicochemical properties. These are, respectively, due to the sizes, shapes, amino acid compositions and sequences of proteins, charge distributions, hydrophobicity/hydrophilicity ratios, secondary, tertiary, and quaternary structures, the flexibility/hardness of their molecules, and their ability to interact with other molecules (Hanmoungjai et al., 2002). The technological properties of proteins include processing functions such as solubility, emulsification, gelling and foaming capacity. Proteins must be biologically denatured to show the desired functionality in foods. Also, this denaturation occurs using processes such as aeration, agitation, pressure, or heat treatments.

1.3. Fish Protein Hydrolysates and Hydrolysis Process

One of the promising industrial uses of fish by-products is the formation of water-soluble fish protein hydrolysate (FPH) (Giannetto et al., 2020; López-Pedrouso et al., 2020). FPH is produced by breaking down proteins into small peptide chains, and free amino acids by chemical or biological means. The main purpose of the hydrolysis process is protein recovery and increasing the yield of valuable components (Adler-Nissen, 1993). Hydrolysis of proteins includes chemically acid or alkaline hydrolysis, autolysis, bacterial fermentation, and enzymatic hydrolysis. Acid or alkaline methods are used in the chemical process. Acid hydrolysis is preferred to alkaline hydrolysis because of the decrease in nutritional value at the end of alkaline treatment. During thermal treatment in an alkaline pH environment, partial losses occur in amino acids such as terrine, cysteine, lysine, tyrosine, and arginine. This situation causes the conversion of L-amino acids to D-amino acids with the formation of toxic substances such as lysinoalanine (Friedman, 1978; Kristinsson and Rasco, 2000a). Acid hydrolysis is performed in vegetable protein hydrolysates production as a flavor enhancer, in bouillon manufacturing (Aaslyng et al., 1998). Chemical hydrolysis has several disadvantages; during neutralization, a large amount of salt formation is observed in both acid and alkaline environments. There is minimal solubility and precipitation of proteins in the isoelectric point adjustment process. Endogen digestive enzymes of fish can be used in the autolysis process. The concentration of these enzymes varies greatly within a species and between species. Bacterial fermentation occurs by the growth of lactic acid bacteria, but in this method, the lipids cannot be removed (Kristinsson and Rasco 2000b). Enzymatic hydrolysis enables proteins to be broken down into smaller peptides and amino acids by proteolytic degradation. There is no nutrient loss in the product obtained at the end of this process. Although enzymatic hydrolysis is preferred to chemical hydrolysis, enzyme inactivation is needed at the end of the process. Endogenous and exogenous enzymes can be used in the production of FPH. A typical hydrolysis process is characterized by a rapid initial phase due to the presence of many peptide bonds ready to break. An enzymatic hydrolysis is a suitable option for the production of amino acids and short-chain peptides, which do not require excessive chemical and physical applications.

Depending on the enzyme activity, the initial phase may differ. The reaction rate decreases as the process progresses. The decrease in enzyme activity with a decrease in pH and the presence of fewer peptide bonds in the medium can be explained by the inactivation of the enzyme by hydrolysis products, (Moreno and Cuadrado, 1993). And the possible content of protease inhibitors presents in the substrate (Hjelmeland, 1983). The enzymatic hydrolysis process is affected by;

Substrate (type and composition)

Enzyme (hydrolytic specification and efficiency)

Enzyme/substrate ratio (E/S)

Factors such as hydrolysis conditions (pH, temperature, hydrolysis time) (Adler-Nissen 1986)

Proteins can be separated to form rich fractions by enzymatic hydrolysis based on extraction with commercial proteases. Thus, undesirable reactions that damage valuable components of proteins are

minimized using moderate temperatures and mitigating the effects of oxidation. Thus, functional properties (solubility, heat stability, water-binding ability, etc.) are preserved. The selection of enzymes is critical. Enzymes should be selected from the ones used in the production of foods, they should be reliable and if they are of microbial origin, the microorganism producing the enzyme should not be a pathogenic species (Beaulieu et al., 2009).

The enzymatic hydrolysis process generally comprises of three main stages;

Pretreatment,

Hydrolysis and

Recovery (He et al., 2013).

