

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GEMİ BALAST SULARI İLE TAŞINAN YABANCI TÜRLERİN eDNA
METABARKODLAMA YÖNTEMİYLE TESPİTİ VE RİSK ANALİZLERİ:
İZMİT KÖRFEZİ**

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Yusuf Koray KÜÇÜK

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

GEMİ BALAST SULARI İLE TAŞINAN YABANCI TÜRLERİN eDNA METABARKODLAMA YÖNTEMİYLE TESPİTİ VE RİSK ANALİZLERİ: İZMİT KÖRFEZİ

Yusuf Koray KÜÇÜK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Akasya TOPÇU

Deniz taşımacılığının günden güne katlanarak gelişimi balast sularını, zararlı sucul organizmalar ve istilacı türlerin farklı ortama taşınımı için ana lokomotif haline getirmiştir. Hergün binlerce ton balast sularının taşınımının izlenmesi ve kontrolü amacıyla Dünya Denizcilik Örgütü (IMO) Uluslararası Gemi Balast Suları ve Sedimentlerinin Kontrolü ve Yönetimi Sözleşmesi'ni 12 yıllık bir gecikmenin ardından 2017 yılında yürürlüğe koymuştur. Sözleşme, biyolojik istila ile mücadelede biyolojik analizleri de içeren balast suyu değişimi ve balast suyu arıtma sistemlerinin kullanımı gibi iki ana balast suyu yönetim stratejisi belirlemiştir. Bu tez çalışmasında, biyolojik analizler için denizcilik sektöründe zamanın ve doğru analizin çok önemli olduğu göz önünde bulundurularak, geleneksel yöntemlerden farklı olarak çok daha uyumlu olduğu düşünülen çevresel DNA (eDNA) metabarkodlama yöntemi kullanılmıştır.

Biyolojik istila dünyanın biyolojik çeşitliliği, ekosistem yapısı, işleyişi, türlerin evrimi ve insan sağlığı üzerinde büyük bir tehdit oluşturmaktadır. eDNA metabarkodlama, kontamine olduğu düşünülen su, sediment veya hava örnekleri üzerinden çalışılmakta olup biyoçeşitliliği değerlendirmek için eşsiz bir yöntemdir. Bu araştırmanın amacı, çeşitli bölgelerden gelen ve İzmit Körfezi'ne giren gemilerin balast sularından eDNA metabarkodlaması ile metodolojik ve biyoinformatik süreç kapsamında tür tespitini içermektedir. Bu çalışmada, ayrı gemilere ait balast sularının birleştirilmesi ile oluşturulmuş toplu örneklerden mitokondriyal 12S ve 16S ribozomal RNA (rRNA) gen dizilerinin kullanımı ile sırasıyla 40 tür ve 2 tür için moleküler tanımlama yapılmıştır. Mitokondriyal 18S (rRNA) v4 ve 18S (rRNA) v8 gen dizilerinin kullanımı ile ise sırasıyla 59 tür ve 54 tür izole edilmiştir. DNA barkodları olarak bilinen mitokondriyal Sitokrom C oksidaz alt birim I (COI) dizilerinin kullanımı sonucunda ise 15 tür tanımlanmıştır. Balast sularındaki zararlı mikroorganizmalar, insan ve balık sağlığı için tehdit oluşturabilecek birçok bakteri, maya, mantar ve parazitin patojenik formlarını içerebilir. Bu araştırma kapsamında incelenen gemi balast sularında; istilacı bir denizanası türü olan "*Rhopilema nomadica*" eDNA metabarkodlama yöntemiyle teşhis edilmiştir. Metabarkodlama tekniği, özellikle istilacı olan türlerin erken tanımlanması ve yönetim planlarının uygulanması açısından son derece kullanışlı, doğru ve hızlı bir yöntemdir. Aynı zamanda gelecekteki moleküler araştırmalar açısından bilimsel iş birliği ve koordinasyon hayati önem taşımaktadır.

Şubat 2022, 135 sayfa

Anahtar kelimeler: Gemi balast suyu, İzmit Körfezi, eDNA metabarkodlama, istilacı tür, yabancı tür

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETECTION AND RISK ANALYSIS OF NON-INDIGENOUS SPECIES TRANSPORTED
BY SHIP'S BALLAST WATER BY eDNA METABARCODING METHOD: GULF OF
İZMIT

Yusuf Koray KÜÇÜK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries And Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Akasya TOPÇU

The exponential development of maritime transport has made balast waters as a main locomotive for the transport of harmful aquatic organisms and invasive species to different environments. In order to monitor and control the transport of thousands of tons of balast water every day, the World Maritime Organization (IMO) entered into force the International Ship Balast Water and Sediments Control and Management Convention in 2017, after a 12-year delay. The Convention has identified two main balast water management strategies to combat biological invasion, namely balast water exchange, and the use of balast water treatment systems including biological analysis as well. In this thesis, considering that time and accurate analysis are very important in the maritime industry, environmental DNA metabarcoding method, which is thought to be much more compatible with the industry than traditional methods, was used for biological analysis.

A major threat to the world's biodiversity, biological invasions, are with consequences on ecosystem structure, functioning, species evolution, and human health. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding, a unique method of assessing biodiversity, wherein samples are taken from the environment via water, sediment or air from which is thought to be contaminated. This research is intended to provide an overview of methodological and bioinformatics considerations for eDNA metabarcoding from the balast waters of ships incoming from various regions and entering İzmit Bay. The findings for DNA sequences from the mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA (rRNA) genes was found to be 40 species and 2 species, respectively in pooled balast waters of ships'. DNA sequences from the mitochondrial 18S (rRNA) v4 and 18S (rRNA) v8 genes for 59 species and 54 species, respectively. According to the detection of mitochondrial *Cytochrome c oxidase subunit I* (COI) sequences; known as DNA barcodes, 15 species were determined from the pooled balast waters of ships's. The introduction of harmful microorganisms in these balast waters, can contain pathogenic forms of many bacteria, yeast, fungi, and parasites which can pose a threat to human and fish health. We document the presence of highly invasive "*Rhopilema nomadica*" in balast tanks of surveyed ships. Metabarcoding offers a potential method to identify these species early and implement management plans. Concurrently scientific collaboration and coordination vitally needed to the future of molecular research.

February 2022, 135 pages

Key Words: Ship balast water, İzmit Bay, eDNA metabarcoding, invasive species, non-indigeneous species

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması akademik yolun sonu mu yoksa yeni bir başlangıcın anahtarı mı bunu zaman gösterecek elbet. Ancak bu serüvenin ilk adımlarında ne düşünceyle yola çıktıysam, son noktayı koyarkende aynı düşünceler içerisindeyim. Uzun ince bu yolda edinilen bu bilgileri, kazanılan deneyimler ile harmanlayıp verilmesi gereken kararların belki de devlet için atılacak mühim imzaların altına serpmekti amacım. Bu önsözü yazmaya kadar verilen bunca emek, öncelikle insanın kişisel gelişimi bir üst noktaya çıkarması ve dünyada meydana gelen olayları daha iyi yorumlamak adına kişinin doğru kararlar verebilmesi için bir gaye olması gerektiği düşüncesindeyim. Fikirlerim ve temennilerimden sonra biraz da teşekkürü bir borç bildiklerimden bahsetmek isterim.

Doktora teziyle sonuçlandırdığım akademik kariyer basamaklarını tırmanırken, bana değerli katkıları bulunan başta Sayın Hocam Prof. Dr. Mine UZBİLEK KIRKAĞAÇ olmak üzere tüm Su Ürünleri Anabilim Dalı akademik kadrosuna, ayrıca eDNA analizlerinin yürütülmesinde desteğini aldığım Sayın Hocam Doç. Dr. Emre KESKİN ve yönetimindeki Evrimsel Genetik Laboratuvarı ekibine teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tezime başlayan ve bu zamana kadar yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, bu yolda beni en doğru şekilde yönlendiren ve cesaretlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Akasya TOPÇU'ya, tez izleme komitesinde önerileriyle ve tüm nezaketleriyle beni yönlendiren Sayın Prof. Dr. Ali Serhan TARKAN, Sayın Doç. Dr. Emre KESKİN, Sayın Doç. Dr. İlknur MERİÇ ve Sayın Doç. Dr. Nurçin KİLLİ hocama sonsuz teşekkürlerimi iletmek isterim. Ayrıca, örnek alım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Kocaeli Liman Başkanlığı personeline ve tez çalışması dönemi boyunca bana yardımcı olmaya çalışan tüm Denizcilik Genel Müdürlüğü yöneticilerine saygılarımı sunmak isterim.

Son olarak, bilimin ve bürokrasinin beraber ilerlemesi gerekliliğini davranışlarıyla ve uygulamalarıyla bana aşıl原因 ve bu tez çalışması için her fırsatta beni motive eden babam Sayın Dr. Mahir KÜÇÜK'e, kamu ve akademik kariyerin beraber yürütülmesinden kaynaklı bu zorlu süreçte bana her zaman destek olan eşim Bülşah KÜÇÜK'e ve henüz farkında olmasalar da sergiledikleri sabırdan ötürü oğlum M. Ali ve kızım Şevval'e en derin minnetlerimi sunarım.

Y. Koray KÜÇÜK

Ankara, Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	1
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 DNA Metabarkodlama Uygulamaları.....	4
2.2 Çevresel DNA (e-DNA) ve Konuya İlişkin Bildiriler	8
2.3 Balast Suları ve Yabancı Tür Taşınım Metodları.....	17
2.3.1 İstilacı tür taşınımında gemi kaynaklı vektörler.....	18
2.4 IMO Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi	20
2.4.1 Uluslararası Denizcilik Örgütü ve çalışmaları	21
2.4.2 Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesinin oluşumu	23
2.4.3 Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesine genel bakış	23
2.4.4 Balast Suyu Sözleşmesi Mevzuatı ve uygulama rehberleri	27
2.4.4.1 Balast suyu değişimi standartları (D-1)	32
2.4.4.2 Balast suyu arıtım standartları (D-2)	34
2.4.5 BWM Sözleşmesinin uygulanmasındaki zorluklar	35
2.4.5.1 D-2 standardında karşılaşılan teknik sorunlar	35
2.4.5.2 Çevresel maruziyet.....	38
2.4.5.3 İnsana ilişkin maruziyet	39
2.4.5.4 Gemilere takılacak arıtım cihazlarında üretim sorunları.....	39
2.4.6 Balast suyu arıtımında kullanılan yöntemler	41
2.4.6.1 Mekanik yöntemler	42
2.4.6.2 Fiziksel yöntemler	42
2.4.6.3 Kimyasal yöntemler	42
2.4.6.4 Diğer yöntemler	42
2.4.7 Arıtma işlemi kaynaklı riski yönetme	44

2.4.8 Alternatif yöntemler	45
2.5 Genetik Yöntemlerin Balast Suyu Yönetimine Entegrasyonu.....	45
2.6 Balast Suyu Sözleşmesinin Uygulamasında Genetik Verilerin Rolü ve Geliştirilmesi.....	47
2.7 Yabancı (İstilacı) Tür Tanımlaması ve Risk Analizleri ile ilgili Genel Bilgiler	48
2.7.1 İstila periyodunun değerlendirilmesi	50
2.8 Yeni Çevreye Taşınan Türün İstilacıya Dönüşümü.....	52
2.9 Gemi Balast Suları ile Karadeniz’e Taşınmış İstilacı Türler.....	53
2.10 İstilacı Türlerin Karadeniz Sahillerine Verdiği Zararlar	54
2.11 Risk Değerlendirmesi.....	56
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	58
3.1 Materyal	58
3.2 Yöntem	61
3.2.1 eDNA metabarkodlama yöntemine ilişkin moleküler analiz:	62
3.2.1.1 Örneklem ve filtrasyon	62
3.2.1.2 Moleküler analizler	62
3.2.1.2.1 Longmire solüsyonunun hazırlanması	62
3.2.1.2.2 DNA izolasyonu	63
3.2.1.2.3 Longmire solüsyonundan izolasyon	63
3.2.1.2.4 Sterivex filtrelerinden izolasyon	64
3.2.1.2.5 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	65
3.2.2 Örnek havuzlarının oluşturulması	66
3.2.3 Kütüphane basamağı	66
3.2.3.1 TruSeq nano DNA library prep kiti “Repair Ends” basamağı	66
3.2.3.2 TruSeq nano DNA library prep kiti “Adenylate 3’ Ends” basamağı.....	68
3.2.3.3 TruSeq nano DNA library prep kiti “Ligate Adapters” basamağı	68
3.2.4 Yeni nesil dizileme.....	70
3.2.5 Biyoinformatik analizler.....	70
3.3 Tür Tespiti	71
3.4 Risk Analiz Değerlendirmeleri.....	72
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	73
4.1 Primer Sonuçları	73
4.2 Risk Analizi Bulguları	101
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	110

5.1 Balast Suyu Sözleşmesi D-2 Standardına İlişkin Değerlendirmeler	110
5.2 Balast Suyu Sözleşmesi Kapsamında PSC'lerin Yaptıkları Liman Devleti Denetimlerine İlişkin Değerlendirmeler	111
5.3 Morfolojik Taksonomi Yerine Genetik Tabanlı Tür Teşhisinin Kullanımına İlişkin Değerlendirmeler.....	112
5.4 Balast Suyu Sözleşmesi ve Rehberlerinin eDNA Metabarkodlama Yöntemiyle Uyumuna İlişkin Değerlendirmeler	116
5.5 Balast Suyu Sözleşmesi kapsamında Muafiyetlerin ve G14 Rehberinin Değerlendirilmesi	117
5.6 Farklı Primerlerin Kullanımı ile Elde Edilen Okuma Sonuçlarına İlişkin Değerlendirmeler.....	118
5.7 İstilacı Tür Sonuçları ve Risk Analizlerine İlişkin Değerlendirmeler	119
5.8 Genel Değerlendirmeler.....	121
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ.....	135

KISALTMALAR DİZİNİ

12S rRNA	12S ribozomal RNA
16S rRNA	16S mitokondriyal ribosomal DNA
18S rRNA	18S nükleer ribosomal RNA
BWM	Balast Suyu Yönetimi
BWE	Balast Suyu Değişimi
BWT	Balast Suyu Arıtımı
Cfu	Koloni oluşturan birim
COI:	Sitokrom oksidaz c alt ünite I
D-1	Balast Suyu Değişim Standard
D-2	Balast Suyu Performans Standardı
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GT	Gros Ton
HAOP	Zararlı Sucul Organizmalar ve Patojenler
IMO	Uluslararası Denizcilik Örgütü
HELCOM	Baltık Deniz Çevresi Koruma Komisyonu
MEPC	Deniz Çevresi Koruma Komitesi
µm	Mikrometre
OSPAR	Kuzey-Doğu Atlantik Deniz Çevresinin Korunma Komisyonu
PSC	Liman Devleti Kontrolörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asid
UNCTAD	Birleşmiş Milletler Ticaret ve Kalkınma Konferansı
USCG	Amerika Birleşik Devletleri Sahil Güvenlik Teşkilatı
WWF	Dünya Doğayı Koruma Vakfı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Gemi tiplerine göre detveyt ton cinsinden dünya ticaret filosu (UNCTAD 2021).....	2
Şekil 2.1 Denizlerde biyolojik istilanın araştırma ve gözetimine yönelik moleküler yöntem uygulamalarının zaman çizelgesi	8
Şekil 2.2 Mevcut sucul e DNA literatürü. (a) açıklanan yöntemlerin toplam sayısı ve (b) tatlı su ve deniz ekosistemlerinde gerçekleştirilen sucul eDNA araştırmalarının oranı (Jeunen vd. 2019)	11
Şekil 2.3 Gemi karina ve pervanesinde oluşan biofouling	19
Şekil 2.4 Balast operasyonu	20
Şekil 2.5 IMO Sözleşmelerinin imzalandıktan sonra yürürlüğe giriş süreleri	21
Şekil 2.6 Gemi balast operasyonu döngüsü (Globalast 2014).....	25
Şekil 2.7 Liman devleti kontrolörleri için uygulanması gereken adımlar	30
Şekil 2.8 D-1 değişim standardı için uygun deniz alanları (David vd. 2015)	33
Şekil 2.9 Balast suyu değişim yöntemleri (Globalast 2014-2017c)	34
Şekil 2.10 D-1 ve D-2 standartlarına uyum takvimi (IMO 2021b)	36
Şekil 2.11 D-1 ve D-2 Standardında Türk Bayraklı gemi sayısı	40
Şekil 2.12 Gemi üstü D-2 arıtma sistemleri (Güney 2018)	41
Şekil 2.13 Gemi montajı tamamlanmış balast arıtım cihazı.....	43
Şekil 2.14 Balast arıtım cihazında arıtım işlemi yapan probalar.....	44
Şekil 2.15 İstila adımlarının modellenmesi (Lockwood vd. 2013)	51
Şekil 3.1 Marmara Denizi Kocaeli sınırları içerisinde belirlenen liman tesisleri.....	60
Şekil 3.2 Balast örnekleme yapılan gemilerin geldiği ülkeler.	61
Şekil 4.1 12s primer okuma yüzdeleri	75
Şekil 4.2 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren canlıların 12s primer okuma yüzdeleri	76
Şekil 4.3 16s primer okuma yüzdeleri	78
Şekil 4.4 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgalı 16s primer okuma yüzdeleri	79
Şekil 4.5 coi primer okuma yüzdeleri	83
Şekil 4.6 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgasız coi primer okuma yüzdeleri	84
Şekil 4.7 18sv4 primer okuma yüzdeleri	91
Şekil 4.8 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren ökaryot 18sv4 primer okuma yüzdeleri	92

Şekil 4.9 18sv8 primer okuma yüzdeleri.....	98
Şekil 4.10 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren canlıların 18sv8 primer okuma yüzdeler	99
Şekil 4.11 <i>Rhopilema nomadica</i>	101



ÇİZELGELER DİZİNİ

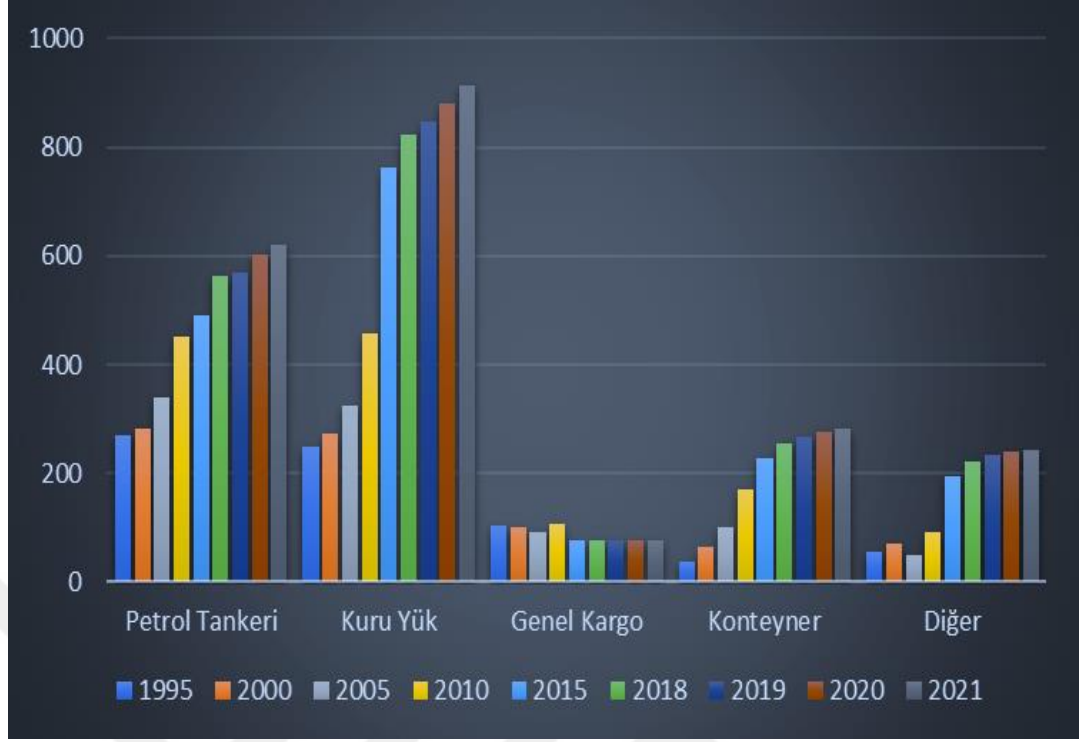
Çizelge 2.1 BWM Sözleşmesinin Kuralları ve İlgili Rehberleri (Rey 2019'dan modifiye edilmiştir)	28
Çizelge 2.2 D-2 Değişim Standartları (Biosea 2019)	35
Çizelge 2.3 Karadeniz'de istilacı türler (Özdemir ve Ceylan 2007).....	54
Çizelge 4.1 12s (balık/omurgalı) primeri sonuçları	74
Çizelge 4.2 16s (omurgalı) primeri sonuçları	77
Çizelge 4.3 coi (omurgasız) primeri sonuçları.....	80
Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları	85
Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları	93
Çizelge 4.6 Primer okumalarına göre tespit edilen istilacı türler	100
Çizelge 4.7 Şüpheli okuma yüzdelerine göre primer okumaları	100
Çizelge 4.8 <i>Rhopilema nomadica</i> türüne ait risk analizi	102

1. GİRİŞ

Gemilerin son yüzyılda teknolojik, mühendislik ve sınıfsal olarak dikkate değer biçimde evrimleşmesi, deniz taşımacılığının gelişmesine katkı sağlamıştır (Şekil 1.1). Gemilerin modernize olmasıyla beraber, deniz ticareti artma eylemine geçerek küreselleşmenin de önünü açmıştır (Ojaveer vd. 2018, Rey, 2019).

Gelişen gemi inşa sanayi ve takibindeki teknolojik gelişmeler, gemi hızlarının artmasına ve belirli bir periyotta çok sayıda limana uğrayarak sucul organizmaların daha fazla limana ulaşmasına, gross tonajlarının artması ise sucul organizmaların tutunabilecekleri daha fazla yüzey alanının ortaya çıkmasına (biofouling) yol açarak, sucul organizmaların farklı ortamlara yayılımının hız kazanmasına neden olmuştur. Ayrıca, gemilerin limanlara ulaşma süresinin kısılması, seyir sırasında çok daha fazla organizmanın hayatta kalabilmesine sebep olurken, balast tanklarının spesifik olarak balast suyuna özel dizayn edilmesi, balast suyunun gemi tanklarında bulunan kimyasal ve petrol atıklarıyla karışmayarak su kalitesini belli bir seviyede tutmasına ve organizmanın hayatta kalma olasılığının artmasına sebep olduğu bir gerçektir.

Deniz taşımacılığındaki gelişmeler, küresel denizciliğin gelişimine katkı sağlayarak, yük taşıma tanımını değiştirmiştir. Önceden yük bir limandan belirlenen diğer bir limana taşınırken, günümüzde hub (aktarma merkezi) yöntemine geçilerek önce küçük limanlardaki yüklerin hub limanlara taşınmasına, buradan hedeflenen limanlara aktarılmasına başlanmıştır (Crooks ve Suarez, 2006, Ojaveer vd. 2018). Sonuç olarak, deniz ticareti filosu yılda 10 milyar ton balast suyunun yer değiştirmesine ve yaklaşık $325 \times 10^6 \text{ m}^2$ gemi gövde alanının ıslak kalarak biofouling için uygun ortamın oluşmasına neden olmuştur (David ve Gollasch 2015; Moser vd. 2016).



Şekil 1.1 Gemi tiplerine göre detveyt ton cinsinden dünya ticaret filosu (UNCTAD 2021)

Balast suyunda bulunan yabancı/istilacı türlerin doğru ve başarılı yöntemlerle moleküler tespiti ve istilacılık potansiyellerinin belirlenmesi ile deniz ekosistemini tehdit eden istilacı türlerin sucul sisteme girişinin engellenmesi, biyoçeşitliliğin korunması, turizm alanlarında özellikle yüzme alanlarında gemi balast sularından kaynaklanabilecek olumsuz etkilerin azaltılması ve salgın hastalıkların önlenmesi ile insan sağlığının korunması gibi çevresel ve biyoekonomik faydalar sağlanması amaçlanmakla beraber uygulanacak yöntemin laboratuvar yöntemlerine göre hızlı sonuç vermesi, liman ve gemicilik faaliyetlerini ekonomik olarak olumlu yönde etkileyecektir.