Pretreatment: the objective of this stage is to obtain a homogeneous mixture of minced raw material and water with low lipid content for hydrolysis. For this purpose, a homogeneous mixture is obtained by mixing the raw material and water in an equal ratio (1/1 w/w). Increasing the volume of water used does not increase protein recovery (Benjakul and Morrissey, 1997). The Food and Drug Organization (FDA) standardized the percentage of lipids in fish protein hydrolysates should be below 0.5% for human consumption (URL-1). Brown pigments resulting from lipid oxidation make a darker final product. For this reason, the amount of lipid in FPH should be well controlled. As a result, the raw material for FPH to be obtained from oily fish should be defatted before mixing with water. Organic solvents are used for this purpose. The defatting process not only reduces fat but also minimizes bacterial deterioration in FPH (Kristinsson and Rasco, 2000a).

Hydrolysis: after the pretreatment, the enzyme is added to the mixture homogeneously. Depending on the enzyme type, the process temperature and pH are adjusted to optimum conditions. The enzyme/substrate (E/S) ratio and the processing time are regulated depending on the desired functional properties and protein recovery in the final product. The hydrolysis is terminated by inactivating the enzyme at 90 °C for approximately 30 min. Thus, a liquid form of FPH is obtained. Enzyme selection is of great importance for the functional properties of protein hydrolysate. Enzymes such as pepsin, which was previously used in an acidic environment, were preferred because they also inhibit microbial growth in the environment. However, low acidity means a decrease in protein recovery, a decrease in nutritional value due to the breakdown of essential amino acids such as tryptophan, and a decrease in functional properties due to excessive hydrolysis (Kristinsson and Rasco, 2000a). As a result, enzymes such as alkalase, neutralase, and flavourzyme, which are active in neutral acidity under optimum conditions, are more preferred and used recently. When evaluated technically and economically, microbial enzymes are the most effective enzymes in the production of hydrolysate from fish proteins (Herpandi et al., 2011). The type of fish used is also of great importance in the relationship between FPH and enzymes. While protein recovery was 70.5% in FPH obtained from capelin using alkalase, it was 57.6% in FPH obtained using papain (Shahidi et al., 1995). Protein recovery rates can be changed by the effect of raw materials and enzyme types but the highest ratio have been obtained by using Alcalase compared with other enzymes, (flavourzyme, neutralase etc.) (Alavi et al., 2018; Korkmaz and Tokur 2021). **Recovery:** in this process, FPH is pulverized. FPH in liquid form has a risk of rapid deterioration. Storing and transporting the powdered product is easier and its shelf life is longer. At this stage, the drying process is performed after the centrifugation process. Centrifugation is mainly conducted at 4000 g/min for 20 min. In this process, the hydrolysate separates into three layers: lipid, protein hydrolysate solution, and a semi-solid layer from top to bottom. First, the upper lipid layer is removed, then the protein hydrolysate is removed. While the freeze dryer is used in laboratory studies, and spray drying is applied in industrial use. The final product can be obtained in a creamy white with good water solubility and desired functions (Balçık Mısır and Koral, 2019).

1.4. Enzymes used in the production of FPH

Enzymes are special biological catalysts that accelerate the reactions by bringing the necessary activation energy to the required minimum level for the realization of biochemical reactions that take place in the living structure and are left unchanged as a result of all these processes (Yıldız, 2007). The Enzyme Commission of the International Society for Biochemistry (IUB) has divided enzymes into 6 major classes: Oxidoreductases (EC1), Transferases (EC2), Hydrolases (EC3), Lyases (EC4), Isomerases (EC5), and Ligases (EC6) (Bergmeyer, 1979).

Enzymes are usually obtained from different plants, animal, and microbial sources. Plant enzymes that provide optimum hydrolysis in the pH range of 7 to 7.5 are papain (Gu et al., 2011;) and bromelain (Barbana and Boye, 2011; Forghani et al., 2012). Animal enzymes that provide optimal hydrolysis in the pH range of 2 to 8 are pepsin (Jumeri, 2011), trypsin, and α -chymotrypsin (Lee et al., 2011).

Microbial enzymes used for obtaining fish protein hydrolysates between pH 7 and 9 are alkalase (Gu et al., 2011; Ishak and Sarbon, 2016), protamex (Ngo et al., 2012), flavourenzyme, and neuterase (Je et al., 2009; Chi et al., 2015). Compared to enzymes of animal or plant origin, microbial enzymes have a wide range of catalytic activities and higher pH and temperature stability (Diniz and Martin, 1997). It has been reported that the most effective use of alkalase and flavourenzyme enzymes in fish protein hydrolysates is in the near-neutral pH range (7-9) (Herpandi et al., 2011).

1.5. Technological Applications of Fish Protein Hydrolysates

FPH has different properties depending on the raw material and production method. In addition, when combined with the properties of the main raw material to which it is added, a unique structure, nutritional value, and functional properties of the final product emerge.

FAO defines fish protein derivatives that can be available for human consumption because they contain higher amounts of protein than fish meat. Generally, FPH's contain 81–93% protein, less than 5% fat and 3–8% ash, and 1–8% moisture (Chalamaiah et al., 2012). The FDA determined that fish protein products can be utilized as a nutritional supplement for humans, provided that the hygienic conditions are met, with a protein content of more than 75% and a lipid content of below 0.5% (URL-1). Besides, FAO determined the maximum acceptable lipid value as 0.75%.

FAO and FDA guidelines emphasize that fish protein products can play an effective role in countries with protein deficiency. Nutritional studies have shown that adding these products to foods has definite positive effects.

It has been demonstrated that FPHs can be included in different food systems such as beverage fortification (Egerton et al., 2018), biscuit enrichment (Idowu et al., 2019), bread fortification (Vijaykrishnaraj et al., 2016), and ice-cream fortification (Shaviklo et al., 2011) to enrich the protein content.

They can be used as additives in various foods with their crucial and unique properties (protein enhancer, milk powder substitutes, emulsifying properties, water holding, and oil holding capacity, protein solubility, gelling activity, foaming capacity, and emulsification capacity (Chalamaiah et al., 2010).

Koç (2016) found that the hydrolysates produced from anchovy processing wastes contain 75% protein and 46% of these proteins are made up of essential amino acids. In addition to its nutritive properties, it has been determined that waste hydrolysates can be used as food additives with their emulsifying, foaming, water, and oil retaining properties. In terms of bioactive properties, hydrolysates were obtained from wastes at a concentration of 1 mg/ml; it was determined that it showed 60% ACE inhibition, 21% DPPH clearance, and 59% Fe+2 chelating activity. With these properties, it has been seen that there is a high level of use potential in the pharmacological fields. Fish protein hydrolysates improve the cooking yield of meat-based foods (Jenkelunas et al., 2018; Nur Ibrahim et al., 2020).

The patent number WO/2004/071202 reveals a method for injecting protein hydrolysates with 8%-20% concentrations obtained from salmon fish enzymatically into smoked salmon fillets with 18% brine and then the preservation of these fillets by cold and freezing. It has been reported that the added protein hydrolysate reduces the substantial loss of the product and delays the rancidity caused by lipid oxidation. In the sensory evaluation, it was stated that there was a slight change in smell and taste (Harald & Kjørtan, 2004). With the patent numbered US 6,926,918 B2, a method was developed describing the use of fish hydrolysates instead of salt in foods. In this study, it was revealed that bonito hydrolysate improves the salty taste in foods and beverages and can be used instead of salt (Grossbier et al., 2014). Niko et al. (2014) emphasized that tetrapeptides isolated from sturgeon skin hydrolysate can prevent the degradation of myosin and actin during repeated freezing-thawing processes.

FPH can be used as a cryoprotectant agent having different peptides with different amino acid sequences in fish muscle protein-based systems by suppressing the denaturation of myofibrillar proteins in frozen products. High contents of free amino acids, especially Asp, Glu, Arg, and Lys, in hydrolysate or peptides proved to offer protection against freeze-induced denaturation of proteins and enhanced its cryoprotective effect (Cheung et al., 2009). Zhang et al.; (2022) reported that the gelatin hydrolysates of flavourzyme from silver carp skin are promising candidates as natural and high-performance antioxidants and cryoprotectants in fish mince processing. In the study, researchers examined the Pacific hawthorn protein hydrolysate as a potential alternative to the 1:1 sucrose-sorbitol mixture commonly used as a cryoprotectant in frozen minced fish. They proved the high potential of using fish protein hydrolysates as a new generation cryopro-carrier to preserve frozen fish quality. Karnjanapratum and Benjakul (2015) determined that gelatin hydrolysate obtained from shark skin showed antioxidant and cryoprotectant effects in washed fish minced meat.

FPHs have the potential to be used as a coating material to delay lipid oxidation in seafood during cold preservation with natural antioxidants (Mirzapour-Kouhdasht et al., 2020; Balçık Mısır and Koral, 2021). In a master study titled "Determination of some quality changes during cold storage of trout fillets coated with powder protein hydrolysate obtained from trout waste". It was observed that hydrolysates were coated on the fillets of the trout fillet by dipping method and their changes were investigated during the cold storage. When the biochemical microbiological quality and sensory analysis were evaluated, the shelf life of the control group was 3 days, and the coated group was 7 days. According to the results of the study, it was determined that the edible coating made with protein hydrolysate obtained from the by-products of trout increased the shelf life of the trout fillets approximately 2 times Arslan (2016).