Tatlı su ve okyanuslarda küresel biyolojik çeşitlilik yüksek oranda azalmaktadır. Özellikle nesli tükenmekte olan türler için sucul bio eşitliliği izlemek ve değerlendirmek için güvenilir yöntemlerle çalışmak, zaman planlaması ve bunun etkili olabilmesi açısından önemli unsurlardır. DNA dizilimindeki son gelişmeler,  evresel DNA'dan türlerin tespiti için yeni bir yöntem sağlamıştır (Valentini vd. 2016).

Bu kapsamda planlanan tez çalışması ile Marmara Denizi Kocaeli sınırları içerisinde belirlenen 3 bölge ve yaklaşık 15 liman tesisinden, alınan özel izinler kapsamında liman tesisine uğrayan gemilerin balast tanklarından elde edilen balast suyu numunelerinde, istilacı türlerin eDNA metabarkodlama yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca belirlenen türlerin modern risk analizi araçları ile istilacılık potansiyelleri de tespit edilmiştir. Moleküler teknikler ile türlerin hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilmesi ve risk analizleri ile bu türlerin zarar potansiyellerinin öngörülmesi ile en uygun yönetim yaklaşımları belirlenebilecek bu sayede ekonomik maliyetlerin azaltılmasının yanı sıra biyolojik çeşitliliğin etkin bir korunması da sağlanmış olacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 DNA Metabarkodlama Uygulamaları

Yüksek verimli dizileme teknolojisinde yaşanan gelişmeler, alınan örneklerdeki tüm organizmalar üzerinde eş zamanlı çalışma imkânı sunan ve paralel olarak 100 binden 10 milyona kadar sıralı okuma sağlayabilen DNA metabarkodlama tekniğinin ortaya çıkmasını sağlamıştır.

DNA metabarkodlama tekniğinin çalışma prensibinde; örnekler öncelikle hedef ortamdan (gemi balast tanklarından) toplanarak, suyun filtre edilmesi gibi ön işleminden geçirilerek DNA ekstraksiyonu için hazırlanır. Sonrasında DNA çıkartma işlemi yapılarak PCR yardımıyla DNA bölgesi amplifiye edilir. Her numunenin birbirinden ayırt edilebilmesi için PCR ile herbir örneğe özgü indeks olarak tanımlanan benzersiz nükleotid dizileri eklenir. Örnekler biraraya toplanarak dizilemeye gönderilir. Sonrasında, her örnekten alınan diziler, primerlerin, hibrit ve düşük kalitedeki dizilerin kaldırılması, dizilerin yalnızca barkod bölgesi içinde hizalanan dizileri tutmak için bir referans hizalama veri tabanına göre hizalanması ve dizilerin Operasyonel Taksonomik Birimde (OTS) kümelenmesi, tek bir dizide çıkarılması ve veri tabanına karşı taksonomik olarak atanma işlemlerini içeren bu adımda, biyoinformatik analiz ile taksonomik olarak tanımlanır. Son olarak, elde edilen organizmalara ait veriler yorumlanır (Rey 2019).

Metabarkodlama yöntemi; kısa bir zaman diliminde birçok örneğin taranabilmesi imkânını sunduğu için morfolojik tabanlı taksonominin önüne geçerek son zamanlarda popüleritesini giderek arttırmaktadır (Aylagas vd. 2018). DNA metabarkodlama, ortamdaki istilacı türlerin tespitinde ve ekolojik durum değerlendirmelerinde özellikle balast suları ve liman bölgesi izlemelerinde avantajlı bir yöntem olarak, metabarkod tabanlı çalışmaların artmasıyla birlikte gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır.

eDNA yöntemiyle gemi balast suyunda bulunan mikroorganizmaların tespitine odaklanan çalışma Rey (2019) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, gemi kaynaklı balast suyu taşınımının biyolojik çeşitliliğe etkisini, genetik araçlar kullanarak tespitinin değerlendirilmesi ve limanlar için balast suyunun izlenmesinde eDNA metabarkodlama uygulamalarını kolaylaştıracak bir rehber oluşturmak amaçlanmış olup sonuç olarak da genetik yöntemlerin BWM sözleşmesinde var olan önleyici yöntemlere entegre edilmesi planlanmıştır. Chesapeake Körfezi'ne (A.B.D) ulaşan 11 geminin farklı noktalarından balast numunesi alınmış olup içlerinden 2 gemide ise balast arıtım cihazı bulunduğu bildirilmiştir. Metabarkodlama yönteminin kullanılması, gemilerde kullanılan balast arıtım sistemlerinin mikroorganizma çeşitliliğini düşürebilme potansiyeline sahip olabileceğini ortaya koymuştur. eDNA açısından, genellikle ökaryotları incelemek için seçilen iki primer (COI ve 18S) kullanılmış ve her ikisinin de yalnızca tür açısından değil, filum düzeyinde de farklı taksonları saptadığı ortaya çıkmıştır. Böylece, primerlerin birbirini tamamladığı ve istilacı türlerin tespiti için farklı primerlerin kullanımının önemli olduğu vurgulanmaktadır (Ammon vd. 2018, Borrell vd. 2017, Gray vd. 2018).

Farklı primerlerin kullanımı göz önünde bulundurulduğunda, balast suyunun izlenmesi için çok uygun maliyetli bir yaklaşım haline gelen filtrelenmiş su numunesinin kapasitesi önem oluşturmaktadır (Stat vd. 2017). Tek bir balast örneğinden, tüm biyoçeşitliliği hedeflemek ve dolayısıyla limanlara boşaltılan mikroorganizmaları daha iyi karakterize etmek mümkün olabilmektedir. Morfolojik tanımlamadan farklı olarak metabarkodlama, yüzlerce örneğin analizinin uygun maliyetli bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır (Aylagas vd. 2018) ve limanlar için kapsamlı olarak balast suyunun izlenmesine olanak tanımaktadır. Çalışmanın önemli sonuçlarından biri ise, bölgede o ana kadar hiçbir kaydı olmayan yedi türün varlığını da tespit ederek, istilacı türlerin erken tespiti için eDNA'nın mevcut potansiyelini vurgulamak olmuştur. Ayrıca, daha önce yapılan analizlerde, Bilbao'da kaydedilen istilacı türlerin hiçbirine rastlanılmamıştır. Bunun nedenleri arasında, araştırma sırasında bu türlerin balast suyunda bulunmaması veya veri tabanı eksikliği, DNA ekstraksiyonu süreci ve az sayıda primer kullanımı gibi metabarkodlama süreciyle ilgili sorunlar olabilmektedir. Balast sularındaki tür teşhisindeki genetik araçlar;

tamamlanmış referans veritabanı eksikliği, standart protokoller veya balast suyu izlemeye özgü teknik zorluklar gibi durumlarla karşı karşıyadır ve yaşayabilirlik değerlendirmesi gibi Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesinin tüm temel kriterlerini karşılamamaktadır. Yine de, RNA'nın balast suyu yoluyla boşaltılan canlıları tespit edilebilme potansiyelini değerlendirmek ve gemide genetik analizler için fizibiliteyi test etmek adına kapsamlı deneysel araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, iki çift primerin birleştirilmesinin, liman biyoçeşitliliğine daha bütünsel bir bakış sağladığını, farklı taksonomik grupların tespiti için örnekleme yöntemlerinin bir kombinasyonunun gerekli olduğunu, yani eDNA'nın geleneksel örneklemenin yerini alamayacağı ve örneklemelerin tercihen ilkbahar ve yaz sonunda yapılmasının daha iyi sonuçlar verebileceği bu çalışma tarafından ortaya konulmuştur.

Visco vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, Cenevre'de bulunan 27 nehir bölgesinden, nehirlerde ve akarsularda su kalitesinin değerlendirilmesi için biyoindikatör olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta olan diatom örnekleri alınmış, çevresel DNA ve RNA örneklerinde bulunan diatomları belirlemek ve niceliğini ölçmek için yeni nesil dizileme yaklaşımı test edilmiştir. Çalışma sonucunda, eRNA'nın canlı organizmaları tespitinde eDNA'ya göre daha başarılı bulunduğu belirtilmiştir.

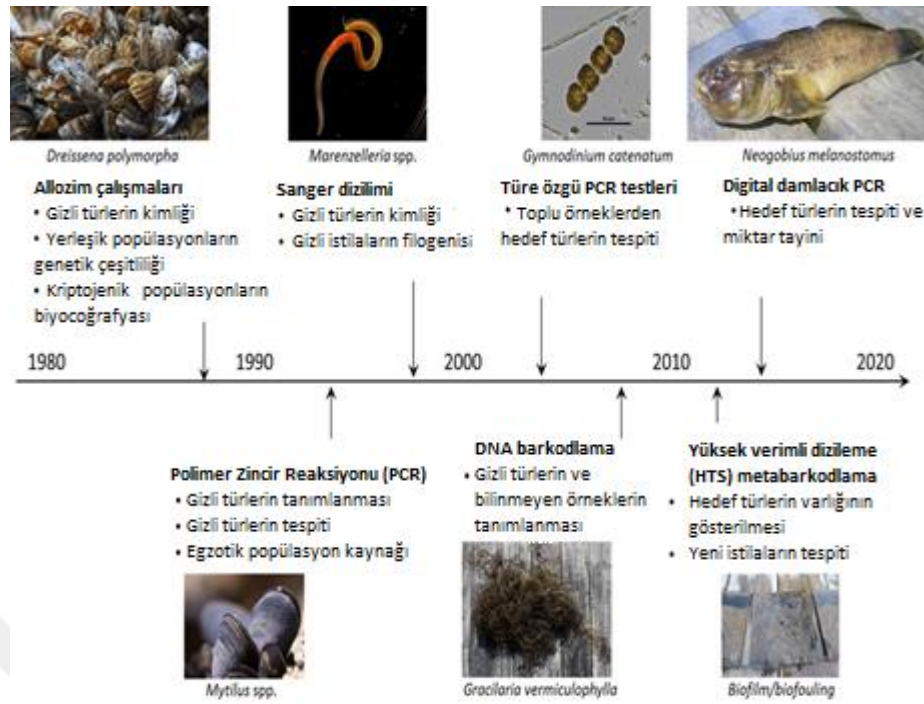
Li vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise farklı bakteri kombinasyonları ile deneysel olarak eklenmiş su numunelerinde canlı bakteri tespiti için DNA ve RNA bazlı 16S rRNA Illumina dizileme metodolojilerinin etkinliği ve hassasiyeti ölçülmeye çalışılmış, sonuçlar RNA tabanlı dizilemenin, sudaki canlı bakteri hücrelerini tespit etmede DNA tabanlı yöntemlerden daha üstün olduğunu göstermiştir. Güney Çin Denizi'nde yürütülen bir başka araştırmada, su sütunundaki mikrobiyal ökaryotların çeşitliliğini ve metabolik aktivitesini incelemek için, iki farklı bölgeden toplanan örneklerden DNA ve RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda DNA ve RNA veri setlerinin, mikrobiyal ökaryot topluluk bileşiminde önemli farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur (Xu vd. 2017).

Alternatif olarak, hedef organizmanın/organizmaların yaşayabilirliğini anlamak için eRNA örneklerine PCR araçları uygulanabilmektedir. Ribonükleik asit, protein sentezi

için çok önemli bir bileşen olup genellikle bir hücrede tek sarmallıdır ve enzimler tarafından DNA'dan kopyalanabilmektedir. Dolayısıyla, biyolojik olarak aktif (canlı) organizmalarda üretilir. eDNA ile karşılaştırıldığında, eRNA deniz ortamında daha hızlı bozunur ve bu nedenle canlı biyotayı tespit etmek için daha güvenilir bir araç olarak kabul edilmektedir. Ancak, RNA'nın hassas bir yapıda olması yani hızlı bozulabilmesinden dolayı çalışmaları zorlaştırmaktadır. RNA örneklerinin toplanması, özel örnekleme protokolleri, daha dikkatli koruma ve depolama gerektirmekte, RNA'nın izolasyonu ile ilişkili ek işlem süresi ve maliyetleri de göz önünde bulundurulduğunda (Laroche vd. 2016), RNA çalışma potansiyeli nispeten daha az kullanılan bir yöntem haline gelmektedir (Zaiko vd. 2018).

eDNA metabarkodlama yöntemi, geleneksel örnekleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında, eDNA'nın hedef gruplar için metazoan çeşitliliğinin yalnızca bir alt kümesini tespit edebildiğini göstermektedir. Bu, balast suyu izlemeye, makro organizmaların tespiti için eDNA'nın takson tespiti için geleneksel örneklemeyle kıyasla ek faydalar sağlamadığını ortaya koymaktadır. Yine de, hedef gruba özgü primerler (ör. kordalılar için 12S rRNA) kullanan ek testler, eDNA'yı çalışmalara dahil etmenin faydaları hakkında daha fazla bilgi sağlayabilir. Daha da önemlisi, fitoplankton çeşitliliğini değerlendirmek için filtrelenmiş su örneklerinin hala toplanması gerektiğinden, bu testler çok az ek çaba ile mümkün olabilmektedir (Djurhuus vd. 2018 ve Macher vd. 2018).

Moleküler tekniklerin biyolojik istilaya yönelik ilk uygulamaları *Dreissena spp.*'nin genetik çeşitliliği ve tanımlanması için kullanılan allozim çalışmalarının (elektrik yükündeki benzerlikleri ve farklılıkları karşılaştırarak protein polimorfizmlerini tanımlamayı içerir) başlangıcı olan 1980'lere dayanmaktadır (Şekil 2.1). Biyolojik araştırmalarda türe özgü DNA barkodlarının dizilenmesini içeren taksonomik tanıya moleküler bir yaklaşımın getirilmesi ise 2000'li yılların başında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, DNA barkodlaması, eDNA örnekleri içerisinde tüm biyotik topluluklar boyunca örneklerin taksonomik olarak atanmasına izin vererek metabarkodlamaya dönüşmüştür (Ojaveer vd. 2018).



Şekil 2.1 Denizlerde biyolojik istilanın araştırma ve gözetimine yönelik moleküler yöntem uygulamalarının zaman çizelgesi (Ojaveer vd. 2018)

2.2 Çevresel DNA (e-DNA) ve Konuya İlişkin Bildiriler

Son yıllarda sucul habitatdaki tür değişimlerinin incelenmesi açısından geleneksel yöntemlerin kullanımı yerine eDNA yöntemi tercih edilmeye başlanmıştır. eDNA; hücre, dışkı, mukus, kan vb. şeklinde ortama salınan bir çeşit DNA izi olarak tanımlanır. Bu yöntemde, örnekleme için az miktarda su veya sedimente ihtiyaç duyulmasının, örneklemeyle ilişkin maliyeti ve süreyi azaltmasının yanında geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında istilacı ve nesli tükenmekte olan türlerin tespitinde çok daha etkili olması eDNA yöntemini araştırma sahasında ön sıraya taşımıştır (Shaw vd. 2017, Borrell vd. 2017).

Keskin ve Atar (2013) tarafından yapılan çalışmada, DNA barkodlama yöntemi ile geleneksel yöntemlerin kıyaslaması yapılmış ve sitokrom oksidaz c alt ünite I (COI) geninin hedef gen olarak seçiminin nedenleri tartışılmıştır. Çalışmada COI geninin

standart barkod geni olarak seçilme nedeni, tür içi ve türler arası çakışma oranının çok düşük olduğu ve birçok tür içinde sergilemiş olduğu belirgin tür ayırım potansiyeli olarak ifade edilmiştir. COI geninin kullanışlı olma nedenleri arasında; tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması, geniş bir taksonomik ölçekten canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması ve DNA izolasyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğu içermesi şeklinde sıralanmaktadır. DNA barcodlama yönteminin avantajları arasında tüm canlı türlerine yönelik evrensel bir tanımlamayı tek bir gen bölgesi kullanarak yapabilmesidir. Ayrıca, Türkiye’de bulunan türlere yönelik ulusal DNA barkod veri tabanının oluşturulması gerektiği ve bu durumun morfolojik tanımlamada yaşanan zorlukların önüne geçebileceği vurgulanmıştır.

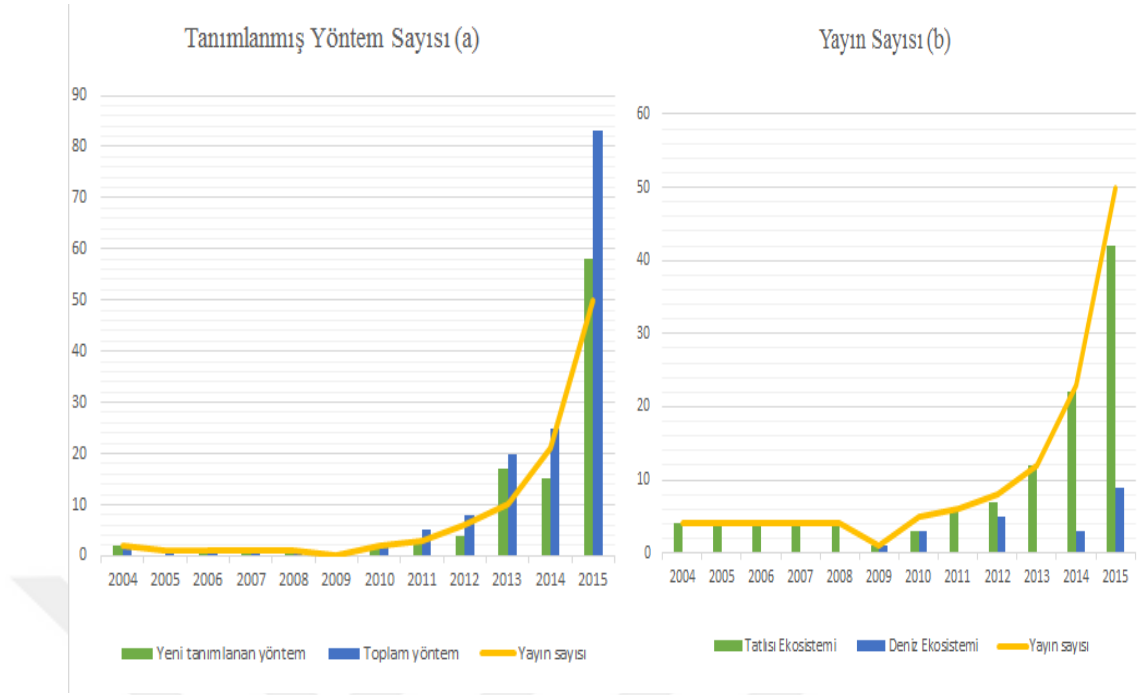
eDNA metabarkodlama yönteminin doğru sonuçlar verebilmesi ve etkin çalışması, büyük oranda PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin seçimi ile doğru orantılıdır. Balıklar için çok çeşitli metabarkod primerleri geliştirilmesine rağmen, zengin çeşitlilikteki balık türlerinin amplifikasyonlarının veya taksonomik sınıflandırmalarının kapsamlı ve karşılaştırmalı bir değerlendirmesi bulunmamaktadır. Zhang vd. (2020) tarafından yapılan çalışma ile PCR kullanılarak balıkların eDNA tabanlı metabarkodlama analizi için 22 primer setinin bir listesi derlenmiştir. Primerlerin; balıkların taksonomik zenginliği, türler içinde ayırım gücü üzerine önemli farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur. Primer setleri incelendiğinde, 12S rRNA genini hedefleyen primerler genellikle 16S rRNA veya COI genlerini hedefleyenlerden daha fazla balık çeşitliliği tespit ederken, sitokrom b genini hedefleyen primerler en az balık sayısını tespit etmiştir. Hedef genlerle ilgili olarak, 12S primerlerinin, balık çeşitliliği açısından genellikle diğer primerlerden daha iyi performans gösterdiği vurgulanmıştır. Farklı primerlerin kullanılmasının, tespit edilen biyoçeşitliliği nitel ve nicel olarak etkileyebileceği, bu etkilerin yapılacak çalışmalarda dikkate alınması gerektiği ve sonuçların eDNA tabanlı balık araştırmaları için primer seçimine ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yardımcı olacağı ortaya konulmuştur.

Forster vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, denizlerdeki protist çeşitliliği envanterleri büyük ölçüde planktonik ortamlara odaklanırken, bentik protistlerin nispeten

daha az incelendiği ileri sürülmüş ve bu nedenle, protistlerin tespiti için kullanılan 18S rRNA dizilerinin kullanımı ile Avrupa kıyı bölgelerinde örneklenen bentik ve planktonik protist topluluklar analiz edilmiştir. Her iki alemde de benzer sayıda operasyonel taksonomi birimi (OTU)'ne rağmen, planktonik protist topluluklardaki çeşitliliğin en az %70'ini, ancak bentik topluluklarda ise yalnızca %33'ünü eşleştirebildiği gözlemlenmiştir.

Makro organizmalara odaklanarak ökaryot taksonlarını hedef alan çalışmalarda eDNA yönteminin kullanımı, son yıllardaki literatürde katlanarak bir artışa sebep olmaktadır. eDNA ile ilgili araştırmalarda, eDNA'nın izolasyonu için eDNA iş akışının devam eden optimizasyonu için kullanılan metabarkodlama bir öncelik olmaya devam etmektedir (Şekil 2.2a). Son zamanlarda, sucül eDNA izleme için açık selüloz nitrat filtreleri veya Sterivex™ filtrasyon sistemi filtreleri gibi kapalı filtrelerin Qiagen'in DNeasy Blood ve Tissue ekstraksiyon Kiti ile kombinasyonu önerilmektedir. Ayrıca kapalı filtre kullanımı kontaminasyon riskinin azaltmasını sağlamaktadır (Jeunen vd. 2019; Spens vd. 2017; Rey 2019). Kontaminasyon riski, eDNA çalışmalarında yaygın bir sorun olan yanlış pozitif sonuç tespit etme durumuna da yol açabilmektedir (Deiner vd. 2017).

Hem DNA barkodlama hem de metabarkodlama yöntemi, DNA dizilerini tür adlarıyla eşleştiren zengin ve seçilmiş bir referans veritabanının mevcudiyetine dayanmaktadır. Belirli organizma grupları için zayıf veritabanına sahip yöntem, son zamanlarda canlı dizilerinin sayısını artırma yönünde özellikle ökaryotlar için yapılan çalışmalarla önemli derecede yol katetmiştir (Briski vd. 2016, Comtet vd. 2015).



Şekil 2.2 Mevcut sucul eDNA literatürü. (a) açıklanan yöntemlerin toplam sayısı ve (b) tatlı su ve deniz ekosistemlerinde gerçekleştirilen sucul eDNA araştırmalarının oranı (Jeunen vd. 2019)

eDNA odaklı yürütülen çalışmalar kapsamında; Şekil 2.2.b'den de anlaşılacağı üzere, eDNA metodolojisi deniz ekosisteminden ziyade tatlısu ekosistemlerinde daha fazla uygulanmaktayken, son zamanlarda deniz ekosistemini hedefleyen çalışmalar hız kazanmaya başlamıştır. Örneklem aşamasında denizel ortamın fiziksel şartları gereği (akıntı vb.) karşılaşılan zorluklardan ötürü, eDNA yöntemi ile tür tespiti yapmak için gerekli olan DNA çalışmalarının daha çok tatlısu üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur (Jeunen vd. 2019).

Tatlı su ve okyanuslarda küresel biyolojik çeşitlilik yüksek oranda azalmaktadır. DNA dizilimindeki son gelişmeler, çevrede bulunan DNA'dan türlerin tespiti için yeni bir yöntem sağlamıştır (Valentini vd. 2016).

eDNA toprak, sediment, su, kar gibi çevresel bir örnekten çıkarılabilen DNA'yı tanımlar. eDNA, sucul ve yarı sucul popülasyonların su kütlesindeki DNA moleküllerinin analiz edilerek izlenmesi bağlamında kullanılır. Mevcut toplam eDNA, su kütlelerini kullanan

canlıların ve su içmek için su kütleline uğrayan kuşlar ve memeliler gibi canlıların su kütlelerinde bıraktıkları ağız içi salgısı, idrar ve deri hücrelerine ait DNA'larını içermektedir. Suyun analizi, sucul organizma tür tespiti ve hassas türleri koruma projeleri için yürütülen çalışmalarda; türe özgü eDNA izolasyon yöntemi, yeni ortaya çıkan bir tekniktir. DNA'nın kaynağından hızlı bir şekilde yayılması, teoride belirli bir canlının varlığının sadece başlangıç noktasında değil, su sistemi içinde herhangi bir yerde tespit edilebildiği anlamına gelmektedir (Rees vd. 2014).