Edible protein films and coatings obtained from the hydrolysate of fish wastes have less carrying capacity (water vapor permeability) and are more flexible than other protein films (Dursun and Erkan, 2009). It has been determined that these products can be produced directly from fish meat and fish by-products, as well as from water-soluble proteins in surimi-washing water (Shiku et al., 2004).

FPH's can be evaluated as an alternative to synthetic products with their antioxidant, antimicrobial, and antihypertension activity properties (Sohail et al., 2020). However, only limited clinical studies have been managed on FPHs to test their efficacy as a functional food in humans. Marchbank et al. (2008) investigated the protective effect of a commercial FPH derived from Pacific haddock and marketed in the US as an "over-the-counter" health food supplement in small bowel injuries. In this study, it was revealed that dyspeptic symptoms occurred in four of the eight subjects selected as the control group, but these symptoms did not occur in eight subjects when FPH was administered. It has been reported that protein hydrolysates produced from fish can be used as nutritional supplements to support various metabolic activities because they contain bioactive components and provide easy absorption (Idowu et al., 2020).

2. CONCLUSION

Fish by-products are valuable resources with great potential for human consumption. FPH production of foods is a promising alternative for improved and economical use of these resources. Such practices will also support and enhance the sustainability of the global aquaculture and fishing industry. However, the quality and functional properties of the product can vary by changing the raw materials, enzymes, and production conditions. They can be utilized in high-value products, and future research should focus more on these segments to ensure sustainable and economical use of marine resources.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is a part of the PhD thesis of Gülsüm Balçık Mısır, the author thanks to my supervisor Assoc. Prof. Serkan Koral for valuable contributions.

FINANCIAL SUPPORT

The authors declare that there is no financial support.

CONFLICT OF INTEREST

There was no conflict of interest in the preparation of this article.

AUTHOR CONTRIBUTION

Single Author

ETHICAL STATEMENT

All the applicable ethical rules were followed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Research data is not shared.

REFERENCES

- Aaslyng, M. D., Martens, M., Poll, L., Nielsen, P. M., Flyge, H., & Larsen L. M. (1998). Chemical and sensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(2), 481-489. <https://doi.org/10.1021/jf970556e>
- Abbey, L., Glover-Amengor, M., Atikpo, M.O., Atter, A., & Toppe, J. (2017). Nutrient content of fish powder from low value fish and fish byproducts. *Food Science and Nutrition*, 5(3), 374-379. <https://doi.org/10.1002/fsn3.402>
- Adler-Nissen, J. (1993). Proteases. In *Enzymes in food processing*, Nagodawithana, T., Reed, G. (Eds.), Academic Press, San Diego, 480 s., 159-203.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT- Food Science and Technology*, 43(6), 837-842. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>
- Alavi, F., Jamshidian, M., & Rezaei, K. (2018). Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase. *Food Chemistry*, 277, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.122>
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Vongkamjan, K., Sumpavapol, P., & Yarnpakdee, S. (2015). Shelf life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6182–6193. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1706-y>

- Balçık Mısır, G., & Koral, S. (2019). Effects of ultrasound treatment on biochemical, structural, functional properties and antioxidant activity of protein hydrolysate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-products. *Italian Journal of Food Science*, 31, 2, <https://doi.org/10.14674/IJFS-1218>
- Balçık Mısır, G., & Koral, S. (2021). The impacts of ultrasound-assisted protein hydrolysate coating on the quality parameters and shelf life of smoked bonito fillets stored at 4±1°C. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(4), 427-435. <https://doi.org/10.12714/egejfas.38.4.04>
- Barbana, C., & Boye, J.I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.093>
- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bryl, P., & Carbonneau, M.E. (2009). Proteolytic processing of herring (*Clupea harengus*): Biochemical and nutritional characterisation of hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2113-2119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02046.x>
- Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430. <https://doi.org/10.1021/jf970294g>
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties, Review Article. *International Food Research Journal*, 15(3), 237-248.
- Cai, L., Wu, X., Dong, Z., Li, X., Yi, S., & Li, J. (2014). Physicochemical responses and quality changes of red sea bream (*Pagrosomus major*) to gum arabic coating enriched with ergothioneine treatment during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 160, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.093>
- Caklı, S., Kılınç, B., Dincer, T., & Tolasa, S. (2008). Shelf life of new culture species (*Diplodus puntazzo*) in refrigerator. *Journal of Muscle Foods*, 19, 315-332. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2008.00121.x>
- Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R., & Jyothirmayi T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Chalamaiah, M., Narsing, R. G., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties, *Food Chemistry*, 120, 652-657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.057>
- Cheung, I. W. Y., Liceaga, A. M., & Li Chan E. C. Y. (2009). Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen pacific cod fillet mince. *Journal of Food Science*, 74(8), 588-594. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01307.x>
- Chi, C. F., Wang, B., Hu, F. Y., Wang, Y. M., Zhang, B., Deng, S. G., & Wu, C. W. (2015). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*, 73, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.038>
- Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstein, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240, 505-513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>
- Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Marshall, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124(2), 640-645. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.088>
- Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1997). Effects of the extend of enzymatic hydrolysis on the functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT-Food Science and Technology*, 30(3), 266-272. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0184>
-