Deoksiribonükleik asitin kısaltılmışı olan DNA, organizmaları inşa etmek ve korumak için biyolojik talimatlar içeren kalıtsal bir materyaldir. DNA'nın kimyasal yapısı tüm organizmalar için aynıdır, ancak baz çiftleri olarak bilinen DNA yapı taşları sırasına göre farklılıklar göstermektedir. Baz çiftlerinin benzersiz dizileri, özellikle yinelenen desenler, türleri, popülasyonları ve hatta bireyleri tanımlamak için bir yöntem oluşturmaktadır. eDNA, bir organizmadan çevreye salınan nükleer veya mitokondriyal DNA'dır. eDNA hücresel veya hücre dışı (çözülmüş DNA) formunda saptanabilir. Sucul ortamlarında eDNA, akıntılar ve diğer hidrolojik süreçler ile seyreltilir ve dağıtılır. eDNA'nın UV radyasyonuna, asidik ortama ve ısıya maruz kalması eDNA'nın yapısını bozabilir. eDNA, sucul istilacı türlerin erken tespiti için etkili bir araç olma yolunda ilerlemektedir. İstilacı türlerin izlenmesi için eDNA yöntemlerinin uygulanması, periyodik olarak su numunelerinin toplanması ve aynı anda birden fazla istilacı tür için taranmasını içerebilir. Yumuşakçalar da dahil olmak üzere birçok istilacı tür için bir giriş kaynağı olan gemi balast suyu da örneklenir. İstilacı türler için bazı yoğun eradikasyon programları, hayatta kalan birkaç bireyin ekosistemi yeniden kolonize etmesi durumunda başarısız olma ihtimali yüksektir. eDNA yöntemleri istilacı türleri yok edebilme açısından kullanışlı bir araç niteliğindedir (Jones 2013).

Çevreye salınan DNA'nın UV ışığı ve mikrobiyal aktivitenin etkisiyle parçalanması ve sonunda kaybolması beklenen bir durumdur. Bu nedenle, bir hedef türden elde edilecek eDNA varlığı, doğrudan gözlem veya yakalamaya gerek kalmadan varlığını tespit etmemizi sağlar. Ayrıca, eDNA analizi özellikle yakalanması gereken veya bazı tehlike altındaki veya tehdit altındaki türler için yakalama için lisansların gerekli olması gibi geleneksel yöntemler kullanılarak tespit edilmesi zor olan türler için faydalı bir

yöntemdir. Sucul popülasyonların eDNA analizi kullanılarak izlenmesi ve korunması, antik sedimentlerde makro-organizmaların enderite değerlendirmelerinde kullanılan yöntemlerden ortaya çıkmıştır (Willerslevet vd. 2003).

Farklı antik ve modern ortamlar için de e DNA ekstraksiyonu ile tür tanımlamasına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır. eDNA'nın analizi, bir su örneğinin toplanmasını, eDNA'nın ekstraksiyonunu ve hedef türlerin DNA'sını amplifiye etmek için bir PCR aşamasını içermektedir. DNA ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı PCR birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir, bu da bu tekniği hedef türlerin tespiti için hızlı bir yöntem haline getirmektedir (Rees vd. 2014).

DNA barkodlama yöntemi biyolojik istilaların incelenmesinde ve yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır. Evrenselliği ve standart prosedürleri onu biyolojik girişlerin önlenmesi ve erken teşhisi için operasyonel stratejilerde uygulanacak çok güçlü bir araç haline getirmektedir. Barkodlama yöntemi bazı hedef istilacı türleri izlemek için bazı biyogüvenlik kurumları tarafından rutin olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde, DNA metabarkodlamasının özellikle erken uyarı sistemlerinde ve istilacı türlerin ortama girdiği veya ele geçirdiği ortamı incelemek için giderek daha fazla kullanılacağı kesindir. Hem yerli hem de yerli olmayan biyolojik çeşitliliği eş zamanlı olarak değerlendirerek, özellikle yerel çeşitliliğin iyi bilindiği ve düzenli araştırmaların yapıldığı bölgelerde yeni türlerin tespitinde çok etkili olması beklenmektedir. Ancak bu yöntem, bilim adamları ve çevre ajansları tarafından rutin olarak kullanılmadan önce hem teknik (niceleme), hem analitik (biyoinformatik araçlar) hem de koordinasyon (veritabanları) iyileştirmeleri gerektirmektedir. DNA barkodlama ve metabarkodlama rakip yaklaşımlar olarak değil, farklı aşamalarda istilacı ve yerel türlerin tespit ve yönetimine yardımcı olmak için birbirlerinin tamamlayıcısı olarak kabul edilmelidir. DNA metabarkodlama yöntemi, henüz görülmemiş yabancı türlerin erken teşhisinde önemli bir rol oynarken, DNA barkodlama yöntemi ise geleneksel yöntemlerin tür teşhis doğruluğu açısından problem oluşturduğu aşamada, türlerin teşhisi için hala değerli bir argümandır (Comtet vd. 2015).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, eDNA'nın tamamlayıcı bir yöntem olarak uygulanabileceği, yüksek bir takson tespit edebilme potansiyeline sahip olduğu ortaya

çıkmaktadır (Deiner vd. 2017). Özellikle gemi kaynaklı istilacı tür uygulamalarında filtrelenmiş su bazlı eDNA metabarkod uygulamalarına fazla sayıda rastlanılmamakta olup balast sularındaki istilacı tür tespiti için geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması ise oldukça düşük seviyede tespit edilmiştir.

e-DNA metabarkodlama çalışmalarında genetik araçların kullanılması, morfolojik yöntemlerde karşılaşılan sınırlamaların önüne geçerek, tür tespitinde ve buna dayalı biyolojik çeşitliliğin korunmasında büyük yenilikler ve avantajlar sağlamaktadır. eDNA metabarkodlama yöntemi, biyolojik çeşitliliğin izlenmesinde ve istilacı türlerin erken tespitinde hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem olarak kabul görmekle beraber bu yöntemin düzenli izleme programlarına nasıl entegre edilebileceği çalışılması gereken bir husustur (Comtet vd. 2015, Xiong vd. 2016).

Blackman vd. (2017) yaptıkları çalışmada, Birleşik Krallıkta yeni karşılaşılan ve tatlısu Amfipotu olan *Gammarus fossarum*un tanımlamasını eDNA metabarkodlama ve makro-omurgasızlar komünitesini kullanarak tespit etmişlerdir. Birleşik Krallığın birçok nehrinde bulunan türlerle birlikte, metabarkodlama yöntemine dayanan, makro-omurgasızlar komünitesini için öncül hedef dışı örnekleme programı uygulanmış, akabinde morfolojik analizler ve standart tam uzunlukta COI DNA barkodlama kombinasyonu ile teyit edilmiştir. Bu çalışma, doğal habitatlarda bulunan istilacı türlerin tespitinde eDNA metabarkodlama yönteminin önemli bir araç olduğunu göstermiştir.

İstilacı türleri hızlıca kontrol altına almakta, istilacı türlerin yayılım metodlarını anlayabilmek ve geniş oranda tespitinde etkili olabilmek kritik rol oynamaktadır. İstilacı türleri yok etmek oldukça zorlu ve pahalı bir süreçtir. Bazı durumlarda eDNA yöntemiyle tespit diğer yöntemlerle kıyaslandığında az maliyetli ve daha etkili yeni bir yaklaşım sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, su kütlesinde yaşayan omurgalıların eDNA yöntemi ile tespitinin mümkün olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmada ise, Florida'da yaşayan, istilacı bir tür olan ve ulaşmanın güç olduğu bölgelerde yaşaması sebebiyle tespiti zor yarı sucul Burma pitonu (*Python bivittatus*) tespitine çalışılmıştır. Çalışmanın ana hedefi ise su yolu ile taşınan eDNA'dan *P. bivittatus*'un teşhisi için tanısal PCR geliştirmektir ki böylece istilacı türlerin izlenmesine yardımcı olacaktır.

Öncelikle, su numunesinde sürünge DNA'sının izole halde kalıp kalamadığının tespiti için yakalanmış bir *P. bivittatus* kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada, eDNA hazırlanmasında sıklıkla kullanılan iki DNA izolasyon metodu ve iki DNA çıkartım kiti kullanımı değerlendirilmiştir (Darling ve Mahon 2011).

Zaiko vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, iki farklı platformda (Ion Torrent ve 454), balast suyundan elde edilen DNA örneklerine yeni nesil dizileme uygulanmış ve işlevsel taksonomi birimleri (OTU) sonuçları ile oluşturulan tür kataloğu ile karşılaştırılmıştır. Balast suyu numuneleri, RV Polastern gemisinin seyirde olduğu ikinci ve yirminci günleri arasında beş farklı günde balast tanklarından alınmıştır. Bu süre zarfında balast suyunda oksijen konsantrasyonunun belirgin olarak azalması ve sıcaklık artışı meydana gelmiş ve DNA bozulmasını gösteren kısa okumalara rastlanmıştır. Örnek alımıyla beraber balast suyunun mevcut çevresel kondisyonu da kayıt altına alınmıştır. Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin (NGST) ortaya çıkışı ve DNA'yı doğrudan su ve sediment örneklerinden (eDNA) analiz etme olasılığı, uzun süre fark edilmeden devam eden istilaların olabileceği deniz ekosistemlerinde istilacı türlerin erken teşhisi için yeni bakış açıları oluşturmuştur. Yapılan çalışmada bulunan sonuçlar, NGST balast suyundan istilacı türlerin tespiti için bir değere sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak mevcut gelişim aşamasında, Balast Suyu Yönetmeliği'ne uygunluğunun doğrulanması için metabarkodlama yöntemini kullanmanın erken olduğu vurgulanmıştır (King ve Tamburri 2010). Bunun yerine taksonomik doğrulama için bireysel barkodlama ile birleştiğinde çok daha gelişmiş olabilecek görsel taksonomik tanımlama yöntemlerinin bir tamamlayıcısı olarak kabul edilebilir (Zaiko vd. 2015).

Son zamanlarda, zaman alan ve masraflı olan geleneksel araştırma yöntemlerine göre duyarlılık potansiyeli daha yüksek olan ve bu nedenle farklı ortamlardaki sucul türlerin izlenmesine olanak sağlamak için çevresel DNA (eDNA) parçalarının tespitine büyük ilgi gösterilmiştir. Çevresel DNA analizi nesli tükenmekte olan veya istilacı türlerin tespitinde giderek daha fazla kullanılmakta aynı zamanda eDNA çalışmaları ile türlerin biyokütle ve dağılım tahminleri için uygulanmaktadır. Yeni nesil dizileme yöntemleri ile birleştirildiğinde, tüm faunaların tespit edilebildiği ortaya konmuştur.

Rees vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada sucul türlerin eDNA metodolojisiyle tespiti ve bu yöntemin ekolojideki yeri gözden geçirilmiştir. eDNA analizi, su numunesinin toplanması, eDNA'nın ekstraksiyonu ve hedef organizma için PCR adımının kuvvetlendirilmesini içerir. DNA ekstraksiyonu ve gerçek zamanlı PCR birkaç saat içinde yapılabilir, dolayısıyla bu teknik bir hedef türün varlığını tespit etmek için hızlı bir yöntemdir. Yeni nesil dizileme yönteminin kullanımı, su numunelerinde tüm faunaların tespit edilebileceğini göstermiştir. Farklı ortamlar için farklı örnekleme metodolojilerine sahip olmak önemli olsa da, verilerin daha iyi karşılanabilmesi için laboratuvar prosedürlerinin standartlaştırılabilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan su numuneleri laboratuvar tankları da dahil olmak üzere deneysel, yapay ve doğal göletler ve göller; lagünler, akarsular, nehirler ve deniz suyundan alınmıştır. Numune miktarları 15 mL (laboratuvar tanklarında, doğal göletlerden veya göllerden, akarsulardan ve deniz suyundan) ile 10 L (nehirden) arasında değişmektedir. Akarsulardan, nehirlerden, lagünlerden ve deniz suyundan alınan standart numune miktarı normalde 1-2 L'dir. Dört farklı DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak su numunelerinden eDNA ekstraksiyonu için birçok yöntem tanımlanmıştır. Ekstrasyon adımıdan önce su numunelerinin işlenmesinde önemli farklılıklar vardır. Numune koruma, filtrasyon ve DNA izole etme yöntemleri numune tipine göre değişiklik göstermekte olup farklı işleme yöntemlerinin eDNA üzerindeki etkilerini izlemek için bu yöntemlerin doğrudan karşılaştırılması yararlı olacaktır (Rees vd. 2014).

Geleneksel araştırma yöntemleri ile çevresel DNA kıyaslandığında eDNA yönteminin dikkate değer avantajları vardır. eDNA analizinin güvenilir bir teşhis yöntemi olduğu ve geleneksel yöntemlerle ilişkilendirilebildiği söylenebilir.

Dejean vd (2012) ve Takahara vd. (2013) yaptıkları çalışmada bir gölette geleneksel yöntemlerle önceden teşhis edilmiş hedef türlerin eDNA yöntemiyle de teşhis edildiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca önceden tespit edilememiş hedef türlerin eDNA yöntemiyle tespit edilebilmiş olması bu yöntemin çok daha hassas bir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak, bazı durumlarda eDNA analizi başarı oranı her zaman %100 oranında değildir (Thomsen vd. 2012). Yapılan çalışmaların ilerlemesi ile eDNA tabanlı tanımlama yönteminde başarı oranının artması beklenmektedir (Rees vd. 2014).

Valentini vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, ekoloji ve koruma alanlarında çevresel DNA metabarkodlama yöntemi yaklaşımının kullanımının uygunluğu test edilmiştir. Çalışmada sucul amfibiler ve kemikli balıklar üzerine odaklanılmış ve yöntemin güvenilirliği siliko, vitro ve yerinde doğrulanmıştır. Geleneksel yöntemler ve tarihsel veriler ile karşılaştırıldığında, eDNA metabarkodlama yöntemi genel olarak çok daha iyi bir tanımlama olasılığı göstermiştir. Amfibiler için eDNA metabarkodlama ile tanımlama olasılığı 0.97 (CI = 0.90-0.99) iken geleneksel yöntemler için 0.58 (CI = 0.50-0.63) olarak sonuçlanmıştır. eDNA metabarkodlama yaklaşımı kullanılarak tespit edilen takson sayısı geleneksel yöntemler kullanılarak tanımlanan sayıdan daha yüksek seviyelerde saptanmıştır. Önerilen DNA tabanlı yaklaşımın, ekolojik çalışmalar ve çok çeşitli sucul ekosistemlerdeki biyolojik çeşitlilik izlemelerinde yeni nesil bir yöntem olma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

2.3 Balast Suları ve Yabancı Tür Taşınım Metodları

Uluslararası taşımacılığın %90 oranında gerçekleştirildiği gemicilik sektörü, dünya ticaretinde önemli bir yere sahiptir. Taşımacılıkta yoğun bir şekilde kullanılan gemiler, çevresel açıdan bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Seyir esnasında yüksüz geminin dengede durmasını sağlayan balast suları, yaklaşık 100 yıl öncesine dayanan çelik gemi yapımından beri önemli bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Taşımacılık yapan gemilerde, boş kargo alanı olması durumunda, seyire çıkacak geminin yapısal bütünlüğünü ve geminin dengesini korumak amacıyla gemi balast tanklarına deniz suyu alınır (TUDAV, 2018).

Uzak bölgelerdeki yerli olmayan türlerin biyolojik olarak ortama girmesi, dünyanın biyolojik çeşitliliği hakkındaki algıyı tamamen değiştirmiştir (Chapin ve ark. 2000; Sakai vd. 2001). Denizel ortama giren türler çoğaldığında baskın hale gelip gerek çevresel gerekse ekonomik problemlere yol açabilmektedir. Bu nedenle biyolojik istilalar, son yıllarda başa çıkılması en zor durumlardan biridir. Bu büyük sorunla başa çıkmak için, girişlerin önlenmesi, tanıtılan türlerin erken tespiti, düşük nüfus yoğunluğunda eradikasyon veya bakım gibi yönetim önlemleri uygulanmalıdır (Simberloff vd. 2005, 2014). Birçok ülkede bu tür önemli sorunlarla yüzleşmek için bazı düzenlemeler

yapılmıştır. Örneğin Avrupa'da, su ürünleri yetiştiriciliğinde yerli olmayan türlerin kullanılmasına ilişkin çevresel riskleri sınırlandırmak amacıyla 11 Haziran 2007 tarih ve 708/2007 sayılı Konsey Tüzüğü oluşturulmuştur. Avrupa Birliği istilacı yabancı türlerin hem kasıtlı hem de kasıtsız olarak ortama giriş ve yayılımını, biyolojik çeşitliliği üzerindeki olumsuz etkisini önlemek ve en aza indirmek için yeni bir düzenleme (22 Ekim 2014 tarihli CR No 1143/2014) yapmıştır (Anonymous 2012). Bu düzenlemelerin tümü, yerli olmayan türlerin hızlı bir şekilde tanımlanması ve tespit edilmesinin önceliğini içermektedir. Bu düzenlemelerin ve diğer yasal çerçevelerin daha spesifik olarak etkili olabilmesi için türlerin tanımlanması ve gelişim aşamaları, ortama giren organizmanın düşük konsantrasyonunda bile biyolojik girişlerin saptanması, erken uyarı için verimli ve uygun maliyetli sistemler geliştirilmesi gerekmektedir (Comtet vd. 2015).

2.3.1 İstilacı tür taşınımında gemi kaynaklı vektörler

Gemiler, istilacı türlerin dağılımını iki ana vektör halinde olumsuz yönde etkilemektedir. Birincisi, geminin sürekli deniz suyuna maruz kalan tank, valf, pervane gibi alanları organizmaların tutunmasına ve biofouling oluşumuna, (Şekil 2.3) yani alg ve kaya midyeleri gibi sapsız organizmaların gelişimine yol açmaktadır (Hewitt vd. 2009). Diğeri ise seyir esnasında geminin dengesini ve trimini ayarlamak için ihtiyacı olduğu ve tanklarına aldığı balast sularıdır. Balast suyu gemi yüklü değilken stabiliteyi arttırmak ve yükleme boşaltma esnasında yakıt tüketimininde neden olduğu değişen ağırlığı dengelemek için kullanılmaktadır (Şekil 2.4). Ondokuzuncu yüzyılın başlarında balast suları yerine dengeyi sağlamak için kaya, kum gibi katı materyaller kullanılırken, 20. yüzyılla birlikte kolay temini, ucuz olması ve zamandan tasarruf edilmesi sebebiyle balast operasyonları için su kullanımına geçilmiştir.

Limanda yüklerin tahliyesi esnasında alınan balast suları, yüklerin gemiye yüklenmesi esnasında da boşaltılmaktadır. Pompalar vasıtasıyla denizden alınan balast suları, balıklar gibi büyük organizmaların geçişini engelleyecek 0,22 mikron filtreden geçirilerek

tanklara aktarılmaktadır. Ancak, mevcut filtreler erken yaşam evresinde olan balık larvaları ile fitoplankton ve copepod gibi küçük organizmaların tanklara geçişini engelleyememektedir. Balast tankları içinde organizmaların hayatta kalmasına yardımcı olacak tank dibinde biriken sediment, tank yüzeyinde oluşan biofouling ve su kütlesinin kendisi alt vektörler olarak tanımlanabilmektedir (Minchin vd. 2009, Rey 2019). Gemideki kargolar, bir çeşit vektör olarak kabul edilse de, sebep oldukları sıklıkla kara kökenli böcek türlerinden oluşmaktadır (Rassati vd. 2015).



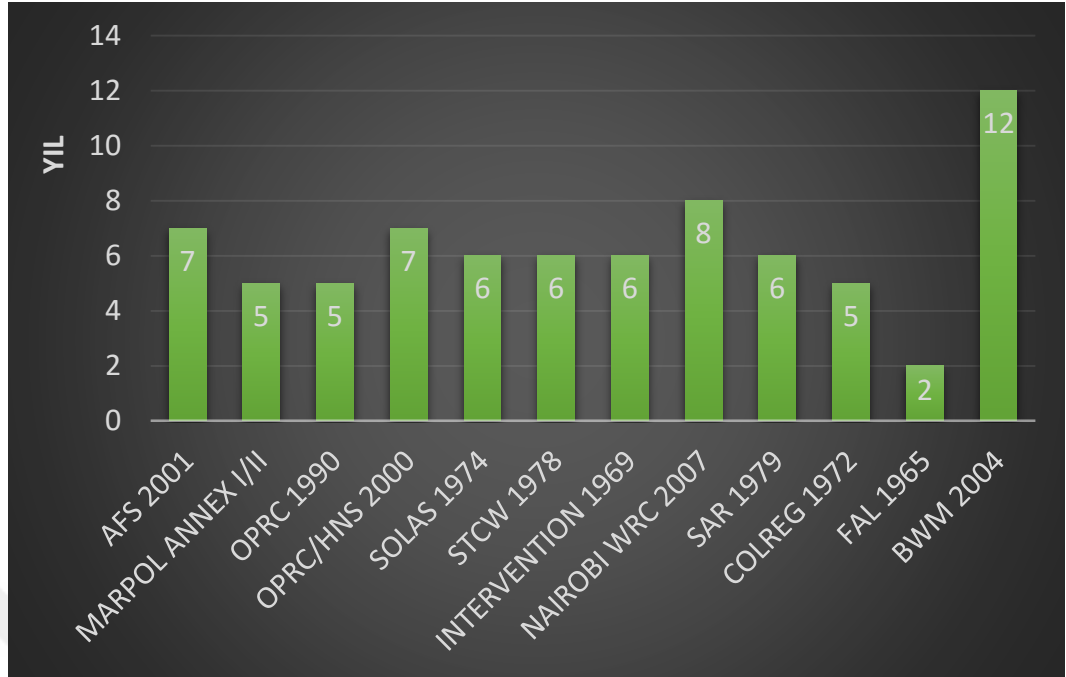
Şekil 2.3 Gemi karina ve pervanesinde oluşan biofouling



Şekil 2.4 Balast operasyonu

2.4 IMO Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi

İstilacı türler, yeryüzünde biyolojik çeşitliliği küresel olarak tehdit eden iklim değişikliği, kara kökenli kirleticiler, aşırı avlanma ve kıyı alanları tahribatıyla birlikte en büyük beş tehlikeden biridir (Gibb vd. 2013). Gemilerle taşınan balast sularının istilacı tür taşınımında en önemli vektörlerden biri olduğu dikkate alınarak, bu taşınımın sebep olduğu çevre, insan sağlığı ve sosyoekonomik etkilerini önlemek için, Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO) tarafından Şubat 2004'te Gemilerin Balast Suyu ve Sedimanlarının Kontrolü ve Yönetimine İlişkin Uluslararası Sözleşme ("BWM Sözleşmesi" olarak anılacaktır) kabul edilmiştir. BWM Sözleşmesi, yürürlüğe girme şartı olan dünya ticari gemi tonajının %35'ini temsili ve en az 30 devletin gerekli onayına ulaştığı tarihte (Eylül 2017) yürürlüğe girmiştir. BWM Sözleşmesinin, imzacı devletleri zorlayan ve bu sebeple 12 yıl imzada kalmasının (Şekil 2.5) etkeni arasında gösterilebilecek durumlar, ticari limanlarda balast suyunun izlenmesi ve bu limanlarda istilacı türleri içeren Zararlı Sucul Organizmalar ve Patojenlerin (HAOP) önlenmesini ve kontrolünü garanti altına almak için balast suyunun analizle kontrolüdür.



Şekil 2.5 IMO Sözleşmelerinin imzalandıktan sonra yürürlüğe giriş süreleri

2.4.1 Uluslararası Denizcilik Örgütü ve çalışmaları

Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO), Birleşmiş Milletler'e adanmış bir kuruluş olarak uluslararası taşımacılığın güvenliği ve çevresel performansı için küresel standart belirleyen otorite olmasının yanı sıra, deniz ticareti için tarafsız, çevreye duyarlı ve adil bir yol haritası ortaya koymak IMO'nun ana prensibini oluşturmaktadır (IMO, 2019a).

IMO, Birleşmiş Milletler örgütlerinden biri olarak 2030 Sürdürülebilir Kalkınma Gündemi ve ilgili Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri'ne (SDG) yönelik olarak yoğun bir şekilde çalışmaktadır (IMO, 2019a). Kuşkusuz, 2030 gündeminin esaslarının çoğunun, deniz taşımacılığının dünya ticaretinin yan kuruluşu olduğunu akılda tutarak küresel ekonomiyi kolaylaştıran sürdürülebilir bir taşımacılık sektörü ile gerçekleştirmesi beklenmektedir. IMO'nun Teknik İşbirliği Komitesi, Örgüt'ün teknik yardım çalışmaları ile SKH'ler arasındaki bağlantıları resmi olarak onaylamıştır. Okyanusların hedefi olan SDG 14, IMO'nun merkezinde yer alırken, Örgüt'ün çabalarının boyutları SDG'lerin tüm bireyleriyle ilişkilendirilebilir (IMO, 2019a).