- Disney, J. G., Tatterson, I. N., & Oley, J. (1977). Recent development in fish silage. *Conference on the Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*. London, 5-7 June 1976, 273- 275.
- Donhowe, I. G., & Fennema, O. R. (1993). The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of methylcellulose films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 247-257. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1993.tb00729.x>
- Dursun, S., & Erkan, N. (2014). The effect of edible coating on the quality of smoked fish. *Italian Journal of Food Science*, 26(4), 370-382.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, P. R. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chemistry*, 245, 698–706
- Embuscado M. E., & Huber K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*. New York: Springer.
- Esteban, M. B., García, A. J., Ramos, P., & Márquez, M. C. (2007). Evaluation of fruit–vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets, *Waste Management*, 27, 2193-200, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.01.004>
- FAO, (2017). Committee on fisheries, sub-committee on fish trade, Sixteenth Session Busan, Republic of Korea, 4-8 September, 2017, Reduction of Fish Food Loss and Waste.
- FAO, (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020, Citation Address: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture> (13.06.2021).
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., Bakar, J., Abdul-Hamid, A., Hassan, Z., & Saari, N. (2012). Enzyme hydrolysates from stichopus horrens as a new source for angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9, 21-24. <https://doi.org/10.1155/2012/236384>
- Friedman, M. (1978). *Inhibition of lysinoalanine synthesis by protein acylation*. In: *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins* vol. 105, Friedman, M. (Ed.), Plenum Press, New York, ISBN: 978-1-4684-3366-1, 865 s., 613-648.
- Giannetto A., Esposito E., Lanza M., et al. (2020). Protein hydrolysates from anchovy (*Engraulis encrasicolus*) waste: in vitro and in vivo biological activities. *Marine Drugs*, 18, 86. <https://doi.org/10.3390/md18020086>
- Grossbier, D., Minneapolis, M. N., Bermea, M., Claremont, M. N., Rao, S., & Omaha, C. (2014). *Low sodium salt composition*. United States Patent Application, US 8,802,181.
- Gu, R. Z., Li, C. Y., Liu, W. Y., Yi, W. X., & Cai, M. Y. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Research International*, 44(5), 1536-1540. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.006>
- Hamzeh, A., & Rezaei, M. (2012). The effects of sodium alginate on quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored at 4±2 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21, 14-21. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.579384>
- Hanmoungjai, P., Pyle, D., & Niranjana, K. (2002), Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 771-776. <https://doi.org/10.1002/jctb.635>
- Haque, Z. U., & Mozaffar, Z. (1992). Casein hydrolysate II. functional properties of peptides. *Journal of Food Hydrocolloids*, 5, 559-571. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80125-2](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80125-2)
- Harald, H. & Kjartan, S. (2004). Process for improvement of meat quality in fish, protein hydrolysate and method of producing a protein hydrolysate. Norway Patent Application, WO/2004/071202
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), *Food Research International*, 50(1), 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>

- Helfman, G., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. (2009). Functional morphology of locomotion and feeding (2nd Ed.). In *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. Wiley-Blackwell. 111-127.
- Herpandi, N. H., Rosma, A., & Wan Nadiah, W. A. (2011). The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 195-207. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x>
- Hsu, K. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>
- Idowu, A. T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Pongsetkul, J., Sae-Leaw, T., & Sookchoo, P. (2019). Whole wheat cracker fortified with biocalcium and protein hydrolysate powders from salmon frame: characteristics and nutritional value. *Food Quality and Safety*, 3(3):191-199
- Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2017). Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of waste from shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) for the production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides using response surface methodology. *International Food Resources*, 24, 1735-1743.
- Je, J., Lee, Y.K.H., Lee, M.H. & Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266-1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.013>
- Jenkelunas, P. J., & Li-Chan, E. C. Y. (2018). Production and assessment of Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotectants for frozen fish mince, *Food Chemistry*, 239, 535-543. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.148>
- Jumeri, S. M. (2011). Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). *Food Science and Biotechnology*, 20(4) 1075-85. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0146-y>
- Khan, S., Rehman, A., Shah, H., Aadil, R. M., Ali, A., Shehzad, Q., Ashraf, W., Yang, F., Karim, A., Khaliq, A., & Xia, W. (2020). Fish Protein and Its Derivatives: The Novel Applications, Bioactivities, and Their Functional Significance in Food Products, *Food Reviews International*, <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1828452>
- Khiari, Z., Rico, D., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2015). Valorization of fish by-products: rheological, textural and microstructural properties of mackerel skin gelatins. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 19(1), 180-191. <https://doi.org/10.1007/s10163-015-0399-2>
- Kilincceker, O., Dogan, I. S., & Kucukoner, E. (2009). Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT- Food Science and Technology*, 42(2), 868-873. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.003>
- Kim, S. K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts-a review. *Food Research International*, 39(4), 383-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010>
- Korkmaz K., & Tokur B., (2021). Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology, *Food Bioscience* <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101312>
- Kristinsson, H.G. & Rasco, B.A. (2000a). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000b). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle protein hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 657-666. <https://doi.org/10.1021/jf990447v>
-

- Lee, B., Lopez-Ferrer, D., Kim, B. C., Na, H. B., Park, Y. I., Weitz, K. K., Warner, M. G., Hyeon, T., Lee, S., Smith, R. D., & Kim, J. (2011). Rapid and efficient protein digestion using trypsin-coated magnetic nanoparticles under pressure cycles. *Proteomics*, *11*, 309-318. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000378>
- Lin, L., Wang, B., & Weng, Y. (2011). Quality preservation of commercial fish balls with antimicrobial zein coatings. *Journal of Food Quality*, *34*, 81-87. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2011.00370.x>
- López-Pedrouso M., Lorenzo J. M., Cantalapiedra J., Zapata C., Franco, J. M., & Franco D. (2020). Aquaculture and by-products: challenges and opportunities in the use of alternative protein sources and bioactive compounds. *Advances in Food and Nutrition Research*, *92*, 127–185.
- Marchbank, T., Limdi, J. K., Mahmood, A., Elia, G., & Playford, R. J. (2008). Clinical trial: protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (nsaid)-induced small intestinal injury, alimentary pharmacology and therapeutics. *Journal of Compilation Aliment Pharmacology and Therapeutics*, *28*, 799-804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03783.x>
- Mirzapour-Kouhdasht, A., & Moosavi-Nasab, M. 2020. Shelf-life extension of whole shrimp using an active coating containing fish skin gelatin hydrolysates produced by a natural protease. *Food Science and Nutrition*, *8*, 214-223. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1293>
- Moreno, M. M. C., & Cuadrado, F. V. (1993). Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, *28*, 481-90. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(93\)85032-B](https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)85032-B)
- Motalebi, A. A. & Seyfzadeh, M. (2012). Effects of whey protein edible coating on bacterial, chemical and sensory characteristics of frozen common kilka (*Clupeonellia delitula*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *11*(1), 132-144.
- Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Wijesekara, I., & Kim, S. K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, *51*(4), 378-383. <https://doi.10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001>
- Nurilmala, M., Hizbullah, H. H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E., & Ochiai, Y. (2020). Effects of Fish Collagen Hydrolysate (FCH) as Fat Replacer in the Production of Buffalo Patties. *Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology*, *11*(1), 108–117. <https://doi.org/10.3390/md18020098>
- Olsen, R.L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, *36*(2), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.007>
- Pal, G.K. & Suresh, P.V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen- based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *37*, 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.015>
- Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Leeuwenburgh, C. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *56*(21), 10359-10367. <https://doi.org/10.1021/jf8017194>
- Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., & Diaz, O. (2012). Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *14*, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.003>
- Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., Moreno, V., Caride, A., Vieites, J. M., & Diaz, O. (2011). Whey protein-based coatings on frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*): Influence of the plasticiser and
-