Ayan ve Baykal (2010)'a göre, IMO'nun misyonları, uluslararası denizlerde seyir güvenliği açısından gerekli teknik önlemleri almak ve ilgili uluslararası normların düzenlenmesini teşvik etmek, deniz ticaretinin etkinliği ve gemiler tarafından denizlerin kirlenmesini önlemek ve ülkeler arasında iş birliğini sağlamak için en etkili kuralların benimsenmesini teşvik etmek olarak özetlenebilir.

Küreselleşmeyle beraber artan deniz ticareti kaynaklı balast sularının hızlı yer değişimiyle beraber istilacı türlerin dünya denizlerindeki biyolojik çeşitliliğe etkisi artmaya başlamıştır. Bu durumun deniz ticareti sebepli kısmının önüne geçilebilinmesi adına 2004 yılında IMO'nun hazırladığı Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi, üye ülkeler tarafından yüksek oranda kabul görmüştür. Bu sözleşme, zararlı istilacı türlerin küresel denizcilik endüstrisinden yayılmasını önlemeye yardımcı olan tek uluslararası araçtır. Birçok gemi sahibi ve filo yöneticisi, zararlı türlerin limandan limana bulaşmasını önlemek istemesine rağmen, bununla rekabet edemez. Bu durumun sebebi, balast suyunun kullanılmadığı durumda mürettebat ve geminin güvenliğinin tehlikeye girmesidir (WWF 2009).

Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi her ne kadar 2004 yılında ortaya çıksa da, balast suyunun getirdiği problemler üzerine IMO tarafından yapılan çalışmalar çok daha eskiye dayanmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda, IMO zararlı sucul organizmaların ve patojenlerinin yönetimi ve kontrolü için 90'lı yılların sonuna doğru bir takım rehberler yayımlamıştır.

13 Şubat 2004 tarihinde, Balast Suyu ve Gemi Sediment Kontrolü ve Yönetimi Uluslararası Sözleşmesi, çevreye, insan sağlığına, mallara ve kaynaklara, balast sularının ve çökeltilerin zararlı su organizmaları ve patojenlerin taşınarak kontrolsüz bir şekilde boşaltılmasını önlemek amacıyla imzaya açılmıştır. Sözleşme 8 Eylül 2017 tarihi itibarıyla yürürlüğe girmiş ve bu sözleşme ile balast suyu deşarj standartları uygulanmıştır.

Türkiye ile anlaşmaya taraf olan ülke sayısı ve dünya tonajı bakımından sırasıyla 86 ve %91,19'a ulaşmıştır (IMO, 2021a). Sözleşmenin yürürlüğe girmesiyle, gemi balast suyu

sorununu çözmek için kritik olduğu belirlenen deniz alanlarında bölgesel iş birliği kurulmuştur. Bu bağlamda, IMO Globalast Ortaklık Projesi kapsamında çeşitli eğitim kursları ve saha çalışmalarında Türkiye tarafından gerçekleştirilmiştir. Türkiye, projeyi Hırvatistan ile birlikte Akdeniz ülkeleri arasında kurulan Bölgesel Görev Gücü'nün lider ülkeleri olarak yönetmiştir. Projenin hedefleri arasında farkındalığın artırılması, risk değerlendirmesi, balast suyu yönetimi, sözleşmeye uyum sürecinde atılması gereken adımlar, finansal destek gibi konular yer almakta olup hedef kitle olarak ise gelişmekte olan ülkeler belirlenmiştir.

2.4.2 Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesinin oluşumu

Yıllar içinde, organizmaların balast suyu yoluyla yayılmasını en aza indirmek için dünya çapında çeşitli ulusal ve uluslararası düzenlemeler önerilmiş olup bunlar arasında en önemli ve dikkate değer iki girişim kuşkusuz Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO) ve Birleşik Devletler Sahil Güvenlik (USCG) tarafından başlatılanlardır.

IMO üye devletleri arasında 12 yıldır süren zorlu görüşmelerin sonunda, Gemilerin Balast Suları ve Sedimentlerin Kontrolü ve Yönetimi Uluslararası Sözleşmesi (Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi) 13 Şubat 2004 tarihinde IMO'da (Londra) düzenlenen diplomatik konferansta kabul edilmiştir. Sözleşmeye taraf olan devletlere sözleşme kapsamında yer alan ilkeler doğrultusunda bazı ek önlemler alma hakkı tanınmıştır (IMO, 2019). Sözleşme, geminin balast suyu ile sedimentin kontrolü/yönetimi için teknik kriterler ve gereklilikleri içeren 22 madde ve ekleri içermektedir (IMO, 2019).

2.4.3 Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesine genel bakış

Sözleşmenin organizmaların daha fazla yayılmasını önlemek için önerdiği ana yönetim eylemleri balast suyunu belirli şartlara uyan bölgelerde okyanus suyuyla değiştirmek ya da balast suyuyla taşınan organizmaları etkisiz hale getirmek veya öldürmek için balast suyunu arıtmaktır. Amerika Birleşik Devletleri, BWM Sözleşmesini imzalamamış, bunun yerine 1990'dan beri USCG ve ABD Çevre Koruma Ajansı ile balast suyu yönetimine

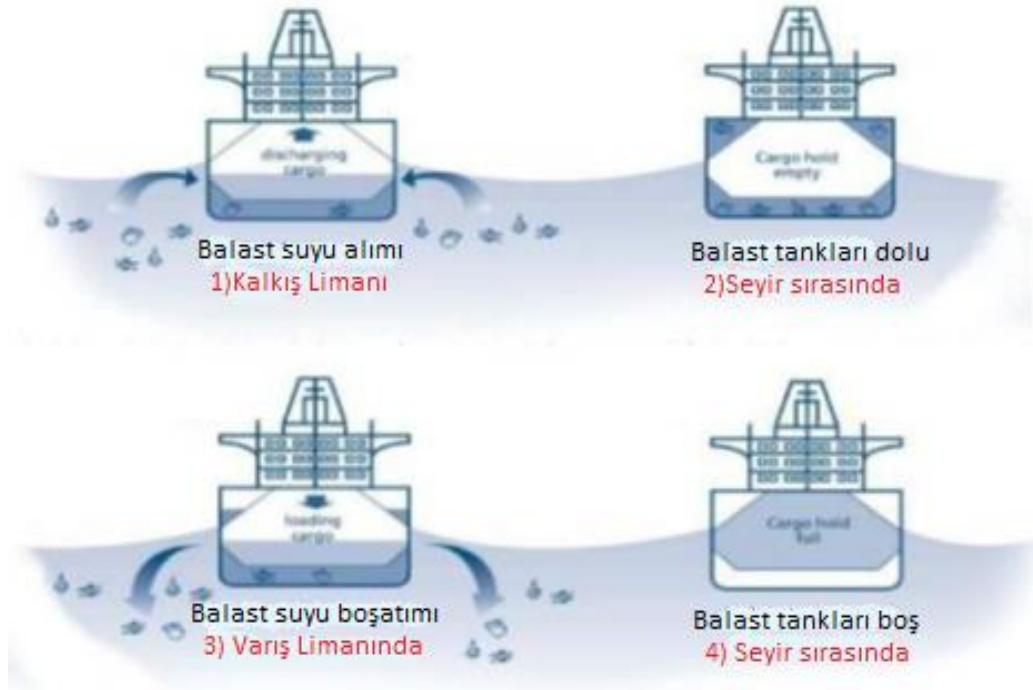
ilişkin ulusal düzenlemeler geliştirmiştir (Verna ve Harris, 2016). USCG, ABD Çevre Koruma Ajansı ve IMO, balast suyunun arıtılmasından sonra deşarj edilebilecek maksimum organizma sayısı ile ilgili aynı sayısal deşarj standartlarına sahiptir (Albert vd. 2013). Ancak IMO, "canlı" (üreyebilen) organizmaların sayısını sayarken, ABD düzenlemeleri ise "canlı" (hayatta kalabilmiş) organizmaların sayısını saymaktadır (Blatchley vd. 2018).

Uluslararası ticaret yapan gemiler, Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi şemsiyesi altında gemiye özgü balast suyu yönetim planı doğrultusunda balast suyu ve sedimentleri yönetmelidir. Sözleşmeye göre, tüm gemiler uluslararası balast suyu yönetim sertifikası ve balast suyu kayıt defteri taşımak zorundadır. Uluslararası ticaret yapan tüm gemiler, yabancı türlerin yeni bir ortama girişini önlemek için balast sularını iyileştirmekle yani D-1 (Balast suyu değişimi) ve D-2 (balast suyu arıtımı) standartlarını uygulamakla yükümlüdür (IMO, 2017).

Balast suyu iyileştirme yöntemleriyle eşleşen iki farklı standart bulunmaktadır. İlk olarak, D-1 standardı gemilerin kıyı sularından uzakta, açık denizlerde balast sularını değiştirmelerini gerektirir. Tercihen bu, karadan en az 200 deniz mili açıkta ve en az 200 deniz mili derinliğinde bir bölge olmalıdır. Bunu yaparken, daha az organizma hayatta kalacak ve bu nedenle gemiler balast suyunu boşaltırken zararlı olabilecek türlerin ortama giriş olasılıkları daha düşük olacaktır. İkinci olarak, D-2 standardı, insan sağlığına zararlı spesifik virüsler de dahil olmak üzere, ortama bırakılmasına izin verilen maksimum canlı organizma miktarını belirten performansla ilgilidir (IMO, 2017).

Hangi geminin, hangi standarta tabi olacağı konusunda IMO bir takvim hazırlamış olup standart seçiminde baz alınan iki husus ise geminin yapım yılı ve Uluslararası Petrol Kirliliğini Önleme Sertifikası (IOPPC) yenileme sürvey tarihine göre bir sistem oluşturulmuştur. Uluslararası sefer yapan ve 500 gross ton üstü tüm gemiler için ortak kural ise 8 Eylül 2024 tarihi itibarıyla balast arıtım cihazının gemiye montajının gerçekleşmiş olması gerekliliğidir.

Son yıllarda, nükleik asit analizindeki teknolojik gelişmelerin büyük ölçüde yönlendirdiği biyolojik çeşitlilik çalışmaları için genetik yöntemlerin, giderek artan bir şekilde uygulanması dikkat çekmektedir. Bu tür yöntemlere dayalı izleme yaklaşımları, biyolojik çeşitlilik değerlendirmeleri için önemli ölçüde örnekleme üretimini artırma ve geleneksel yaklaşımların duyarlılığını, özgünlüğünü ve taksonomik doğruluğunu geliştirme potansiyeline sahiptir. Hedef tanımlı yöntemlerin uygulanması (büyük ölçüde PCR'a odaklanmış ancak giderek yeni prob tabanlı metodolojiler ile birleştiren) nesli tükenmekte olan türlerin izlenmesinde bir paradigmaya yol açmaktadır ve bu tür yöntemler halihazırda balast suyu takibinde erken teşhis için uygulanmaktadır. Yüksek çıktı sıralamasına (HTS) dayalı profil oluşturma yaklaşımlarındaki hızlı gelişmeler benzer şekilde balast tanklarında bulunan biyolojik çeşitliliği kataloglama çabalarını geniş çapta etkileyebilmektedir. Ayrıca balast suyu taşımacılığının yarattığı biyotik değişimin risklerini ve bu riskleri azaltmaya yönelik girişimlerin etkinliğini daha iyi anlamak için yeni fırsatlar sağlayabilmektedir (Darling ve Frederick 2018).



Şekil 2.6 Gemi balast operasyonu döngüsü (Globalast 2014)

Balast suyu gemilerde stabiliteyi sağladığından, emniyetli seyir açısından önemli yer teşkil etmektedir. Gemi balast operasyon döngüsü Şekil 2.6'da sunulmuş olup gemiler bu döngüyü seyri sefer esnasında yapmaktadır. Bununla birlikte, bir gemi balast suyunu tanklarına aldığı anda, su içindeki organizmalar da okyanusun her yerine taşınır. Bu nedenle, balast sularının deşarjı ekosistem için sorun teşkil edebilecek mikrobiyal organizmalar, yosunlar, istilacı türleri içerebilir ve bu durum deniz ortamı için önemli bir sorun oluşturur. Bir geminin seyri esnasında iyileştirilmemiş balast sularını deşarj etmesi, muhtemelen çevreye yeni istilacı sucül türleri tanıtmış olacaktır. Son yıllarda, uluslararası ticaret ve gemi trafiği hacmi istilacı türlerin ortama girme olasılığını arttırmıştır. Yerli ekosistem, ekonomi ve altyapı açısından zararlı sonuçlar ortaya çıkaran yüzlerce istila meydana gelmektedir. Gemi balast tanklarında taşınan sucül organizmalar, insanoğlunun karşılaştığı en ciddi küresel çevre felaketleri arasında gelmektedir. Balast sularıyla taşınıp yeni çevresine adapte olan istilacı deniz canlısı türleri, dünya için en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir. İnsanın çevreyi olumsuz yönde etkilediği bu dönemde, ekonomik değeri yüksek deniz türlerinin kayıpları önceki dönemlere göre daha hızlı görülmektedir. Haliyle, deniz ekosistemi kaynakları azalmakta, buna bağlı olarak çevresel ve ekonomik değerlerimiz için tehlike çanları çalmaktadır (IMO, 2018).

İstilacı türlerin yeni habitatlara transferi ilk olarak 1903 yılında Kuzey Denizi'nde yüksek miktarda *Odontella (Biddulphia sinensis)*, Asya kökenli fitoplankton yosunlarının varlığı ile görülmüştür. Bu konuda detaylı bilimsel çalışmalar 1970'lerde başlamıştır. 1980'lerin sonlarında, Kanada ve Avustralya istilacı sorunları olan ülkeler arasında ilk sırada yer almıştır. İstilacı türlerin balast suyu ile taşınması sorununa ilişkin nicel veriler, biyo-istila oranlarının artmaya devam ettiğini ve her geçen gün yabancı türler tarafından yeni alanların istila edildiğini göstermektedir (TUDAV, 2018).

Gemiler ile taşınan balast suyu geminin taşıma kapasitesinin %30-35'ini temsil eder. Balast suyu ve gemi tank tabanındaki sediment, planktonik organizmaların, zehirli dinoflagellatların, balıkların ve balık yumurtalarının / larvalarının ve diğer tek hücreli organizmalarının taşınması ve yayılması için ana vektördür. Küreselleşmeyle beraber yükler gemiler tarafından dünyanın bir ucundan diğer ucuna taşınırken, bu esnada gemi balast sularıyla ayda ortalama 25 bin civarında farklı türün de taşındığı tahmin

edilmektedir. Balast suyunun, gemiler yoluyla kendi bölgesinden başka bir ortama nakledilmesi, yerel olmayan türlerin bölgeye girişine ve ekolojik dengenin bozulmasına neden olabilir. Deniz habitatlarının fiziksel bozulumu, deniz kaynaklarının plansız avcılığı ve günümüzde özellikle Marmara Denizi'nde yüzleştığımız müsilaj ve bunun sebebi olan kara kaynaklı deniz kirliliği, okyanusların biyoçeşitliliğini ve sürdürülebilirliğini risk altına almaktadır. Son yıllarda söz konusu tehditlere, istilacı türlerin de eklenmesi bilim dünyasında ortak bir görüş haline gelmiştir (marinedealnews 2018).

Yaklaşık 7.000 deniz ve kıyı canlı türü, her gün her saatte, gemilerin balast su tanklarıyla okyanuslarda fark edilmeden seyahat etmektedir. Uygun bir ortama giriş yaptıklarında, yeni çevrenin predatörü olarak kendine karşı bir tehditle karşılaşmadan risksiz bir şekilde yaşamını sürdürebilmekte ve besin zincirinde bozulmaya neden olarak bölge ekolojisinin de değişimiyle beraber ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (WWF, 2009).

2002 ve 2006 yılları arasındaki ulaşım verileri göz önüne alındığında, kıyılarımızda ve çevresinde (Karadeniz Sahili, Ege Denizi ve Akdeniz) ortalama 23 milyon ton balast suyunun deşarj edildiği tahmin edilmektedir. Deşarj edilen balast sularının yaklaşık yarısı Akdeniz'den transfer olurken, taşınan balast sularının ortalama %25'i Karadeniz'den Türkiye sularına taşınmaktadır. Gelen balast suları oranının liman işlekliliği ile doğru orantılı olduğu düşünüldüğünde, denize deşarj edilmesi açısından Marmara Denizi (özellikle İzmit Körfezi) ilk sırada yer alırken, bunu sırasıyla Doğu Akdeniz ve Ege Denizi takip etmektedir (Korcak, 2011).

2.4.4 Balast Suyu Sözleşmesi Mevzuatı ve uygulama rehberleri

BWM Sözleşmesi, Zararlı Sucul Organizmalar ve Patojenlerin (HAOP) ortama girişlerinde kontrolü sağlamak ve durumu yönetmek için belirli yasal önleyici eylemleri tanımlayan yönetmeliklere ve bu yönetmeliklerin uygulanmasına yardımcı olmak için tüm paydaşlara teknik rehberlik sağlayan düzenlemelere dayanmaktadır. Sözleşme 5 Bölüm (Section), 23 Kural (Regulation) ve 14 adet Rehber (Guideline)' den oluşmaktadır. Ayrıca, BWM Sözleşmesi Madde 9 ve Madde 13 kapsamında, sırasıyla Balast Suyu

Sözleşmesi kapsamında Liman Devleti Kontrolü Rehberi ve Antarktika Antlaşması Alanında Balast Suyu Değişim Rehberi de sözleşme içerisinde yer almaktadır (Çizelge 2.1) G2, G7, G8, G10, G13, G14, G15 rehberleri incelendiğinde genetik araçların kullanımıyla bağlantılı oldukları göze çarpmaktadır.

Çizelge 2.1 BWM Sözleşmesinin Kuralları ve İlgili Rehberleri (Rey 2019'dan modifiye edilmiştir)

BÖLÜM A (GENEL HÜKÜMLER)

Kurallar (R)	İlgili Rehberler (G)
A1: Tanımlar	
A2: Genel Uygulanabilirlik	
A3: İstisnalar	
A4: Muafiyetler	G7: Balast Suyu Sözleşmesi Kural A-4 Kapsamında Risk Değerlendirme Rehberi
A5: Eşdeğer Uyum	G3: Balast Suyu Yönetimi Eşdeğer Uygunluk Rehberi

BÖLÜM B (GEMİLER İÇİN KONTROL VE YÖNETİM GEREKLİLİKLERİ)

Kurallar (R)	İlgili Rehberler (G)
B1: Balast suyu yönetim planı	G4: Balast Suyu Yönetimi ve Balast Suyu Yönetim Planı Geliştirme Rehberi
B2: Balast Suyu Kayıt Defteri	
B3: Gemilere İlişkin Balast Suyu Yönetimi	G5: Balast Suyu Alım Tesisleri Rehberi G6: Balast Suyu Değişim Rehberi
B4: Balast Suyu Değişim	G14: Balast Suyu Değişim Alanı Belirleme Rehberi
B5: Gemilere İlişkin Sediman Yönetimi	G1: Sediman Alım Tesisleri Rehberi G12: Gemilerde Sediman Kontrolünü Kolaylaştıracak Tasarım ve İnşa Rehberi
B6: Zabıtların ve Mürettebatın Görevleri	

Çizelge 2.1 BWM Sözleşmesinin Kuralları ve İlgili Rehberleri (Rey 2019'dan modifiye edilmiştir) (devam)

BÖLÜM C (BELİRLİ ALANLARDA ÖZEL GEREKLİLİKLER)

Kurallar (R)	İlgili Rehberler (G)
C1: İlave Tedbirler	G13: Balast Suyu Yönetimine İlişkin Acil Durumları İçeren Ek Önlemler Rehberi
C2: Belirli Alanlarda Balast Suyu Alımı ve İlgili Bayrak Devleti Önlemlerine İlişkin Uyarılar	
C3: Bilgi İletimi	

BÖLÜM D (BALAST SUYU YÖNETİMİNE İLİŞKİN STANDARTLAR)

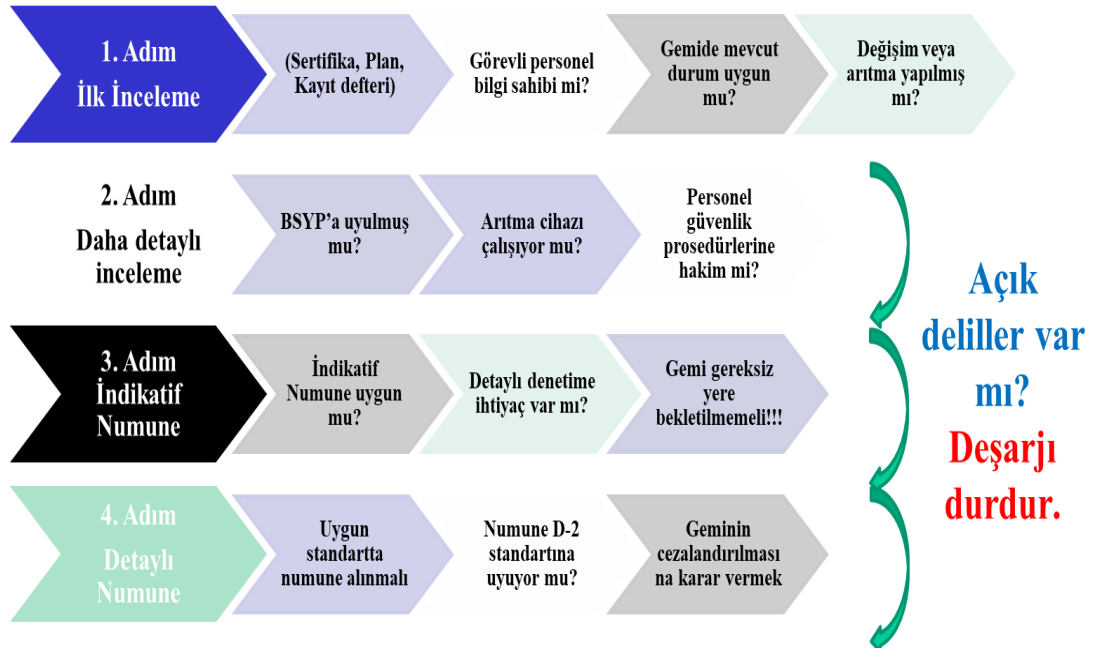
Kurallar (R)	İlgili Rehberler (G)
D-1: Balast Suyu Değişim Standardı	G2: Balast Suyundan Numune Alma Rehberi G6: Balast Suyu Değişim Rehberi G11: Balast Suyu Değişim Tasarım ve İnşa Standartları Rehberi
D-2: Balast Suyu Performans Standardı	G2: Balast Suyundan Numune Alma Rehberi G8: Balast Suyu Yönetim Sistemleri Onay Kodu G9: Etkin Madde Kullanan Balast Suyu Yönetim Sistemleri Onay Prosedürü G10: Prototip Balast Suyu Arıtma Teknoloji Programları Onay ve Gözetim Rehberi
D3: Balast Suyu Yönetim Sistemine İlişkin Onay Gereklilikleri	
D4: Model Balast Suyu Arıtma Teknolojileri	
D5: Standartların Örgüt Tarafından Gözden Geçirilmesi	

BÖLÜM E (BALAST SUYU YÖNETİMİNE İLİŞKİN DENETİM VE BELGELENDİRME GEREKLİLİKLERİ)

Kurallar (R)	İlgili Rehberler (G)
E1: Denetimler	
E2: Bir belgenin verilmesi veya onaylanması	
E3: Diğer Bir Tarafın Belge Vermesi veya Onaylanması	
E4: Belgenin Şekli	
E5: Belgenin Geçerliliği ve Süresi	
Madde	İlgili Rehberler (G)
Madde 9: Geminin Denetimi	G: Balast Suyu Sözleşmesi Kapsamında Liman Devleti Kontrolü Rehberi
Madde 13: Teknik Destek, İş birliği veya Bölgesel İşbirliği	G: Antarktika Antlaşması Alanında Balast Suyu Değişim Rehberi

- **Balast Suyu Sözleşmesi Gereklilikleri için Uygunluğun Denetlenmesi Prosedürü**

Gemiler yükleme ve boşaltma yapacakları limana yanaştıktan sonra, liman devleti kontrolörleri (PSC) gemiye çıkar ve BWM Sözleşmesine uygunluk açısından gemide bulunması gereken balast suyu kayıt defteri (tüm operasyonların detaylarını ve son 2 yıllık hareketleri içeren (RegulationB2)) ve Balast Suyu Yönetim Sistemi Sertifikası (D-3) kontrolünü yapar. Daha sonra, uygunsuzluklara rastlanır ve buna bağlı olarak sertifikalarda, planda veya kayıt defterinde eksiklik, görevli personel bilgisinde yetersizlik, ekipmanın kondisyonunun sertifika ile uyumsuzluğu, arıtım sisteminin kullanılmaması, başka ülkelerden gelen kanunsuz deşarj şikayetleri gibi açık deliller tespit edilirse, ayrıntılı bir analiz için **Res. MEPC.252(67)-PSC Rehberinde** verilen adımlar takip edilerek balast suyundan numune alınabilir (Şekil 2.7). Analiz türü ve organizmalar ile ilgili olarak yöntem kalitatif, yarı kantitatif ve kantitatif olabilirken ayrıntılı analiz için önerilen yöntemler arasında zooplankton için mobilite testi de dahil olmak üzere görsel sayım, epifloresan mikroskop ile sayım kamarası ve indikatör mikroplar için bakteri kolonilerinin büyütülmesi gibi yöntemler önerilmektedir (David ve Gollasch, 2015).