- the moment of coating on quality preservation. *Food Chemistry*, 128, 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.026>
- Roslan, J., Yunos, K. F. M., Abdullah, N., & Kamal, S. M. M. (2014). Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044>
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/248935>
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Crapo, S., Reppond, K. D., & Prinnyawatkul, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 68, 2196-2200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05746.x>
- Seyfzadeh, M., Motalebi, A. A., Kakoolaki, S., & Gholipour, H. (2013). Chemical, microbiological and sensory evaluation of gutted kilka coated with whey protein based edible film incorporated with sodium alginate during frozen storage. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12, 140-153.
- Shahidi, F., Han X. Q., & Syniowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)93934-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93934-J)
- Shaviklo, G. R., Thorkelsson, G., Sveinsdottir, K., & Rafipour, F. (2011). Chemical properties and sensory quality of ice cream fortified with fish protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1199-1204
- Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2004). Effect of surimi quality on properties of edible films based on Alaska pollack. *Food Chemistry*, 86, 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.022>
- Shirai, K., & Ramirez-Ramirez, J. C. (2011). Utilization of fish processing by-products for bioactive compounds, In: Hall, G.M., Ed. *Fish Processing-Sustainability and New Opportunities*. Wiley-Blackwell, Preston, 236-258.
- Song, Y., Liu, L., Shen, H., You, J., & Luo, Y. (2011). Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22, 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.012>
- Tahergorabi, R., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 18, 746-756. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.006>
- URL-1. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.385> (05.07.2021)
- Vareltzis, K., Soutos, N., Zetou, F., & Tsiaras, I. (1990). Proximate composition and quality of a hamburger type product made from minced beef and fish protein concentrate. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 23(2), 112-116.
- Vijaykrishnaraj, M., Roopa, B., & Prabhasankar, P. (2016). Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel favour. *Food Chemistry*, 211, 715-725
- Yıldız S. (2007). *Enzimler*. Fakülte Kitabevi Yayınları, 1. Baskı, Isparta, 200 s. (In Turkish)
- Zhang, H., Zhang, Y., Javed, M., Cheng, M., Xiong, S., & Liu, Y. (2022). Gelatin hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) improve the antioxidant and cryoprotective properties of unwashed frozen fish mince. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15121>
-

Acta Aquatica Turcica

(e-ISSN: 2651-5474)

Copyright Release Form

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

Manuscript Title :

The author(s) warrant(s) that;

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

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

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

Full Name, Address of Corresponding Author:

E-Mail : Signature :

Full Name	Address	Signature

Acta Aquatica Turcica
Phone : +90 246 2146401 Fax: +90 246 2146445
<http://dergipark.org.tr/actaquatr>
actaquatr@isparta.edu.tr

Author Guidelines

PAGE SIZE

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

MARGINS

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

TEXT FORMATING

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

TITLE PAGE

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

- *Title*

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

- *Running title*

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

- *Authors names*

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

- *Institution*

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

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

- *Corresponding author*

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

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

- *ORCID's of the authors*

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

MANUSCRIPT FORMAT

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

Original Article	Short Communication	Case Report	Review Article
------------------	---------------------	-------------	----------------

Title

Short title

Authors

Institutions

Corresponding author e-mail

ORCID's of the authors

Title

Abstract

Keywords

Turkish title*

Turkish abstract*

Turkish keywords*

1. Introduction

2. Material and Methods

2. FREE CONTENT

2. Case Report

2. FREE CONTENT

3. Results

4. Discussion

3. Discussion

5. Conclusion

4. Conclusion

Acknowledgement

Funding

Conflict of Interest

Author Contributions

Ethical Statements

Data Availability Statement

References

* **Note:** Turkish title, abstract and keywords supports are provided for non-Turkish authors.

ABSTRACT

Abstract should concisely contain the purpose of the study, the methods used, the prominent findings, and its contribution to the literature. It should be written both in Turkish and English with a maximum of 300 words.

KEYWORDS

Keywords should be chosen from words that are not included in the title and reflect the study. At least 3 (three), maximum 5 (five) keywords should be specified. There should be a comma (,) between words and a dot (.) after the last word.

Keywords: CITES, aquaponics, production protocol, mortality, immunology.

DECIMAL NUMBERS

Comma “,” should be used in Turkish manuscripts and dot “.” should be used in English manuscripts.

Turkish: %10,25

English: 10.25%

SCIENTIFIC NAMES

The species name should be given without abbreviation (*Cyprinus carpio*) in the first place in the text, and then the genus name should be abbreviated (*C. carpio*).

TABLES

The table title should be positioned above the table and should be written concisely. Abbreviations used in the table should be explained below the table. The table must be in the form of a straight guide, with no special design applied. Authors are encouraged to convey the table contents to the reader in the table footer, independently of the article. Font size for footers should be 10 points. Tables should be cited in the text as Table 1, Table 2, etc. The tables should be given in the nearest place where it cited. Tables must be editable. Tables in screenshot or picture format are not accepted.

FIGURES

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

ACKNOWLEDGEMENT

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

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

FUNDING

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

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

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

CONFLICT OF INTEREST

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

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

Example:

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

ETHICAL APPROVAL STATEMENTS

The ethics committee approvals obtained for the study are indicated with information of institute, date, and number. Manuscripts that are not declare, although they require the Local Ethics Committee Approval in studies

conducted with vertebrates, and the Approval for Ethics Committee Approval of Non-Interventional Investigates in survey/interview studies will not be considered for scientific evaluation.

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

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

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

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

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

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

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

Example-5: Research data is not shared.

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

CITATIONS

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

- Single author

(Author, Year)

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

-- According to Küçük (2008), ...

- Two authors

(Author-1 and Author-2, Year)

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

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

- Three or more authors

(Author-1 et al., Year)

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

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

REFERENCES LIST

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

words in the names of the sources (journal, publishing house and congress) should be written with a capital letter.

1-Journal articles

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

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

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

2-Book

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

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

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

3-Book section

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

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

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

4-Web pages / Online documents

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

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

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

5-Dissertations/Thesis

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

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

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

6-Conference, symposium presentations

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

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

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

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

Yazım Kuralları

SAYFA BOYUTU

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

KENAR BOŞLUKLARI

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

YAZI STİLİ

Yazı karakteri : Times New Roman
Yazı karakteri büyüklüğü : 12 punto
Paragraf : İki yana yaslı
Paragraf girintisi : 1,25 cm
Satır aralığı : 2
Satır numarası : Metnin tümünde satır numarası atanmalıdır
Sayfa numarası : Sayfaların altına gelecek şekilde otomatik numaralanmış

BAŞLIK SAYFASI

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

- *Başlık*

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

- *Kısa başlık*

Başlığı yansıtmak üzere maksimum 75 karakterde kısa bir başlık verilmelidir.

- *Yazarlar*

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

- *Kurum bilgisi*

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

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

- *Sorumlu yazar*

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

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

- *ORCID bilgileri*

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

MAKALE FORMATI

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

Araştırma Makalesi**Kısa Makale****Olgu Sunumu****Derleme**

Başlık

Kısa başlık

Yazarlar

Kurum bilgileri

Sorumlu yazar e-posta adresi

ORCID bilgileri

Başlık

Özet

Anahtar kelimeler

Title

Abstract

Keywords

1. Giriş

2. Materyal ve Metot

2. SERBEST İÇEREİK

2. Olgu Sunumu

2. SERBEST İÇEREİK

3. Bulgular

4. Tartışma

5. Sonuç

3. Tartışma

4. Sonuç

Teşekkür

Finans

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar Katkıları

Etik Onay Beyanı

Veri Kullanılabilirlik Beyanı

Kaynaklar

ÖZET

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

Not: Türk olmayan yazalar için Türkçe Özet desteği sağlanmaktadır.

ANAHTAR KELİMELELER

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

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

ONDALIK GÖSTERİM

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

Türkçe: %10,25

İngilizce: 10.25%

LATİNCE GÖSTERİM

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

TABLolar

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

ŞEKİLLER

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

TEŞEKKÜR

Bu bölümde finansal destek dışında çalışmanın yürütülmesine katkı sunanlar belirtilir.

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

FİNANS

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

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

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

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu bölümde yazarların varsa çıkar çatışmaları belirtilir.

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

YAZAR KATKILARI

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

Örnek:

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

ETİK ONAY BEYANI

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

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

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

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

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

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

DOI adresi ile erişime açıktır.

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

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

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

Örnek-5: Araştırma verileri paylaşılmaz.

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

ATIFLAR

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

- Tek yazar:

(Yazar, yıl)

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

-- Küçük (2008)'e göre ...

- İki yazar:

(Yazar-1 ve Yazar-2, yıl)

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

-- Ekici ve Koca (2021b)'a göre ...

- Üç ve daha çok yazar:

(Yazar vd., yıl)

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

-- Boyacı vd. (2020)'e göre ...

KAYNAKLAR

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

1-Makale

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

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

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

2-Kitap

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

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

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

3-Kitap bölümü

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

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

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

4-Web sitesi

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

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

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

5- Tezler

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

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

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

6- Konferans, sempozyum sunumları

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

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

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

NOT: Dergi yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmayan makaleler değerlendirmeye alınmamaktadır.