Şekil 2.7 Liman devleti kontrolörleri için uygulanması gereken adımlar

- **Balast Suyu Sözleşmesi Yönetimi Stratejilerine Giriş**

BWM Sözleşmesinin kritik sayılabilecek noktalarından biri, balast suyunun arıtımı için geliştirilen D-1 (en yakın karadan en az 200 deniz mili uzaklıktan ve 200 m derinlik veya 50 deniz mili uzaklıktan ve 200 m derinlikte değişim) ve D-2 (balast suyu arıtım sistemleri) yöntemlerinin test edilebilmesi ve onaylanma prosedürleridir. D-1 yönetimi için mesafe ve derinlik gereksinimlerinin gemi rotası ve okyanusun fiziksel şartlarının karşılanamadığı durumlarda değişimin yapılacağı alternatif alanlar, söz konusu alanın biyolojik değerlendirmesi yapılarak Zararlı Sucul Organizma ve Patojenlerin (HAOP) varlığı kontrol edildikten sonra sözleşme gereği liman devletlerince belirlenebilmektedir. D-2 yönteminde ise kara ve deniz testlerinden geçtikten sonra onaylanarak gemiye monte edilen balast suyu arıtım cihazlarının liman devleti denetimlerinde gemi üzerinde uygun şekilde çalıştığının kontrolünün nasıl yapılacağı hususu çok belirgin olmayıp, PSC'lerin bu konuda pek deneyimleri bulunmamaktadır. Böylece arıtım cihazlarının testleriyle ilgili eğitimlerin PSC'lere liman devletince en kısa zamanda verilmesi önem arz etmektedir.

- **Balast Suyu Sözleşmesi Muafiyet Değerlendirmesi Prosedürü**

Gemi sahiplerinin (armatörler) sözleşme gereği, bazı şartları sağlamak koşuluyla balast suyu değişimi (D-1) ve balast suyu arıtım sisteminden (D-2) muafiyet hakları bulunmaktadır. Muafiyet için gereken şartlar açısından, hep aynı rotada seyir yapan gemiler için risk değerlendirmesi kapsamında muafiyet verilebilmektedir. Kural A-4 gereği, sürecin bilimsel olarak risk değerlendirmelerine ilişkin tavsiyeler sunan G7 rehberine uyması halinde 5 yıla kadar muafiyet verilmesinin mümkün olduğu sözleşmede belirtilmektedir. Alıcı ve donör bölgeler arasında transfer edilen bir türün hayatta kalma olasılığını değerlendirmek için sıcaklık ve tuzluluk veya HAOP dağılımı gibi çevresel faktörlerin karşılaştırılmasına dayanan üç risk değerlendirme yaklaşımı (çevresel eşleşme, türlerin biyocoğrafik ve spesifik olarak türlerin tanımlanmasına dayanan) ana hatlarıyla sözleşmede belirtilmiştir (IMO, 2007).

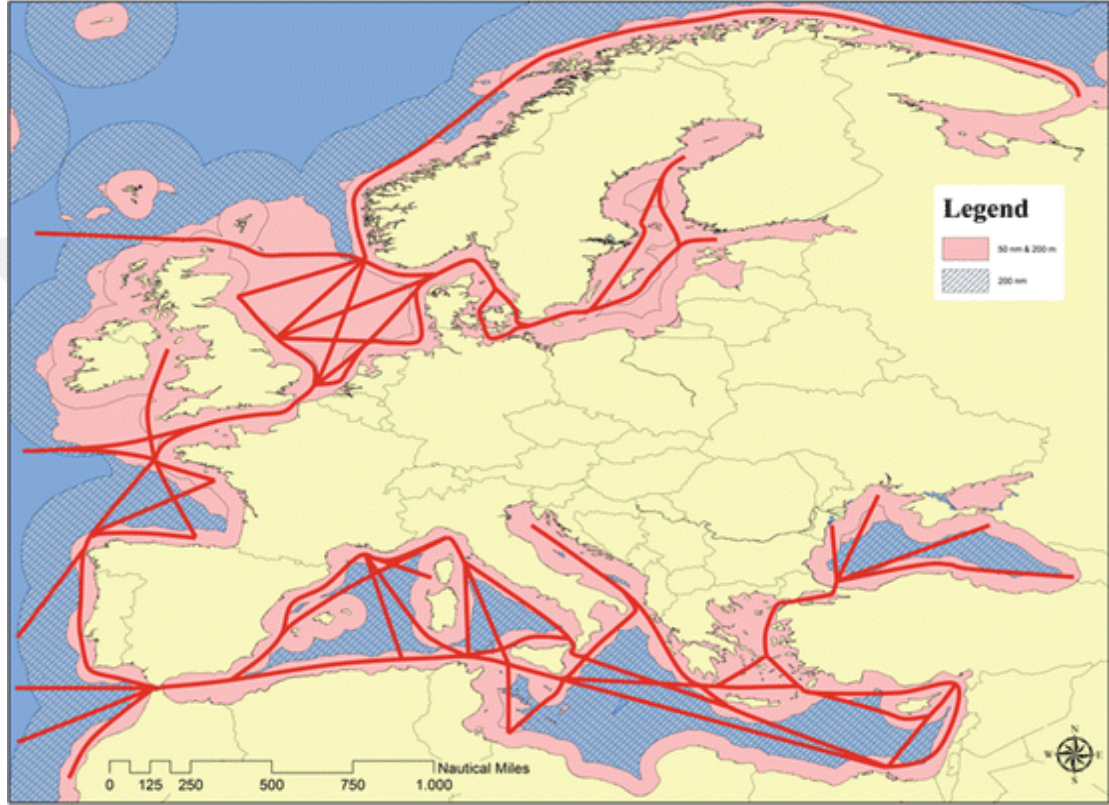
2.4.4.1 Balast suyu değişimi standartları (D-1)

Okyanus ortasında yapılan ve nispeten daha az maliyetli olan balast suyu değişimi genellikle istenmeyen türlerin balast suyuna aktarılmasıyla ortaya çıkma riskini azaltmak için tavsiye edilir. Balast suyu değişimi, liman ve yakın kıyı bölgelerinden alınan deniz suyunu derin, açık okyanus deniz suyu ile değiştirerek yerli olmayan türlerin balast tanklarından uzaklaştırılması için kullanılan operasyonel bir yöntemdir (Rabotnova, 2012). Nitekim kıyı sularındaki organizmalar, çoğu durumda açık okyanusta hayatta kalamadıklarından, daha derin okyanus sularında düşük istila riski taşımaktadır. Dolayısıyla, derin okyanus bölgelerine boşaltılan balast suyu, boşaltıldıktan sonra bir kıyı bölgesi için büyük bir risk oluşturmaz.

Kıyıya yakın yaşayan organizmalar (liman ve nehir ağızları dahil) genellikle okyanusun ortasında salındıklarında hayatta kalma ihtimalleri çok düşüktür. Ayrıca, balast suyu değişimi esnasında, gemi ve mürettebat için güvenlik prosedürlerine uyulmalıdır ve bu bağlamda aşağıdaki uygulamalar önerilmektedir:

- Mümkün olan yerlerde, gemiler balast suyu değişimini derin sularda, açık okyanusta ve kıyıdan mümkün olduğunca uzakta gerçekleştirmelidir. Mümkün olan zamanlarda, söz konusu balast suyu değişimi en yakın karadan en az 200 deniz mili uzakta ve 200 m derinlikte suda örgüt tarafından geliştirilen rehberleri dikkate alarak yapacaktır. D-1 değişim standardı için uygun deniz alanları Şekil 2.8’de sunulmuştur.
- Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda balast suyu değişiminin yapılmasının mümkün olmadığı hallerde, balast suyu değişimi, kılavuz dikkate alınarak en yakın kıyıdan mümkün olduğunca uzakta ve her koşulda en yakın kıyıya en az 50 deniz mili mesafede ve 200 metre derinlikteki suda yapılmalıdır. 9.1.2 maddesi ile uyumlu olarak balast suyunun tamamı pompaların emiş yapabildiği mümkün olan son noktaya kadar sürmelidir ve devamında eğer mümkünse süzdürme pompaları ya da enjektör sistemi kullanılmalıdır;
- Balast suyunun değişimi için taşıma yöntemi kullanılacak ise tank hacminin en az 3 katı tanktan dışarı basılana dek taşıma işlemi devam ettirilmelidir.

- Geminin rotası üzerinde balast değişimi için gerekli şartları sağlayan bir bölge bulunmaması durumunda, liman devletinin önceden belirlediği bölgelerde balast değişimi yapılabilir.
- Liman devleti tarafından onaylanan diğer balast değişim seçenekleri göz önünde bulundurulmalıdır (TurkLoydu, 2019).



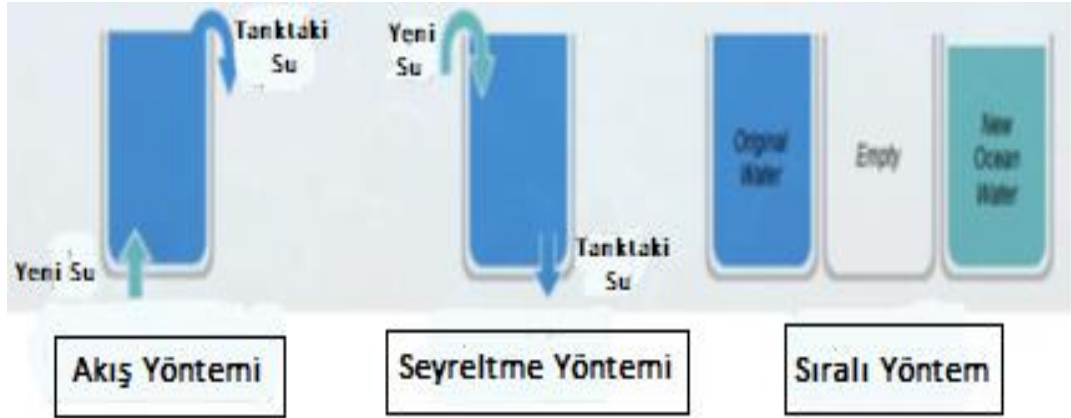
şekil 2.8 D-1 değişim standardı için uygun deniz alanları (David vd. 2015)

D-1 Standardı için üç farklı balast suyu değişim yöntemi bulunmaktadır (şekil 2.9).

Sıralı: Bu yöntem, balast pompalarının emişini kaybedene kadar balast tanklarının boşaltılmasını ve ardından tankların boşaltım sistemleri tarafından daha fazla arınmasını sağlar. Tanka yeni balast alınması bu işlemi takip eder.

Akış yöntemi: Bu yöntemde su tanka pompalanır ve daha sonra hava deliğinden veya özel taşma deliklerinden taşmasına izin verilir. Bu taşma, %95'lik bir değişim verimliliği elde etmeye denktir ve pompalanacak olan tank hacminin  katıdır.

Seyreltme Yöntemi: Bu yöntemde tankın iki açıklığı bulunmaktadır, burada su bir açıklıktan pompalanır ve diğerinden dışarı akıtılır (Sanguri 2010).



Şekil 2.9 Balast suyu değişim yöntemleri (Globalast 2014-2017c)

2.4.4.2 Balast suyu arıtım standartları (D-2)

D-2, insan sağlığına zararlı indikatör mikroorganizmalar da dahil olmak üzere denize boşaltılabilecek maksimum canlı organizma miktarını belirler (Çizelge 2.2).

D-2 standardı gemilerin sadece aşağıdaki kriterleri karşılayan balast suyunu deşarj edebileceğini belirtmektedir:

- Metreküp başına minimum boyutta 50 mikrometreden büyük veya ona eşit 10'dan az yaşayabilir organizma;
- Mililitre başına minimum boyutta 10 mikrometre ile 50 mikrometre arasında olan 10'dan az yaşayabilir organizma;
- 100 mililitre Toksikojenik *Vibrio kolera* başına 1'den az koloni oluşturan birim (Cfu);
- 100 mililitre *Escherichia coli* başına 250 cfu'dan az; ve
- 100 mililitre bağırsak Enterokokları başına 100 cfu'dan az (IMO, 2019f).

Balast suyu arıtımı üzerine çalışan birçok firma, IMO tarafından yayınlanan D-2 standartlarını karşılamak için farklı yöntemler üzerinden çalışmalarına devam etmekte veya bitirmiş durumdadır. Bu yöntemler arasında IMO tarafından sonuçları onaylanmış olan fiziksel, kimyasal ve mekanik yöntemler üzerinden arıtım sistemleri geliştirilmekte ve sistem son haline ulaşmaktadır (Vural ve Yönsel 2016).

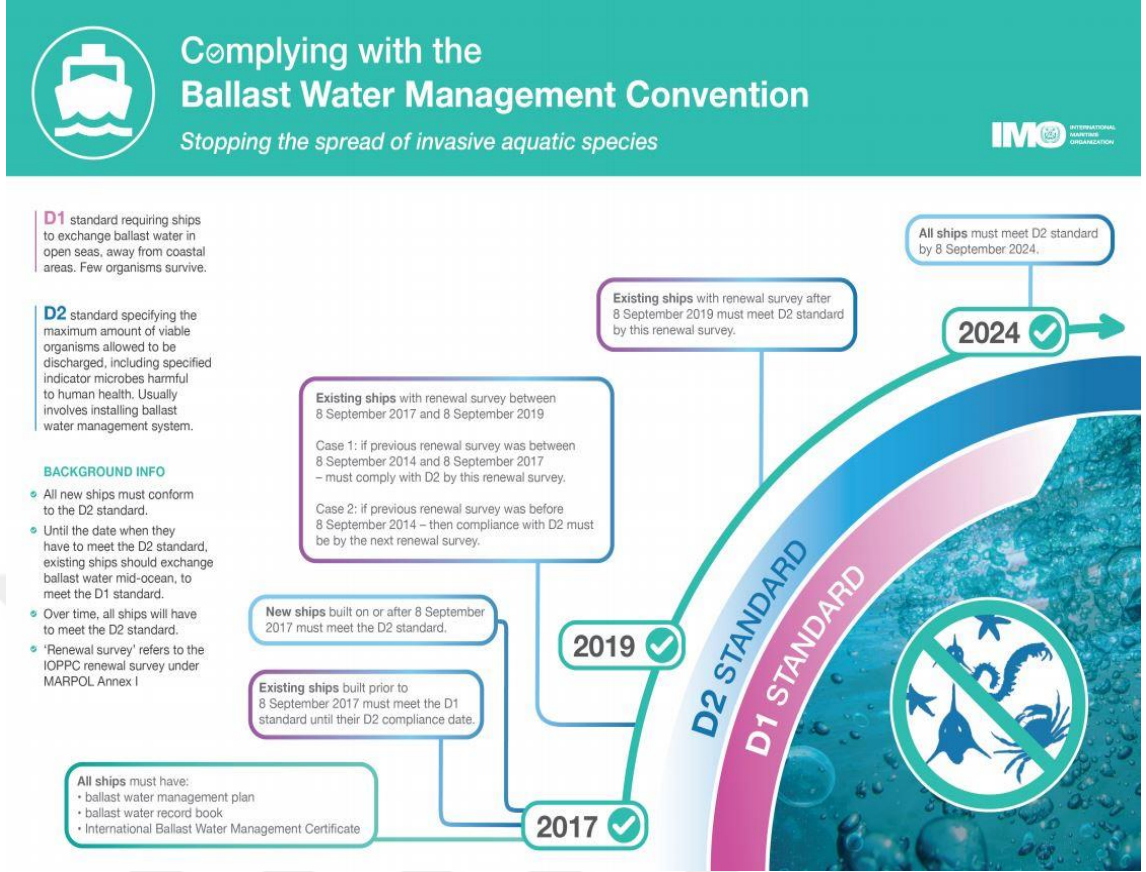
Çizelge 2.2 D-2 Değişim Standartları (Biosea 2019)

Mikroorganizma Kategorisi	D-2 Standartları
Plankton boyutu > 50 µm	< 10 canlı hücre / m ³
Plankton boyutu 10-50 µm	< 10 canlı hücre / mL
Toxicogenic <i>Vibrio cholerae</i>	< 10 Cfu / 100 mL
<i>Escherichia coli</i>	< 250 Cfu / 100 mL
<i>Intestinal enterococci</i>	< 100 Cfu / 100 mL

2.4.5 BWM Sözleşmesinin uygulanmasındaki zorluklar

2.4.5.1 D-2 standardında karşılaşılan teknik sorunlar

IMO'nun aldığı karar doğrultusunda D-2 standartlarına geçiş için kademeli bir takvim oluşturulmuş olup son tarih olan Eylül 2024 itibariyle sözleşmeye tabii olan tüm gemilere D-2 arıtım standartlarına uyum zorunluluğu getirilecektir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 D-1 ve D-2 standartlarına uyum takvimi (IMO 2021b)

IMO (2008) 'de belirtildiği gibi G2 kılavuzuna göre, bir geminin uygunluğunu belirlemek için kullanılan numuneler, tahliye edilen balast suyunun tamamını temsil etmelidir. Carney vd. (2013) 'e göre, G2 kılavuzunda numunelerin zorunlu olduğu belirtilse de bu örneklerin nasıl elde edileceğine dair net kurallar sunulmamış olup balast suyu örneklerinin temsili bu konuda net bir şekilde tartışılmamıştır.

Uygulama sırasında G2 stratejileri, D-2 Yönetmeliği'ne uygunluğu tanımlarken, balast suyunun tamamen deşarjını temsil eden örnekler sağlamak için örnekleme rejimlerine ihtiyaç duyar. Operasyon olarak D-2 standardına uyumu kesin olarak değerlendiren protokollerin geliştirilmesi ve Balast Suyu Sözleşmesi'nin uygulanmasına yaklaşımları gibi bazı büyük zorluklar ortaya çıkmaktadır. Büyük hacimli balast suyu gibi balast tanklarının sayısı ve boyutu, tankların içindeki organizmaların heterojen dağılımı ve tankın şekli gibi değerlendirmelerin doğruluğunu etkileyen çeşitli faktörler

bulunmaktadır. Bu faktörler genellikle bir gemideki toplam balast suyunu temsil eden numunelerin elde edilmesi çabalarını engellemektedir (Carney vd. 2013).

Deniz organizmaların balast tankları içindeki dağılımı heterojen olarak bilinir (Murphy vd. 2002, Goulash ve David, 2010) ve bunun doğal olarak tüm gemiyi temsil edecek örneklerin toplanmasını engelleyeceği ve geciktireceği olasıdır. Bu numunelerin balast tanklarından elde edilmesinde karşılaşılan diğer zorluklar arasında, tortuların ve tankların düzensiz şekilleri, gemilerde bulunan büyük miktarda balast suyu ve balast suyu alımının farklı yerleri sayılabilir (Murphy vd. 2002, Carney vd. 2013). Örnekler genellikle çok kapsamlı analiz gerektirir ve bunu uygulamak için gereken süre gemilerin çalışması, kalkış veya hareketinde gereksiz gecikmelere neden olmaktadır (IMO, 2008). Diğer yandan, üretilen arıtım cihazlarının bakım tutumunun nasıl yapılacağı, arıza durumunda gemi mürettebatının acil bir önlem planının olması gibi konular belirsizliğini korumaktadır. Üretim yapan firmaların, ürünlerini geliştirmek ve yeni teknolojileri cihazlara hızlıca entegre etme hususunda biraz zamana ihtiyaç duydukları da bir gerçektir. Tıpkı elektrikli otomobillere tümüyle geçişte yaşanması muhtemel geçici sorunlar gibi her yeni teknolojinin getirdiği doğum sürecinin sancılı geçmesini doğal karşılamanın gerekli olduğu düşünülmektedir.

D-2 standardının uygulanmasının iki yıl ertelenmesi, gemi sahipleri ve denizcilik endüstrisi için de olumlu bir zorluk oluşturmaktadır, çünkü gecikme şu anda gemilerin karşılaştığı birçok sorunu hafifletebilir ve gemi sahiplerine 2016'ya göre üretilen yeni BWMS'yi kullanma konusunda rehberlik edecektir. IMO'nun 2016 Kılavuzları (G8) daha iyi bir şekilde yönetilmeli ve BWMS üreticilerinin araştırma ve üretimi daha rasyonel bir şekilde yapmalarına izin verilmesi gerekmektedir. Diğer bir zorluk, eski ekipmanların, teknoloji, güvenlik ve enerji verimliliğinde birçok dezavantajı bulunan ve IMO'nun 2016 Kılavuzlarını kabul ederken orijinal niyetiyle çelişen ekipmanların büyük ölçekte takılması ve kullanılması, uygulama ve işletme maliyetlerini kontrol edilemez hale getirmesidir ki bu durum gemi sahipleri ve ekipman üreticileri için haksız bir durum olarak kabul edilir.

Son olarak, kısa vadeli hedef yerine uzun vadeli hedefe odaklanması ve sektörün, 2016 Kılavuzlarına uygun BWMS ürünlerini geniş ölçekte piyasaya sunması için yeterli zaman bırakması önerilir. Bu yaklaşımın çevre ve insan sağlığı için de daha faydalı olacağı belirtilmiştir (IMO, 2017a).

2.4.5.2 Çevresel maruziyet

Balast suyu arıtma sistemlerinin uluslararası onay prosedürü, her bir maddenin tahmini maruz kalma seviyelerini deneysel toksisiteleriyle karşılaştırır. Birçok madde, düzenlemesinde iyi kurulmuş olsa da bu yaklaşım, çoklu maruziyet ve uzun vadeli ölümcül etkiler gibi kritik yönleri göz ardı edebilecek olması nedeniyle de eleştirilmektedir.

IMO, gemiye kurulum için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlere dayalı olarak geliştirilen sistemleri onaylamıştır, en yaygın olanı ise yüksek performanslı filtrelerin oksitleyici kimyasallar veya UV radyasyonu ile kombinasyonudur. Bilinen bir oksidatif su arıtma problemi, birçoğu uzun süreli toksisite gösteren dezenfeksiyon yan ürünlerinin oluşmasıdır. Doğal biyotada genetik hasarlar üreme başarısı ile birlikte tüm biyolojik çeşitliliği etkileyebilir. Doğal biyota genetik hasarın başlaması, çevre kirliliği nedeniyle insan sağlığına yönelik tehlikeler için bir koruyucu görev görebilir ve genetik hasarın uyarılması, biyolojik çeşitlilik için olası bir tehdidi işaret etmektedir (Werschkun vd. 2014).

Çoğu durumda, daha büyük partiküllerin filtreler veya hidrosiklonlarla mekanik olarak ayrılması ilk eylem aşamasını oluşturur. Bu sistemlerin çevreye ve insanlara karşı kimyasal tehditlere neden olma potansiyeli olmamakla birlikte, zayıflıkları yüksek bulanıklık veya yüksek çözünmüş organik madde içeriğindeki UV enerjisinin nüfuzunu azaltabilecek yüksek enerji tüketimi ve potansiyel performans sorunları oluşturmaktadır. Bu nedenle, istenmeyen organizma yetersiz UV penetrasyonu nedeniyle arıtma sistemi tarafından yok edilememektedir (Werschkun vd. 2014).

2.4.5.3 İnsana ilişkin maruziyet

Arıtma sistemlerindeki birçok ayrıntı, sık temizlik ve bakım prosedürlerini içerip içermediği veya gemide kimyasalların depolanmasını gerektirip gerektirmediği gibi sistemin türüne bağlıdır. BWM Sözleşmesinden kimyasallara maruz kalma özellikle gemi mürettebatı ve liman devleti denetçileri için değil, aynı zamanda alandan etkilenme bölgesindeki insan toplulukları için de tehlikeli bir potansiyele sahiptir. BWMS de bulunan veya ortaya çıkan kimyasallar, uygun koruyucu giysi ve ekipmanla engellenebilirken temas yoluyla veya arıtılmış balast suyundan atmosfere yayılan THM gibi uçucu maddelerin solunması yoluyla insan sağlığına zarar verebilmektedir.

IMO, gemi sahiplerinin mürettebatını balast suyu arıtımı ile ilgili kimyasallardan korumasına yardımcı olmak için belirli bir gemide bir BWTS kurarken ele alınması gereken olası maruz kalma durumlarını detaylandıran bir rehber belge yayınlamıştır (IMO, 2009). Ayrıca mesleki olmayan temas durumları, yüzme sırasında seyretilmiş balast suyunu yutarak veya balast suyu deşarj alanlarından deniz ürünleri tüketerek oral kimyasal alımını içermektedir (Werschkun vd. 2014).

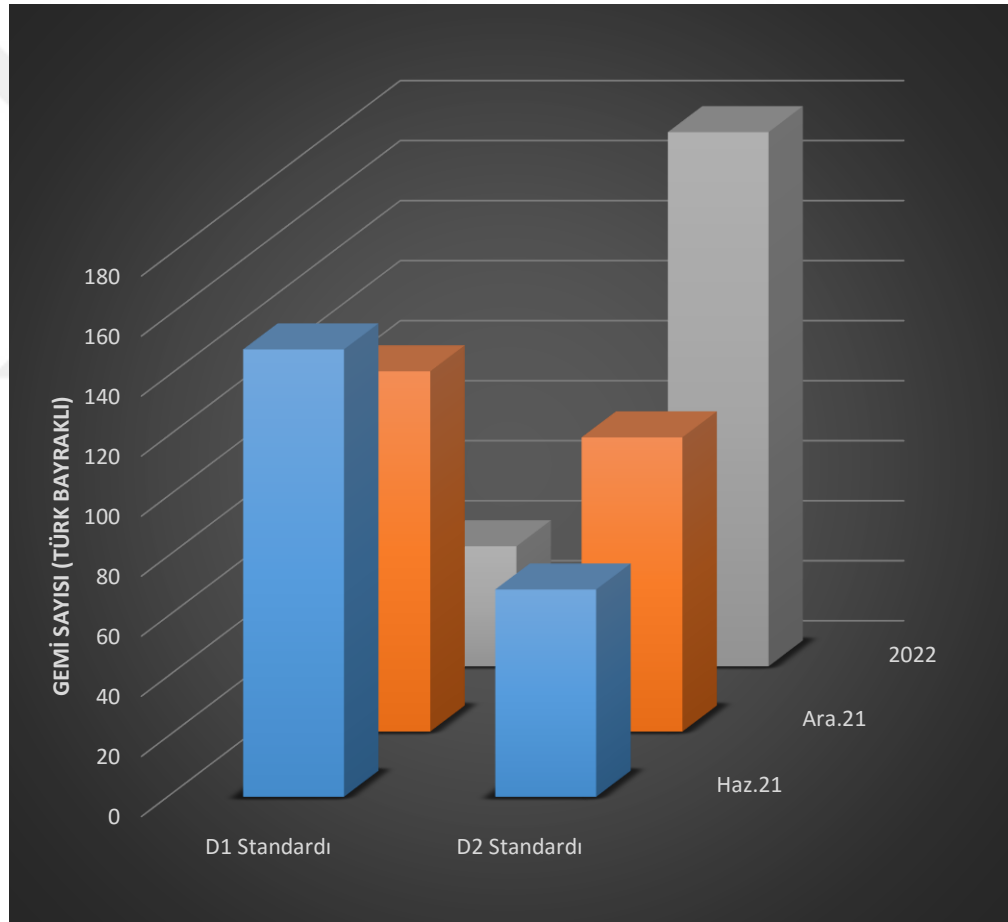
2.4.5.4 Gemilere takılacak arıtım cihazlarında üretim sorunları

IMO'nun 2017 yılında düzenlediği Deniz Çevresi Koruma Komitesi (MEPC) toplantısında alınan karar gereği balast suyu arıtım sistemlerinin gemilere montajı için son tarihi 08 Eylül 2024 yılına ertelemiştir. Ancak bu erteleme, denizcilik sektörünü farklı açılardan sıkıştırarak dolaylı da olsa farklı çevre sorunlarına yol açabilecektir.

Arıtım sistemlerinin gemilere montajlanması için yaklaşık 30 ay gibi bir süre kalmıştır. Sektör uzmanları, bu süre zarfında 35.000 civarı geminin arıtım cihazını taktırmakla mesul olduğunu ve bu rakamın son yıllarla kıyaslandığında %700 daha fazla olduğunu belirtmektedir. Bu durum tersanelerde şüphesiz bir tsunami etkisi oluşturarak montajın bitim tarihini uzatacak ve işin kalitesinin düşürülmesine neden olabilecektir (Anonymous,

2021b). Armatörler gemilerinin tersanelerde sıra beklemesinden ötürü deniz ticareti piyasasında gemilerin sayısının azalarak navlun fiyatlarını etkileyeceğini öne sürerek, IMO'dan muafiyet veya sürenin uzatılması talebinde bulunacakları ihtimalini ortaya çıkaracaktır.

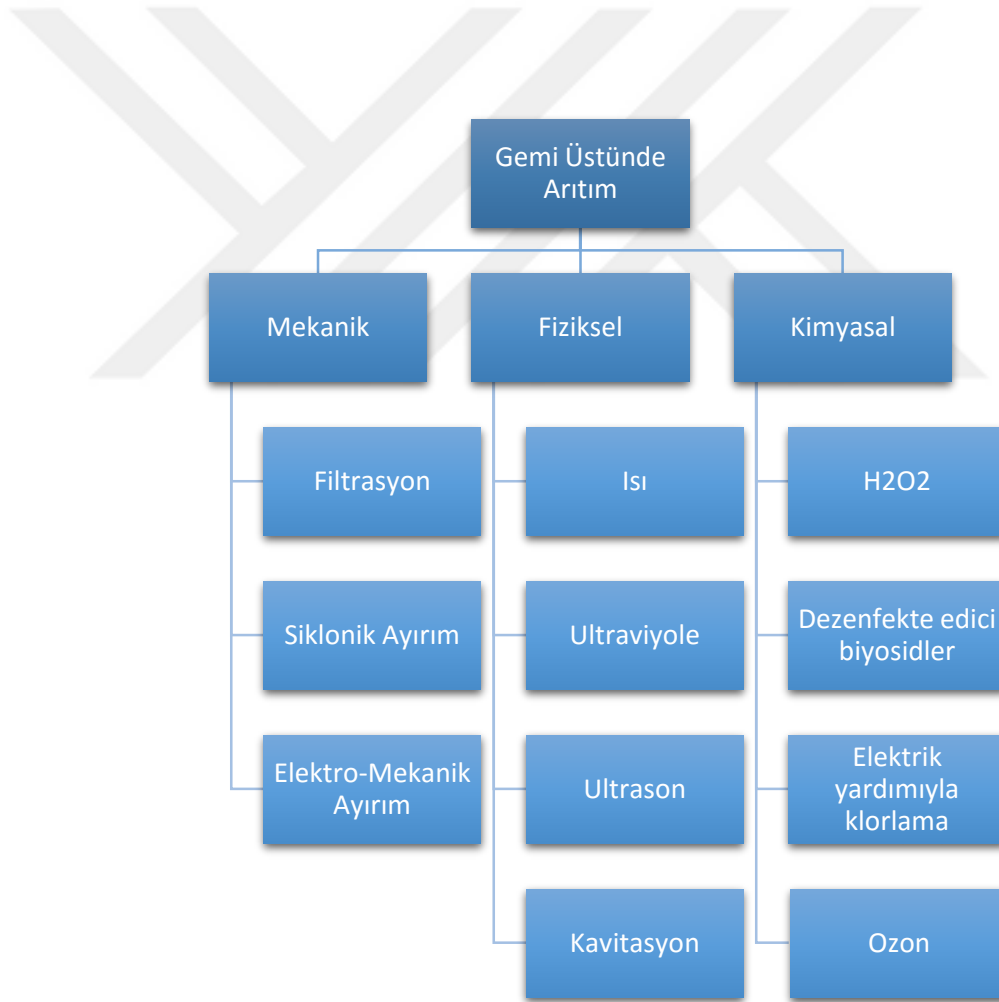
Ülkemizde (Türk Bayraklı gemiler için) D-2 arıtım standardıyla ilgili olarak; Haziran 2021 itibariyle 69 gemi arıtım cihazıyla donatılmış olup 2021 yılı sonunda bu sayı 98'e, 2022 sonunda ise toplamda 178'e çıkacaktır. Haziran 2021 tarihi itibariyle D-1 standardına tabii Türk Bayraklı gemi sayısı ise 149 olarak bildirilmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 D-1 ve D-2 Standardında Türk Bayraklı gemi sayısı

2.4.6 Balast suyu arıtımında kullanılan yöntemler

Mevcut gemi ve teknoloji kısıtlamaları nedeniyle, balast suyu arıtımı için tek başına hiçbir yöntem yeterli değildir. Bu nedenle, birden fazla yöntem kullanan karma sistemler geliştirilmekte ve piyasaya sunulmaktadır (Şekil 2.12). Bu sistemlerin genellikle iki farklı aşaması vardır. İlk aşamada, balast suyundaki mevcut parçacıklar ve büyük organizmalar mekanik yöntemlerle tutulur ve balast suyu ikinci aşamaya ait yöntemler için hazırlanır. İkinci aşamada, arıtım bir veya daha fazla yöntem birlikte kullanılarak yapılır (Güney, 2018).



Şekil 2.12 Gemi üstü D-2 arıtma sistemleri (Güney 2018)

2.4.6.1 Mekanik yöntemler

Mekanik yöntemlerin temelinde, deniz suyunun balast tankına girmeden önce mekanik bir işlemle tanka ulaşacak organizma ve tortu miktarının azaltılması yatmaktadır. Bu, birçok organizmanın ve parçacığın ilk etapta balast tankına girmesini önler böylece organizmalar doğal ortamlarında kalabilir. Mekanik yöntemler içerisinde ilk olarak siklonik ayırma ve filtrasyon yöntemleri dikkati çekmektedir (Vural ve Yönsel 2016).

2.4.6.2 Fiziksel yöntemler

Balast suyu arıtımında kullanılan fiziksel yöntemler arasında kimyasal bir madde kullanmadan balast suyunda organizmaları saflaştıran ısı, ultrason, ultraviyole ve kavitasyon bulunur.

2.4.6.3 Kimyasal yöntemler

Balast suyu arıtımı için IMO standartlarında belirtilen bir diğer arıtma yöntemi kimyasalların kullanılmasıdır. Kimyasal bir madde, zararlı su organizmaları ve patojenler üzerinde genel veya spesifik etkileri olan bir madde veya organizma olarak tanımlanır.

2.4.6.4 Diğer yöntemler

Kosmopolit bir sistem olarak tanımlayabileceğimiz yöntemler de arıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu sistemlerde ilk olarak mekanik yöntemle dayalı olarak büyük çaptaki maddelerin veya canlıların ayrışması sağlanır ve ikinci aşamaya geçilerek daha küçük parçacıklar veya organizmalar hedef alınır (Vural ve Yönsel 2016).

Birçok gemi, D-1 düzenlemesi ve balast suyu arıtımı (BWT) ile ilgili olarak balast suyu değişiminin (BWE) harmanlanmış yöntemini uygular ve genellikle D-2 düzenlemesine göre, bu harmanlanmış yöntem balast suyu arıtımı ile birlikte balast suyu değişimini gerçekleştirmektedir (IMO, 2019c). Gemiye montajı bitmiş olan balast arıtım cihazı Şekil 2.13’de, cihazın problemleri ise Şekil 2.14’de sunulmuştur.



Şekil 2.13 Gemi montajı tamamlanmış balast arıtım cihazı



Şekil 2.14 Balast arıtım cihazında arıtım işlemi yapan probalar

2.4.7 Arıtma işlemi kaynaklı riski yönetme

Balast suyu iyileştirme sürecinin (D-2) uygulanması, yayılımcı yabancı türlerden kaçınmak için çeşitli avantajları olmasının yanı sıra hem gemi hem de mürettebat için bazı riskler içermektedir. Bu riskler balast suyunu arıtmak için kullanılan kimyasalların güvenli bir şekilde taşınmasını ve depolanmasını sağlamak ve aşağıda sunulan maddelere uygun olarak risklerin ele alınması için güvenlik prosedürlerinin geliştirilmesi açısından bir güvenlik değerlendirmesine tabi tutulmalıdır:

- “ • Kimyasalların veya müstahzarların gemiye yüklenmesi ve depolanması;
- Kimyasalların veya müstahzarların depodan balast suyu yönetim sistemine aktarılması ve uygulanması;
- Balast suyu yönetim sisteminin konumu ve ilgili borular;

- Balast suyu yönetim sisteminin işletilmesi;
 - Balast suyu yönetim sisteminin bakımı;
 - Balast suyu yönetim sisteminden dökülmeler; ve
 - Arıtılmış balast suyuna, kimyasallara veya müstahzarlara maruz kalma (IMO, 2009).”
- değerlendirmeleri yapılmalıdır.

Ayrıca, Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi’ne göre (Yönetmelik B-4-4), değişim, “kaptan böyle bir değişimin geminin, mürettebatının veya yolcularının güvenliğini veya istikrarını tehdit edeceğine makul bir şekilde karar verirse” istenmeyecektir.

2.4.8 Alternatif yöntemler

Balast Suyu Düzenlemelerine uymak için, bazı gemi sahipleri, gemiler herhangi bir yatırım yapacak kadar eski oldukları zaman geçerli nedenlerle liman bazlı arıtma sistemlerinden yararlanma eğilimindedir.

Daha küçük gemiler ve limanlarda verimli çalışma sağlamak için Bawat™ BWMS'nin yenilikçi bir versiyonu gemilerde ve limanlarda kullanıma hazırdır. Tasarım, ısı eşanjörleri ve yağ yakıtlı kazan sistemi, konnektörler, güç kaynağı ve hortumlarla özel yapım 30 metrelik bir konteynere (200 m³ / h sistem) sahiptir. Bu yenilikçi sistem "tek geçişli" sistem olarak adlandırılır ve gemi karina sularının arıtılması gibi diğer su arıtım sistemleri için de uygulanabilir (Baumler, 2019b).

2.5 Genetik Yöntemlerin Balast Suyu Yönetimine Entegrasyonu

Genetik yöntemler, son zamanlarda balast suyundaki biyolojik çeşitliliğin yanısıra ticari limanlardaki su kalitesinin gözlemlenmesi için uygulanan metotlar arasında oldukça revaçta olmaya başlamıştır. Ayrıca bu yöntemler, düşük yoğunluktaki organizmaların erken teşhisinde çok hassas bir iş çıkarmasının yanında, görsel bir taksonomi yaklaşımına

kıyasla yumurta, spor, larva, yavru gibi tüm yaşam evrelerinde ve özellikle istilacı türlerin sediment içindeki dinlenme evresi, planktonik yaşam evresi ve bentik omurgasızların tanımlamaları için daha doğru ve uygun maliyetli taksonomik tanımlama sağlamaktadır (Pochon vd. 2013; Zhan vd. 2013, Rey 2019).

Genetik temelli çalışmaların iş akışında, sırasıyla hedef türler için örnekleme yapılması, ilgili molekülün (DNA veya RNA) ekstraksiyonu ve genomun veya transkriptomun belirli bir bölgesinin güçlendirilmesine dayalı analizler yürütülmektedir. Genetik analizler; balast tanklarından veya limanlardan alınan her türlü numunede, karıştırılmış numuneler ve filtre edilmiş su veya sediment örneklerinde uygulanmaktadır. Filtrelenmiş su veya sediment içerisinden, çevredeki ortama dışkı, ağız içi salgı, doku şeklinde salınan ve genetik materyali ifade eden çevresel DNA'yı elde etmek mümkündür. Ortamda düşük miktarda bulunan taksonların, geleneksel yöntemlerle tespit edilememesine karşın genetik analizler türün erken tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Lodge vd. 2012).

Genetik yöntemler tür tanımlamasında DNA molekülleri; kolay ve uzun süre korunabilmesi ile stabil olması sebebiyle sıklıkla tercih edilirken, canlı organizmaların tespitinde DNA sınırlı olacağından RNA'ya yönelik çalışmalar dikkate alınmaktadır (Pereira vd. 2008, Doblin vd. 2007).

Birçok genetik çalışma, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğine dayanırken bu teknikte çalışılmak istenen bir bölgeyi büyütmek için türe özgü ve belirli bir taksonomik grubu veya tümünü hedefleyebilen, genomun belirli bir bölgesine bağlanan kısa DNA parçaları olarak ifade edilen primerler kullanılmaktadır (Patil vd. 2005).

Geleneksel PCR'de, amplifiye ürün reaksiyonun sonunda gözlemlenirken mevcut olup olmadığını kontrol etmek veya yakından ilişkili türler arasında ayırım yapmak için elektroforez ile analiz edilebilmekte veya sekanslanmış Kantitatif PCR'de (qPCR), amplifiye edilen ürün, hedeflenen genin kopya numarasının nicelleştirilmesine izin vererek PCR sırasında gerçek zamanlı olarak ölçümü yapılmaktadır (Nathan vd. 2014). Tek türden amplikonlar genellikle spesifik olmayan primerler kullanılarak elde edilir ve barkodlama adı verilen bir işlemde doğrudan Sanger tarafından sekanslanır. Türlerin

karışımı, belirli bir türü aramak için türe özgü primerler kullanılarak çoğaltılabilir ve sekanslanabilir. Sanger tarafından veya aynı anda birkaç türü amplifiye etmek için daha jenerik primerler kullanılarak amplifiye edilerek Metabarcoding adı verilen ve istilacı türleri tespit etmek için güçlü bir araç olan bu süreçte Yüksek Verimli Dizileme (HTS) platformlarında dizilenmektedir (Comtet vd. 2015, Xiong vd. 2016).

İşlem sonunda türlere veya taksonomik gruplara barkod atamak için dizilerin BOLD (www.barcodinglife.org) gibi bir referans veri tabanı ile karşılaştırılması gerekmektedir. DNA barkodunun seçimi, tür tespit düzeyi veya geniş biyoçeşitlilik değerlendirmesi gibi araştırma sorularına ve ilgili taksonomik gruba bağlıdır (Rey 2019). Geleneksel olarak metazoanlar için, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim I geni (COI), protistler için 18S RNA geni ve bakteriler için 16S RNA geni kullanılmaktadır. Metabarkodlama işlemi, balast suyunda biyolojik çeşitlilik çalışmalarında zooplanktonların ve fitoplanktonların izlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ghabooli vd. 2016).

Ayrıca, yüksek verimli dizileme tekniğinin gelişimi; bakteri, virüs ve ökaryotik mikroorganizmalar gibi genellikle göz ardı edilen ve balast suyunda bolca bulunduğu düşünülen mikroorganizmaların tespitinin önünü açarak, genetik yöntemlerin önemini de bir kez daha ortaya koymaktadır (Rey 2019).

2.6 Balast Suyu Sözleşmesinin Uygulamasında Genetik Verilerin Rolü ve Geliştirilmesi

D-2 arıtım standartlarında, deşarj standartlarına uygunluğunun test edilmesi, tür tanımlaması gerektirmez (indikatör mikroorganizmalar dışında) ve sadece canlı organizmaların sayısına dayanır. Bu bağlamda, deşarj edilen organizmaların tanımlanması, balast suyu yönetim önlemlerinin etkinliğini değerlendirmek ve böylece zararlı sucul organizmaların ve patojenlerin giriş olaylarını azaltmak ve aynı zamanda potansiyel olarak yerel olmayan bir türün girişini erken tespit etmek için faydalıdır. Canlılık, bir geminin D-2 Yönetmeliğine uygun olup olmayacağını

değerlendirmek için temel kriterdir ve yalnızca canlı organizmaları tespit etmek için evrensel bir yöntem henüz geliştirilmemiştir.

Sözleşme gereği uygulanması gereken uygunluk testlerinde alınan örnekler, tanklardaki düşük organizma yoğunluğu ve tank tipine bağlı heterojen karışım gibi nedenlere bağlı temsiliyeti zayıflatsa da, gemide bulunan balast suyunu çok yüksek oranda temsil etmesi gerekmektedir. Ayrıca, örneklerin tank içindeki balast suyunu doğru şekilde temsil ettiğinin doğrulanması için; alınan örneklerin hacmi, sayısı, örnekleme sıklığı gibi verilerin yanısıra gemideki örnekleme noktalarının uygunluğu da çalışılması gereken konular arasındadır (Rey 2019).

DNA barkodlama ve metabarkodlama başarı oranı BOLD www.barcodinglife.org, Silva www.arb-silva.de gibi DNA dizilerini tür adlarıyla ilişkilendiren iyi tasarlanmış bir referans veritabanına dayanmaktadır. Bununla birlikte, bilimsel olarak kullanılan tekniklerin kendine has eksikleri ve hata payları olabileceğinden DNA metabarkodlama tekniğinin, yanlış negatiflere yol açabilen ve dizilere dayalı takson bolluklarının tahmin edilmesini engelleyebilen PCR eğilimi (amplifikasyon başarı oranı bir numunede bulunan tüm taksonlar için eşit değildir) bir eksiklik olarak görülebilir (Elbrecht ve Leese 2015, Rey 2019). Organizma topluluğunun genom dizilimi (metagenomik) uygulaması çok daha külfetli ve tam genomun varlığına (yalnızca bakteriler için mevcut) dayanan karmaşık bir veri analizi gerektirse de PCR eğilimli çalışmanın yerini alabilmektedir (Taberlet vd. 2012).

2.7 Yabancı (İstilacı) Tür Tanımlaması ve Risk Analizleri ile ilgili Genel Bilgiler

Bilindiği üzere belirli bir ekosistemin yerli türü olmadığı halde, öngörülemeyen form ve zamanlarda, bir bölgeye istemsiz olarak dışarıdan gelen yeni türler istilacı (egzotik) türler olarak adlandırılmaktadır (Özdemir ve Ceylan, 2007). Yabancı türlerin istilası, ekosistemdeki değişiklikler, gemilerin balast suları ve insan yapımı faaliyetler gibi nedenlerle türlerin yer değiştirmesi sonucuyla karşı karşıya kalınır. İnsanlığın artan hareketliliği, çeşitli canlıların bir ekosistemden diğerine geçme oranını arttırmaktadır. Ayrıca, egzotik türler doğal toplulukları istila ederken (biyo-istila), bu genişlemeyle başa

çıkamayan yerli türler ise yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır (Özdemir ve Ceylan 2007).

Biyoçeşitliliğin maruz kaldığı bozulmanın ana sebeplerinden biri, doğal yaşam alanlarını istemli veya istemsiz terk edip yeni yaşam alanlarına dağılan ve yeni yaşam alanındaki yerel türleri tehdit eden istilacı türlerdir. Bu türlerin, yeni ortamlarda genellikle rakipleri veya predatörleri olmadığından hızlıca gelişerek populasyonları kontrolsüz bir şekilde artmaktadır. İstilacı türler avcı, parazit, hastalık vektörü gibi rollere bürünerek yerel biyoçeşitliliğe zarar vermeye başlar. Kötü ortam koşullarında bile hayatta kalmayı başarabilen bazı istilacı türler çevresel stres faktörlerinin de üstesinden gelebilmektedir. İstilacı türler, yeni çevrede hayatta kalabilmeyi başardıktan sonra ekonomik veya çevresel zarara neden olabildiği gibi insan sağlığını da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Deniz ticaretinin, dolayısıyla balast sularının, istilacı türlerin ana taşınım vektörleri arasındaki oranı son yıllarda dikkate değer biçimde artmıştır (Gibb vd. 2013).

Yük alma işlemi sırasında denize boşaltıldığında veya alındığında gemiyi stabilize etmeye hizmet eden gemi balast suyunun, dünya çapında yer değiştirmesi deniz ortamında sorunlara yol açar. Tahminlere göre, her yıl dünya çapında yaklaşık 3-5 milyar ton balast suyu yer değiştirmektedir. Bu yer değiştirmeler sonucu dünya çapında her gün yaklaşık 7.000 ila 10.000 farklı deniz mikroorganizması, bitki ve hayvan türünün taşındığı tahmin edilmektedir. Bu şekilde taşınan istilacı deniz canlıları deniz çevresi için ciddi bir sorun haline gelmiştir (Globalast 2017).

2014 balast suyu yönetimi sözleşmesini onaylayan Türkiye'nin, deniz çevresi kirliliği konusunda yükümlülükleri vardır. Bu yükümlülükler sadece uluslararası sözleşmelerden değil, bölgesel sözleşmelerden de kaynaklanmaktadır (Barselona Sözleşme 1976, Bükreş Sözleşmesi 1992, ikili anlaşmalar ve iç hukuk) (Kubilay 2014). Gemi kaynaklı kirlilik sorunu, ulusal düzeyde gerçekleştirilen çalıştaylar ve Türkiye açısından uluslararası platformlara katılması ile gündemde kalmaya devam etmektedir (Kutluk 2018).

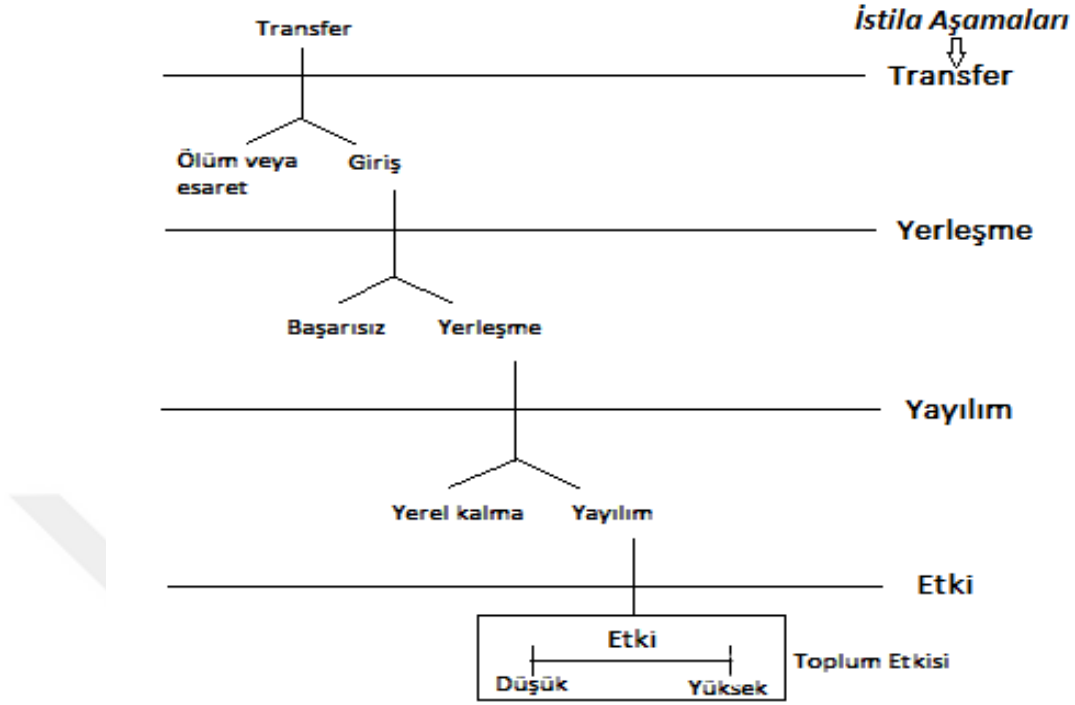
2.7.1 İstila periyodunun değeriendirilmesi

Türler yetişkin formunda transfer edilse bile, gemi taşımacılığı ile taşınım esnasında türlerin tüm yaşam dönemi dikkate alınmalıdır. Ayrıca, tuzluluk toleransı, boyut, hareketlilik, hava maruziyetine tolerans gibi bazı karakteristik özellikler, balast sularıyla organizmaların taşınım potansiyelini doğrudan etkilemektedir (Carlton, 2003).

İstilayı, adım adım bir süreç olarak tanımlayan entegre bir çerçeve dünya genelinde kabul görmüştür (Pereyra, 2016). İstilacı tür nedir ve istilacı türler bir çeşit koruma problemi olarak mı düşünülmelidir gibi sorular, istilacı türlerin tespiti biliminin teknolojik olarak istenilen seviyeye ulaşamamasından dolayı henüz tam anlamıyla çözülememiştir. Bu nedenle, bu tür sorular geleneksel tespit yöntemleriyle, özel spesifik yöntemlerin kıyaslanmasına yol açmıştır.

Genellikle, yerli olmayan türler kendi doğal ortamlarından seçilir ve aynı zamanda vahşi ekosistem olan yeni bir ortama giriş yapar (Şekil 2.15). Yabancı ortama giren türler, ya yerel olmayan yeni ortamlarında kendi kendini sürdürebilen populasyon artışına meyil ederler ya da nesli tükenir. Yerli olmayan populasyonun büyük oranda hızlı büyümesi, coğrafi yaşam aralığında genişleme yaratacak bu da ilgili ekonomik ve ekolojik rahatsızlığa neden olarak tür “istilacı” adını alacaktır (Lockwood vd. 2013).

İstila Ekolojisi



Şekil 2.15 İstila adımlarının modellemesi (Lockwood vd. 2013)

Herhangi bir yerdeki istila tehdidinin, istilacı yabancı türlerin (IAS) tanıma oranı ve yabancı istilacı türlerin oluşumuna altyapı oluşturan problemlerin derecesi ile arttığı gözlemlenmiştir. İstilacı yabancı türler, küresel biyolojik çeşitlilik, ekonomi ve insan sağlığı için birincil tehdit olarak kabul edilmektedir. İstilacı yabancı türlerin gelişimi çevresel değişimler, küreselleşmenin artması ve iklim değişikliğinin etkileri ile kolaylaşmaktadır.

Önde gelen istila vektörleri, düşük gelirli ülkeler ile yüksek gelirli ülkeler arasında dalgalanmaktadır. Bununla birlikte, birçok ülke için istilaya karşı hareket etme kapasitesi oldukça sınırlı olduğundan istilacı türün ortama girişi ve yerleşmesi ile ilgili nedenlere ilişkin verilerin birleştirilmesi vasıtasıyla erken uyarı ve eradikasyon planları geliştirebilir. Gelişmekte olan ekonomilerin olduğu ülkeler ve biyolojik çeşitlilik sıcak noktaları gibi önemli alanlar da dahil olmak üzere, küresel kara parçalarının %16'sının, istilaya karşı oldukça savunmasız olduğu bilinmektedir. (Levine ve D'Antonio 2003, Theoharides ve Dukes 2007, Early vd. 2016).

İstilacı türlerin ortama girişi ve oluşturdıkları sorunların yoğunlukları bugün, insanlık tarihinde herhangi bir zamanda olduğundan daha hızlı değişmektedir. Dünyadaki en fazla istilacı yabancı tür, en güçlü istilacı tür yönetim belirlemeleri ve istilaların kapsamı hakkında en büyük bilgiye sahip ekonomik gelişmiş ülkelerde bulunmaktadır. Ancak, gelecekteki istilaların coğrafi kalıplarının bugünkünden önemli ölçüde farklı olması muhtemel gözükmemektedir (McGeoch vd. 2010, Seebens vd. 2015).

2.8 Yeni Çevreye Taşınan Türün İstilacıya Dönüşümü

İstilacı yabancı deniz türleri biyolojik çeşitliliği, balıkçılığı, turizmi ve insan sağlığını tehlikeye atmakla beraber petrol döküntülerinin aksine durum zamanla kötüleşmektedir. Gemi balast suyu nedeniyle, dünya çapında 10.000 türün transit halinde olduğu tahmin edilmekte ve bu sorunu hemen çözmenin etkili bir yolu bulunmamaktadır. İstilacı yabancı deniz türleri, yeni deniz ortamlarına yerleşmek için ısrarcı doğaları nedeniyle tehlikeli türler olarak kabul edilmektedir. İstilacı türler, ortamdaki mevcut canlı toplulukları ile ağ kurarak yavaş yavaş doğal yaşam alanlarına adapte olmaktadır. Birçok yabancı tür yeni ortamlarını değiştirebilmektedir. Taraklı denizanası *Mnemiopsis leidyi*, Karadeniz'deki hamsi stoklarına yaptığı gibi yerli türlere de baskı uygulayabilmektedir (UNEP 2010).

Genellikle çeşitlilik açısından zayıf alanları işgal eden istilacı türler, bölgelerdeki yerel türlerle rekabet ederek ekosistemlerde değişikliklere neden olmaktadır. Karadeniz'de yoğun endüstriyel balıkçılık, su çıkarma, delta yapısındaki bozulma ve kirlilik, istilacı türlerin bu bölgeleri tercih etmesine neden olmuştur. Özellikle tür çeşitliliğinin kirlilik gibi nedenlerle önemli ölçüde erozyona uğradığı durumlarda, çevrede yaşayan birey sayısında önemli bir artış olabilir veya rekabet kayboldukça ve düşman olmadığında istilacı türler kolayca yayılabilirler. Geçmişte Karadeniz bu durumu deniz salyangozları (*Rapana thomasiana*) veya taraklı denizanası (*Mnemiopsis leidyi*) gibi canlılarla yaşamıştır (Sağlam vd. 2011).

2.9 Gemi Balast Sularıyla Karadeniz'e Taşınmış İstilacı Türler

Gemi kaynaklı çevre kirlilikleri çoğunlukla deniz kazalarında gündeme gelse de gemide yapılan yasa dışı deşarjlar ve diğer bilinçli yapılan bazı işler deniz çevresi için en büyük riski ortaya koymaktadır. Uluslararası alanda bu küresel sorunun üstesinden gelmek için, IMO liderliğinde imzalanan 1973 tarihli 1978 MARPOL 73/78 Protokolü ile değiştirilen Uluslararası Gemilerden Kaynaklanan Kirliliğin Önlenmesi Konvansiyonu, Akit Tarafların limanlarına gelen gemilerde üretilen atıkları etkin bir şekilde ele almak, depolamak ve nihai bertarafına göndermek için amaçlanmış bir antlaşmadır (Köseoğlu vd. 2016).

Deniz kirliliğinin en önemli nedenleri arasında sintine, balast veya tank yıkama sularının, benzeri evsel atıkların ve güvertelerin yıkanması sonucu oluşan petrol türevlerinin denize deşarj edilmesi yer almaktadır (Özdemir 2012). Karadeniz'deki istilacı türlere ilişkin veriler Çizelge 2.3'de sunulmuştur. Akdeniz'deki yabancı tür sayısı 1000'i aşarken, Türkiye'de ise denizdeki yabancı tür sayısı 500'e yaklaşmaktadır. Akdeniz'e gelen yabancı türlerin %74'ü Süveyş Kanalı'ndan gelirken, Karadeniz'e gelen yabancı türlerin %80'i gemilerin balast sularıyla denizel ekosisteme karışmaktadır (UNDP 2018). Son on yılda deniz taşımacılığı, Karadeniz'de kirliliğin artmasına ve istilacı türlerin (*Mnemiopsis leidyi*) Karadeniz ekosistemine yayılma oranının giderek artmasına neden olmuştur (UNEP 2010).

Çizelge 2.3 Karadeniz’de istilacı türler (Özdemir ve Ceylan 2007)

Türler (İstemsiz Ulaşım)	Yıl	Orijin
<i>Balanus improvisus, B. eburneus</i>	19.yy	Kuzey Amerika
<i>Blackfordia virginica</i>	1925	Kuzey Amerika
<i>Mercirella enigmatica</i>	1929	Hindistan
<i>Baugainvillia megas</i>	1933	Atlantik
<i>Rhithropanopeus harsis tridentata</i> (yengeç)	1932	Pasifik
<i>Rapana thomasi</i> (deniz salyangozu)	1953	Japon Denizi
<i>Mya arenaria</i> (tarak)	1966	Kuzey Denizi
<i>Callinectes sapidus</i> (Mavi yengeç)	1967	Kuzey Amerika (Atlantik Sahili)
<i>Doridella obscura</i> (Nudi branchiate)	1980	Pasifik
<i>Anadara cornea</i> (Ak midye)	1982	Adriatik
<i>Mnemiopsis leidyi</i> (taraklı medüz)	1982	Kuzey Amerika (Atlantik Sahili)
<i>Desmarestia viridis</i> (alg)	1990	Kuzey Avrupa

2.10 İstilacı Türlerin Karadeniz Sahillerine Verdiği Zararlar

Yabancı türler, deniz ekosistemlerinde, deniz biyolojik çeşitliliğinde, deniz canlılarına ve habitatlarına parazit taşıyabilir, hastalık bulaştırıp genetik bozulmaya neden olabilir, yerli türleri tüketerek rekabet yaratabilir ve nesillere zarar verebilirler. Bu türler insan sağlığı için bir tehdit oluşturarak hastalık ve zehirlenmelere yol açabilir. Ayrıca, ülke ekonomisi üzerinde olumsuz etkileri olan istilacı türler balıkçılık ve turizmi olumsuz etkilemektedir (UNDP, 2018).

İstilacı türlerin yaşayabilecekleri ve ait olmadıkları ekosisteme gelerek koloniler oluşturabilecekleri zararlar üç ana bölümde incelenmektedir:

Ekolojik açıdan: İstilacı türler, bu tür durumlarda doğal türlerin biyolojik çeşitliliğini ve ekolojik dağılımını etkiler ve azaltır. Çalışmalar, istilacı türlerin her hafta, bazen her gün dünyada bir bölgeyi işgal ettiğini göstermektedir;

Ekonomik açıdan: İstilacı türler tarafından zarara uğrayacak balık kaynakları, kıyı endüstrisi, turizm ve diğer ticari faaliyetler. Örneğin, Karadeniz'e gemi ile gelen bir tür denizanası “*Mnemiopsis*”, Türkiye'de balıkçılık sektörüne yaklaşık 1 milyar dolar zarar vermiştir.

İnsan Sağlığı: Zehirli organizmalar, hastalık mikroorganizmaları ve balast suyuyla yayılan patojenler insanlarda hastalığa ve hatta ölüme neden olurlar (Özdemir ve Ceylan 2007).

Buna ek olarak, “*Mnemiopsis leidyi*” adı verilen istilacı bir tür, kıyı balıkçılığının tükenmesiyle suçlanmakta ve yılda milyonlarca dolar harcanmasına neden olmaktadır (UNEP, 2010). Ayrıca, Karadeniz bentik ekosisteminin, istilacı deniz salyangozu “*Rapana venosa*” tarafından yüksek predasyon baskısı altında kaldığı bildirilmiştir (Knudsen vd. 2010).

Karadeniz'deki ekolojik dengenin çeşitli nedenlerle bozulması sonucu, bölgede yaşayan balık stoklarında önemli bir azalma olmuş ve ekosistemde bazı türler kaybolmuştur. Aynı dönemde Karadeniz'e giren, ortamdaki alandan faydalanan fırsatçı tür *Mnemiopsis leidyi*, yüksek popülasyon büyüklüğüne ulaşmış ve pelajik ekosistemde baskın tür haline gelmiştir (Kideys vd. 2005, Mutlu 2009). Öte yandan, 1980'lerin sonunda, Karadeniz hamsi popülasyonundaki ani azalma, pelajik ekosistemdeki omurgasız organizmaların önemine dikkat çekmiştir.

Karadeniz'de balık stokları “*Mnemiopsis leidyi*”nin istilasının sonucu, 90'lı yılların başında 600 bin tondan 100 bin tona gerilemiş, 90'lı yılların sonuna doğru ise yine gemi balast suları ile bölgeye taşınan, “*Mnemiopsis leidyi*”nin doğal predatörü ve taraklı deniz anası türü olan “*Beroe ovata*” 1999 yazı sonunda bütün Karadeniz'i kaplamasıyla birlikte ekolojide yeni bir değişim sürecine girilmiştir. Karadeniz'de yürütülen çalışmalar

sonucunda “*Beroe ovata*”nın, “*Mnemiopsis leidyi*” popülasyonunun biyokütlesinin %26'sını tüketebildiği ortaya konulmuştur (Bat, 2002).

Geliform organizmalar kıyı bölgelerinde yüksek nüfus yoğunluğuna kısa sürede ulaşabilir ve çevre koşullarına kolayca uyum sağlayabilirler. Sonrasında üreyen organizmalar balık ve balıkçılık faaliyetlerini (özellikle pelajik balıkçılık) ve dolayısıyla ekonomik balıkçılığı da olumsuz etkilemektedir (Özdemir vd. 2014).

Engraulis encrasicolus ponticus, Karadeniz'in pelajik ekosisteminde çok önemli bir role sahip olup Türkiye için ticari bir değerdir. 1980'lerin sonunda ve 1990'ların başında, hamsi stokları hem kirlilik hem de Karadeniz'de gıda olarak zooplankton tüketen istilacı “*Mnemiopsis leidyi*” türleri nedeniyle azalmıştır (Orhan 2010).

2.11 Risk Değerlendirmesi

Hızlı gelişen bir ekolojik disiplin olmasına karşın, kıyısız deniz ekosistemlerindeki istilacı türler üzerindeki çalışmalar 30 yıl öncesine göre daha fazla sayıdadır. Bilimsel ihtiyaçlar çoğunlukla biyoistilaların bazı ciddi ekolojik ve ekonomik sonuçları nedeniyle pratik gereksinimler tarafından yönlendirilir. Bilinçli veya bilinçsiz girişlerden kaynaklanan tüm sonuçları kesin olarak tahmin etmek mümkün olmamıştır. Örneğin, Pasifik istiridyesinin (*Crassostrea gigas*) serin Kuzey Denizi sularında üremesi pek olası gözükmez iken, küresel ısınma ve fizyolojik adaptasyonun sonucu olarak bölgede yüksek popülasyon yoğunluğuna ulaştığı bildirilmiştir (Reise ve Van Beusekom 2008).

Limanlarda mevcut zararlı sucul organizmalar ve patojonlara ilişkin risk analizleri gerçekleştirmek için gerekli olan genetik temelli arka plan bilgileri, zararlı alg türleri için (Doblin vd. 2007) zooplankton için, (Zaiko vd. 2016) ve istilacı yumuşakçalar için (Miralles vd. 2016) gibi birçok bilimsel çalışmada sunulmuştur (Rey 2019).

Killi vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, 45 denizanası türüne (30 hydromedusae, 14 scyphomedusae, bir cubomedusa) Akdeniz'deki potansiyel istilaları açısından risk taraması yapılmış ve yabancı türlerin değerlendirilmesi, uygun türlerin hedeflenebilmesi ve istilacı türlerin yönetimi konusunda yöneticilerin daha bilinçli adım atabilmelerinin sağlanması amaçlanmıştır. Risk değerlendirmesi açısından Sucul Türler için İstila Tarama Kiti (AS-ISK) kullanılmış, istilacı olma potansiyeli yönünden "düşük, orta ve yüksek" olarak risk taşıyan türlerin güvenilir bir şekilde ayırt edilmesi için uygulanmıştır. Temel ve iklim değişikliği eşik değerlendirme puanları sırasıyla 6,5 ve 12,5 olarak uygulanmıştır. Bu eşikler kullanılarak, mevcut iklim koşullarında 16 tür yüksek riskli, 23'ü orta riskli ve 6'sı düşük riskli olarak sınıflandırılmıştır. Gelecekteki iklim koşulları göz önünde bulundurulduğunda iki tür 13 ve 30 değerleri ile yüksek, orta riskli olarak sınıflandırılmıştır. Bir deniz anası türü olan *Cassiopea andromeda*, Avustralya benekli denizanası *Phyllorhiza punktata*, deniz ısırganı *Chrysaora quinquecirrha* ve *Rhopilema nomadica* en yüksek risk skoruna sahip olurken, tahmin edilen iklim değişikliği koşulları altında risk skorunda maksimum artışa *C. andromeda* tarafından ulaşılmıştır.

İstilacı tür potansiyeli olan türleri tespit etmek için en önemli ve atılması gereken ilk adım risk analizlerinin yapılmasıdır. Bu itibarla, son dönemde yapılan Avrupa Birliği yönetmeliğinde bu hususlar üzerinde durulmuş ve bir türün değerlendirilmesi için minimum gereksinimleri karşılayacak genel bir risk tarama aracının geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Bu aracın bütün taksonları içermesi, istila dağılımı ve yönetimi konusunda doğru yönlendirmeler yapabilmesi hedef olarak belirlenmiştir. Bu yeni araç Aquatic Species Invasiveness Screening Kit (AS-ISK) adıyla geliştirilmiş olup bütün sucul bitki ve hayvan gruplarına bulundukları ekosistemden bağımsız (tatlısu, acısu, deniz) uygulanabilmektedir. AS-ISK bir yazılım aracı olarak değerlendirildiğinde ise güçlü grafiksel arayüze ve kolay kullanıma sahiptir. Bu aracın artıları ve eksileri Türkiye'de ve dünyada son dönemde yapılan uygulamalarla, daha önce yapılan yaygın FISK (tatlısu balıkları için) uygulama örnekleriyle ve diğer risk tarama araçları ile karşılaştırılıp tartışılması beklenilmektedir (Tarkan vd. 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırma yeri

Araştırma alanı olan Marmara Denizi /Kocaeli ili/ Dilovası (11 tesis), Yarımca (6 Tesis) ve Hereke (3 tesis) Bölgesi Ankara’ya yaklaşık 400 km uzaklıkta olup, gemi seferlerinin en yoğun olduğu tesislerdendir (Şekil 3.1).

Örnekleme

Bu tez çalışması için gerekli olan gemi balast suyu örnek alımları, Şubat 2018 ve Mayıs 2019 tarihlerinde iki farklı dönemde İzmit Körfezi bölgesindeki liman tesislerine yanaşan gemilerden temin edilmiştir. Örnek alınan her gemiden Gemi Özellikleri (Ship Particular), Balast Kayıt Defteri (Ballast Record Book) ve Son 10 Liman Listesi (Port of Call List) belgelerinin fotokopileri alınmıştır.

Örnek alım planlaması yapılırken; gemiye çıkılması planlanan haftalar içerisinde her sabah saat 9:00’da Kocaeli Liman Başkanlığında görevli PSC’ler ile bir araya gelinerek günlük bazda liman tesislerine yanaşacak olan gemilerin durumu ve bu doğrultuda hangisinin örnekleme için uygun olacağı tespit edilmiştir. Tespit aşamasında, Ulaştırma ve Altyapı Bakanlığı “MarineTraffic” programı kullanılarak gemilerin uydu üzerinden seçimi sağlanmıştır. Akabinde uygun olduğu değerlendirilen gemiler için gemi kaptanı veya bağlı bulunduğu gemi acentesiyle görüşme sağlanarak gemilerin bulunduğu liman tesislerine hareket edilmiştir.

Örnekleme aşamaları

Hazırlık: Önceden tespiti sağlanmış ve liman tesisine yanaşmış olan gemiye borda merdiveninden çıkıldıktan sonra gemi güvenlik personeline kimlikler ibraz edilmiş ve gemi defterine ziyaretçi kaydı yapılmıştır. Sonrasında gemi kaptanına balast

örneklemesini ne için yaptığımız ve örnekleri nasıl almamız gerektiği üzerine kısa bir açıklama yapılmıştır.

Örnek Alım Yöntemi: Geminin yükleme durumu ve trimine göre geminin hangi bölgesinden örnek alınacağına karar verilmiştir. Taşıma yöntemiyle örnek alınan gemilerde 5 dk. boyunca taşıma yapılmış ve sonrasında örnekler alınmıştır. Menhole yönteminde ise uygun olan geminin menhole kapakları sökülmüş ve örnek alım ekipmanı kullanılarak daldırma yöntemiyle örnekler alınmıştır.

Bölgeye ait toplamda yaklaşık 15 farklı tesisten ve 20 farklı gemiden alınan gemilerin balast suyu örnekleri negatif ve pozitif kontroller haricinde üç tekerrürlü alınmıştır Her bir örneklemede 2L kapasiteli steril kaplar kullanılmış ve 0.22 µm membran filtreden süzülen örnekler sahadan laboratuvara soğuk zincirde taşınmıştır. Balast suyu örneklerinin laboratuvara transferinde üç tip kalite-kontrol örnekleri Goldberg vd. (2013)'e göre kullanılmıştır. Bu örnekler arazi kontrol numunesi, taşıma kontrol numunesi ve deney kontrol numunesi olmak üzere üç farklı tiptedir. Balast suyu örnekleri birleştirilerek bir havuz numune oluşturulmuş ve bu şekilde moleküler tanımlama ve risk analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.1 Marmara Denizi Kocaeli sınırları içerisinde belirlenen liman tesisleri

Örnek alınan gemilerin isimleri ve balast aldıkları noktaları gösteren belgeler mevcut olup herhangi bir hukuki duruma sebep olmamak adına paylaşılmamaktadır. Gemilerin en son balast değişimi yaptıkları kayıtlar incelendiğinde (Şekil 3.2); Rusya, İtalya, Hırvatistan, Belçika, Cezayir, Hindistan, Güney Kore, Japonya ve Şili'nin deniz sahalarında ve yakınlarında balast değişimi yaptıkları karşımıza çıkmıştır.



Şekil 3.2 Balast örnekleme yapılan gemilerin geldiği ülkeler.

3.2 Yöntem

Bu tez çalışmasında, organizma tarafından çevreye bırakılan nükleer veya mitokondriyal kaynaklı (mukus, gamet vb.) eDNA parçacıklarının, çoklu örneklerin çevreden alınması prensibine dayanan metabarkodlama ile birleşiminden oluşan “eDNA metabarkodlama” yöntemi kullanılmıştır.

eDNA metabarkodlama yöntemi; hücre zarının yıkılarak DNA’nın ortaya çıkarılması işlemine dayanan DNA izolasyonu, bir DNA parçasından çok sayıda kopya elde etmemizi sağlayan Polimer Zincir Reaksiyonundan (PCR) oluşan DNA bölgesinin amplifikasyonu ve kimyasal reaksiyonları, elde edilen ham dataların işlenmesini (biyoinformatik analizler) ve doğrulamayı içine alan yeni nesil dizileme olarak 3 aşamadan oluşmaktadır.

3.2.1 eDNA metabarkodlama yöntemine ilişkin moleküler analiz:

3.2.1.1 Örneklem ve filtrasyon

Elde edilen su örnekleri peristaltik pompa/steril tek kullanımlık enjektör yardımı ile 0.22 µm gözenek açıklığına sahip Sterivex (Millipore) filtrelerden geçirilmiş ve hemen ardından içerisine Longmire solüsyonu eklenerek analiz aşamasına kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2 Moleküler analizler

Elde edilen Sterivex kapsül filtre örneğinin DNA İzolasyonlarında, Spens vd. (2016) tarafından DNeasy® Blood ve Tissue kit (QIAGEN, Stockach, Germany) kullanılarak geliştirilen protokol uygulanmıştır. Bu protokol, Longmire solüsyonu ve Sterivex filtrelerden ayrı ayrı izolasyon yapılarak, elde edilen izolatların birleştirilmesine dayanmaktadır. Elde edilen DNA izolatlarının DNA miktar ve kaliteleri Qubit™ 3.0 Florometre ve Colibri Microvolume Spektrometre cihazları ve jel elektroforezi ile ölçülerek, önce aynı filtre örneğinin tampon çözelti ve filtre izolatları, ardından da her bir örnek için elde edilen 3'er adet izolat birleştirilmiştir. Aşağıda moleküler analiz için belirtilen hazırlık aşamaları sıralı bir şekilde ve başlıklar halinde sunulmuştur (Er 2020'den modifiye edilmiştir).

3.2.1.2.1 Longmire solüsyonunun hazırlanması

Amacı filtre içindeki DNA'nın uzun süreli korunumunu sağlamak olan Longmire solüsyonu her bir sterivex filtrenin içerisine 2'şer ml olacak aktarılmıştır. 1 litrelik Longmire DNA koruma solüsyonu içeriği aşağıda sunulmuştur (Longmire vd. 1997).:

1. 2M Tris-HCl; 50 ml (pH 8.0 olan)
2. 0.5 M EDTA; 200 ml (pH 8.0 olan)
3. 5 M NaCl; 2 ml

4. %20'lik SDS; 25 ml
5. İlk dört basamaktaki solüsyonlar 1000 ml'lik bir mezüre aktarılmış, üzeri saf su ile toplam hacim olan 1 litreye tamamlanmıştır.

3.2.1.2.2 DNA izolasyonu

Tez kapsamında elde edilen Sterivex kapsül filtre örneklerinin DNA izolasyonları aşamasında kullanılan protokol Spens vd. (2017)'nin geliştirdikleri DNeasy® Blood ve Tissue kit (QIAGEN, Stockach, Germany) protokolün modifiye edilmesi ile uygulanmıştır. Söz konusu protokolün ana prensibi Longmire solüsyonu ve Sterivex filtrelerden ayrı ayrı izolasyon yoluyla elde edilmiş izolatların birleştirilmesine odaklanmıştır. DNA izolasyon öncesinde kullanılan Sterivex Kapsül Filtrelerin dış yüzeyleri etanol ve %10'luk sodyum hipoklorit içeriği ile dezenfekte edilmiştir.

3.2.1.2.3 Longmire solüsyonundan izolasyon

Tezde kullanılan Longmire koruma solüsyonu içerikli Sterivex filtre kapsüllerinin inlet kısmı parafilm ile kaplanarak steril 5ml'lik tüpün içerisine geçirilmiş ve 50 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. İçerik katı ve sıvı fazların ayrımı için 2000 rpm'de 1 dakika kadar santrifüjlenmiştir (Spens vd. 2017).

Sonrasında 5ml'lik tüplerde toplanılan çözeltiler, 8000 rpm hızda 30-45 dakika arası santrifüjlenerek sıvı faz ayrımı yapılmış ve tabana çöken katı içerik kurumaya bırakılmıştır.

Her bir örnek için 180 µL ATL tamponu ve 20 µL proteinaz K karışımı hazırlanmıştır. 200 µL lizis karışımı çökeltiye eklenerek 15 saniye kadar vortekslenmiştir. Bu aşamaları takiben örnekler döner halde, 56 °C de 24 saatlik bir zaman dilimi boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Son aşama ise örneklerin 15 saniye vortekslenmesidir. Bu kısımdan sonrasını izleyen aşamalar Sterivex filtrelerinden izolasyon protokolü ile uyumlu biçimde yürütülmüştür.

3.2.1.2.4 Sterivex filtrelerinden izolasyon

Filtre kapsüller çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılmadan önce giriş-çıkış kapakları çıkarılmış ve giriş kısmı aşağıda kalacak şekilde ocağa yerleştirilmiştir. Sonrasında 1,5 ml tüp içerisinde, örnek başına 600 ml'lik saf su, 180 µL ATL tamponu ve 20 µL proteinaz K karışımı hazırlanmıştır (Spens vd. 2017).

Oluşturulan 800 µL lizis karışımı, kapsülün yan tarafları ve ile filtrenin dış kısımlarına temas edecek şekilde döküldükten sonra giriş-çıkış kapakları kapatılarak 5 sn süresince çalkalanmıştır. Numuneler 56 °C de 24 saat döner biçimde inkübe edildikten sonra, kapsüller 5 sn çalkalanmıştır.

Filtrenin giriş kısmı, Sterivex filtre kapsülü içerisindeki inkübasyon tamponu aktarımı için 5ml'lik sterilize edilmiş tüpün içerisinden geçirilerek parafilm ile kaplandıktan sonra 1 dakika süre için 5500 rpm'de santrifüjlenmiş ve bunu örneklerin birkaç saniye vortekslenmesi izlemiştir.

99%'luk örneklerle aynı hacme sahip soğuk etanol (moleküler biyoloji uygulamalarına uygun saflıkta) ile 200 µL AL tamponu ve üzerine örneğin hacmini tamamlayacak kadar saf su eklenerek örnekler çalkalandıktan sonra 2 ml'lik DNeasy kolonlarına aktarılmış (bir seferde en fazla 650 µL alınarak), 4°C ve 6000*g (8000 rpm)'de bir dakika santrifüjlenmiştir.

Sıvı kısmı atılan örnekler, bütün hacmi filtrelene kadar çalkalanmış ve 4°C ve 6000*g (8000 rpm)'de bir dakika santrifüjlenmiştir. 2 ml'lik yeni tüplere aktarılan DNeasy kolonlarının üzerine 500 µL AW1 tamponu eklenmiş ve 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında, 500 µL AW2 tamponu DNeasy kolonlarının üzerine eklenmiş ve membranın kuruması için 20000*g (14000 rpm)'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. İşlem sonrası kolonlar birkez daha 17000*g (13000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve kapakları açık şekilde 1.5 veya 2 ml'lik yeni tüplere aktarıldıktan sonra tüplere 50 µl AE tamponu eklenmiştir.

Oda sıcaklığında kolonlar 10 dakika inkübe edilmiş ve örnekler 6000*g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak kolonlar atılmış ve elde edilen DNA steril edilmiş tüplere aktararak muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2.5 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İkili-PCR metodu ile örnekler için DNA Kütüphanesi Miya vd. (2015), Bourlat et *al.* (2016); Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol kullanılarak hazırlanmıştır.

İndeks ve dizileme adaptörlerinin bağlanması için Illumina tarafından verilen dizilerin hedef türler için kullanılacak primerlere eklenmesi ile oluşturulan primerler kullanılmıştır. Qubit™ 3.0 Florometre ve Colibri Microvolume Spektrometre cihazları ve jel elektroforezi ile elde edilecek PCR ürünlerinin kalite ve miktarları kontrol edilerek, çoğaltılan ürünün kullanılan primer ile çoğaltılması gereken boyda olup olmadığı kontrol edilir. İstenmeyen PCR ürünleri doğru uzunluktaki ürün jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Kullanılan primerler:

Balık için 12S rRNA bölgesinin 160-190 baz çifti uzunluğundaki bölgesini hedefleyen MiFish_U_F: GTCGGTAAACTCGTGCCAGC ve MiFish_U_R: CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG primer çifti (Bradley vd. 2016);

Omurgasızlar için COI bölgesinin 313 baz çifti uzunluğundaki bölgesini hedefleyen mlCOIintF: GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC ve jgHCO2198: TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA primer çifti (Leray vd. 2013);

Omurgalıları için 16S rRNA geninin 250 baz çifti uzunluğundaki bölgesini hedefleyen Vert-16S-eDNAF1: AGACGAGAAGACCCYdTGGAGCTT ve Vert-16SeDNA-R1: GATCCAACATCGAGGTCGTAA primer çifti (Miya vd. 2015);

Mikroorganizmalar ve diğer ökaryotlar için 18S rRNA geninin 380-416 baz çifti

uzunluğundaki V4 bölgesini hedefleyen V4F (Reuk454FWD-1): CCAGCASCYGC GGTAATTCC ve V4r: ACTTTCGTTCTTGAT primer çifti ile; 335-375 baz çifti uzunluğundaki V8-V9 bölgesini hedefleyen V8f: ATAACAGGTCTGTGATGCCCT ve V8R (1510r): CCTTCYGCAGGTTACCTAC primer çifti kullanılmıştır (Vences vd. 2016).

Uygun şartlarda ve negatif kontrol kullanılarak oluşan reaksiyonların akabinde çoğaltılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 100 voltta 35 dakika süre ile yürütülmüştür. Kütüphane işlemi öncesinde örnekler pozitif kontrol sağlamak için UV görüntüleme sisteminde uygun bant boyu ve negatif kontrol, UV görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

3.2.2 Örnek havuzlarının oluşturulması

Örnekler ölçülerek konsantrasyonları 10ng/μl'ye eşitlenmiştir ve devamında her primere spesifik tüm örnekler tek bir karışımda birleştirilmiştir.

3.2.3 Kütüphane basamağı

“TruSeq Nano DNA” kütüphane hazırlama kiti (rutinde shotgun dizileme kütüphane hazırlığı basamağında kullanılan) uygun hale getirilerek kullanılmıştır (Spens vd. 2017). Özetle, indeks adaptörleri ligasyon tekniği kullanılarak DNA fragmentlerine eklenmiştir.

3.2.3.1 TruSeq nano DNA library prep kiti “Repair Ends” basamağı

ERP2 ya da ERP3 600 × g'de 5 saniye santrifüjlendikten sonra her 60 μl'lik karışıma ERP2 ya da ERP3'den 40 μl eklenmiştir. 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılarak örnekler pipetajlanmıştır. Sonra, 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg'de 1 dakika karıştırılıp 30 dakika inkübe edilerek buzun içine yerleştirilmiştir (Spens vd. 2017).

Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılıp Termal döngü cihazında ERP programı çalıştırılmıştır. Daha sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletilip termal döngü cihazından alınarak 160 µl SPB tamponu karışımlara eklenmiştir. 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılan örnekler pipetajlanmıştır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılıp örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletildikten sonra örnekler termal döngü cihazından alınarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg 'de 1 dakika karıştırılmıştır. Karışım 5-7 dakika bekletilerek manyetik stant üzerinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Sonra, 250 µl süpernatant CEP plakaya aktarılıp kalan pelet üzerine 30 µl SPS tamponu eklenmiştir. 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılarak örneklerin pipetajlanması aşamasına geçilmiştir. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılıp örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletildikten sonra termal döngü cihazından alınarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 280xg 'de 1 dakika karıştırılmıştır. Karışım 5-7 dakika bekletilerek manyetik stant üzerinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Daha sonra tüm Süpernatant alınarak 200 µl yeni hazırlanmış %80 EtOH Pelet üzerine eklenmiştir.

Manyetik stant üzerinde 30 saniye inkübe edilerek tüm süpernatant alınmış örnekler manyetik stand üzerinde 5 dakika kurutularak üzerlerine 20 µl RSB tamponu eklenmiştir.

30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılarak örneklerin pipetajlanması aşamasına geçilmiştir. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtılıp örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 30 dakika bekletildikten sonra termal döngü cihazından alınarak oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Karışım 5-7 dakika bekletilerek manyetik stant üzerinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak, 17.5 µl süpernatant ALP plakaya aktarılmıştır.

3.2.3.2 TruSeq nano DNA library prep kiti “Adenylate 3’ Ends” basamağı

Örnekler için cihazla uyumlu adaptörlü primer ve indeksleri olmadığı için adaptör ligasyon basamağı için gerekli olan 280-300 ve 100-110 baz çifti uzunluğuna eşitlenen örneklerin 3’ ucuna poli A kuyruğu eklenmiştir (Spens vd. 2017).

Akabinde, 600xg’de 5 saniye santrifüjlenen ATL ya da ATL2 tamponundan 12.5 µl örneklerin üzerine eklenerek karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm’de 2 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında pipetajlanan örnekler karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde sırasıyla 37°C’de 30 dakika ve 70°C’de 5 dakika bekletilip buz içerisine alınarak 5 dakika daha bekletilmiştir.

Önceden 100°C’ye kadar ısıtılan termal döngü kapağı işlemini, örneklerin termal döngü cihazı içerisinde 37°C’de 30 dakika, 70°C’de 5 dakika ve 4°C’de 5 dakika bekletilme aşamaları izlemiştir. Sonunda, her örneğin 30 µl karışım içermesi dikkate alınarak örnekler termal döngü cihazından alınmış ve 280xg ’de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

3.2.3.3 TruSeq nano DNA library prep kiti “Ligate Adapters” basamağı

Bu aşamada, ürünlerin flow cell üzerinde hibridizasyona hazırlanması için çoklu indeksleme adaptörleri (MiSeq cihazıyla uyumlu) DNA fragmanlarının uçlarına bağlanır (Spens vd. 2017).

Index adaptörlerin eklenmesi; (HT Kit). DAP üzerinden seal çıkartılmıştır.

DNA Adaptörler 600xg ’de 5 saniye, DAP ise 280xg ’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra plastik kapak çıkartılıp Dap barkod eklenmiştir. LIG2 tamponu -25°C’den -15°C’ye kaldırıldıktan sonra RSB, LIG2, DNA adaptör tamponlarından 2.5 µl eklenerek karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm’de 2 dakika karıştırılmış ve örnekler pipetajlanarak 280xg ’de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Örnekler, kapağı kapanmış şekilde 30°C'ye ısıtılmış karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 10 dakika bekletilip buz içerisine alınmıştır. Termal döngü kapağı 100°C'ye önceden ısıtıldıktan sonra örnekler termal döngü cihazı içerisinde 30°C'de 10 dakika bekletilip cihazdan çıkartılmıştır. Bu aşamada, örneğin 37.5 µl karışım içermesine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Örnekler üzerine 600xg 'de 5 saniye santrifüjlenen STL tamponu 5 µl kadar eklenmiştir. Sonra, örnekler karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılıp pipetajlanmış ve 280xg 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Tamamen çözününceye kadar vortekslenen (Round 1 aşaması uygulanır) SPS tamponu örnekler üzerine 42.5 µl miktarında eklenmiştir. Örnekler, karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılıp pipetajlanıp 280xg 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılıp 280xg 'de 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Örnekler tamamen çözününceye kadar manyetik stant üzerinde 2-5 dakika bekletilmiş ve tüm süpernatantları atılmıştır.

Yeni hazırlanmış 80% EtOH 200 µl miktarında pelet üzerine eklenmiş, örnekler 30 saniye manyetik stant üzerinde inkübe edildikten sonra tüm süpernatant atılmıştır. Manyetik stant üzerinde 5 dakika kurutulan örneklerin üzerine 52.5 µl RSB tamponu eklenmiştir. Sonra, örnekler karıştırıcı ısıtıcı cihazı içerisinde 1800 rpm'de 2 dakika karıştırılıp pipetajlanıp 280xg 'de 1 dakika santrifüjlenmişve oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakılarak 280xg 'de 1 dakika daha santrifüjlenmiştir. Tamamen çözününmesi için manyetik stant üzerinde 2-5 dakika bekletilen örnekler 50 µl'lik süpernatant CAP plakaya aktarılmıştır.

Bu aşama Round 2 protokolü uygulanarak tekrarlanmıştır (SPB tamponu 50 µl, RSB tamponu 27.5 µl eklenir) ve PCR plaka kuyularına 25 µl'lik süpernatant aktarılmıştır.

3.2.4 Yeni nesil dizileme

Sonrasında MiSeq kullanılarak 2×250 bp baz çiftlik (bç) paired-end dizileme işlemi başlatılmıştır. Dizileme iş akışının bir parçası olan küme oluşumu için kitaplık, parçaların kitaplık adaptörlerini tamamlayıcı bir yüzeye bağlı oligolar dizisi üzerinde yakaladığı bir akış hücresine yüklenir. Her parça daha sonra köprü amplifikasyonu yoluyla farklı klonal kümeler halinde yükseltilir. Küme oluşturma işlemi tamamlandığında, örnekler dizilemeye hazırdır. Illumina SBS teknolojisi, DNA şablon ipliklerine dahil edildiklerinde tek bazları saptayan, tescilli bir tersine çevrilebilir sonlandırıcı tabanlı yöntemden istifade eder. Dört aşamalı ve tersine çevrilebilir sonlandırıcıya bağlı dNTP'ler her sıralama döngüsünde mevcut olduğundan, doğal rekabet, birleştirme sapmasını en aza indirir ve diğer teknolojilere kıyasla ham hata oranlarını büyük ölçüde azaltır. Sonuç, tekrarlayan dizi bölgeleri ve homopolimerler içinde bile dizi bağlamına özgü hataları neredeyse tamamen ortadan kaldıran son derece doğru, baz baz ilerleyen bir dizilemedir (Spens vd. 2017).

3.2.5 Biyoinformatik analizler

Miya vd. (2015) tarafından geliştirilen ve paylaşılan biyoinformatik iş akışı farklı primer ve organizmalara göre düzenlenerek kullanılmıştır. Gerekli betikler “<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.n245j>” adresinden sağlanabilmektedir. İş akışında kullanılan “FastQC”, “FLASH” ve “ncbi-blast” programları ise ücretsiz olarak indirilip kullanılabilmektedir.

MiSeq cihazından “.fastq” formatında çıkan dizilerin kaliteleri ve bu dizilerle ilgili ana istatistikler FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) programı ile kontrol edilmiştir.

Dizilerin düşük kaliteli olan uç kısımları SolexaQA (Cox et al. 2010) yazılım paketinde bulunan DynamicTrim.pl betiği ile minimum 10 Phred skoru (=10-1 hata oranı) eşiği belirlenerek kesilmiştir (Ewing vd. 1998). Uç bölgeler temizlendikten sonra eşleşen ileri

ve geri diziler FLASH (Magoc ve Salzberg, 2011) programı ve minimum 10 bazlık örtüşme eşiği belirlenerek birleştirilmiştir. Birleştirilen dizilerden belirsiz baz okumalarına sahip olanlar (N) veya beklenen PCR amplikon farklı uzunluğa sahip olanlar çeşitli Perl betikleri kullanılarak temizlenmiştir. TAGCLEANER (Schmieder vd. 2010) programı ile primer dizileri, maksimum üç yanlış eşleşmeye izin verilerek temizlenmiştir. Ön işlemlerden geçirilen ve filtrelenen dizilerle ilgili istatistikler çeşitli bash komutları kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3 Tür Tespiti

UCLUST (Edgar, 2010) algoritmasında bulunan 'derep_fulllength' komutu ile tekrarlı diziler temizlenerek, tekrar sayıları FASTA dosyasının başlık satırına eklenmiştir. Tekrar sayısı 10'dan az olan diziler UCLUST (Edgar, 2010) algoritmasında bulunan 'usearch_global' komutu kullanılarak, 10'dan fazla tekrarı bulunan dizilerle hizalanmış ve bunlardan herhangi biri ile 99% (1 veya 2 yanlış eşleşme) benzerlik göstermesi durumunda ilgili dizinin tekrarı olarak sınıflandırılmıştır. Bu basamağın amacı, dizileme / PCR hatalarına veya popülasyonlardaki gerçek nükleotid varyasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösteren dizilerin, veri setinden çıkmamasını sağlamaktır. İşlenen diziler, önceden indirilip hazırlanan NCBI yerel veri tabanları ile local BLASTN (Camacho vd. 2009) programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Minimum % 97 dizi benzerliği ve maksimum 10-5 E-value değerine sahip olan en iyi BLAST eşleşmesi, ilgili dizilere atanmıştır. Farklı eşik değerleri denenerek, farklı parametrelerin tür tespitini nasıl etkilediği incelenmiştir.

Tür tespitinin güvenilirliği, toplam hizalama uzunluğunun referans ve eldeki diziler arasındaki yanlış eşleşme sayılarına oranının incelenmesi ile değerlendirilmiştir. Örneğin 250 baz çifti uzunluğundaki bir amplikonun bir adet yanlış eşleşme ile en iyi BLAST eşleşmesine atanması (250/1+1) olarak hesaplanır. Bu işlem en iyi iki BLAST eşleşmesi için hesaplanarak, bu oranlar arasında LOD (Log of odds) skoru belirlenir ve bu değer ile tür tespitinin güvenilirliği kontrol edilir. Bu iş akışının sonunda BLAST sonuçları, tür ismi, genel isim, toplam okuma sayısı ve dizilerin olduğu bir tablo formatında elde edilmiştir.

3.4 Risk Analiz Değerlendirmeleri

Türlerin potansiyel istila risklerinin değerlendirilmesi henüz geliştirilerek uygulamaya sokulan AS-ISK (Aquatic Species Invasiveness Scoring Kit) adıyla güncellenen bir program vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yeni program sadece balık değil bütün organizma gruplarını (bitki, omurgasız, balık vb.) ve bütün olası çevreleri (deniz, tatlısu, acısu) de içine alacak şekilde düzenlenmiştir. Bununla beraber program şimdiye kadar Türkçeyi de içine alan birçok dile çevrilmiştir. Bu uygulama toplamda 55 tane soruyu ve her soru için sorulara verilen cevapların güvenilirlik bilgilerini içermektedir. Söz konusu sorular türlerin biyocoğrafyaları, istila geçmişleri, biyoloji ve ekolojileri ile istenmeyen özelliklerinin olup olmadıkları hakkındadır. Bu sorulara verilen cevaplar sayısal olarak sınıflandırılır (bu sayı genelde -1 ile 2 arasında değişir) ve bütün sorular cevaplandığında her sorunun karşılığı olan değere göre toplam bir sayısal değer elde edilir. Elde edilen bu sayıya göre test edilen tür bir risk kategorisine konur. Bu kategoriler “yüksek”, “orta” ve “düşük” risk olarak ayrılır. Ortalama değerlerin “1” in altında çıkması analiz edilen türün herhangi bir risk içermediğini gösterir. En uygun skor çıktıları ve Türkiye için bir eşik değeri Receiver Operating Characteristic (ROC) analizine (Bewick vd., 2004) göre hesaplanır ve bu eşik değerin üzeri yüksek risk olarak kabul edilir. Tür bazında elde edilen değerlerin bu eşik değerin ne kadar üstünde olduğuna göre de orta derecede, yüksek ve çok yüksek risk olarak sınıflandırılmaktadır. Bu risk değerlerine göre türlerin ülkeye girişlerinin ve ülke içi taşınımalarının kontrol altına alınmasına ve izlenmesine karar verilebilir. Çalışma kapsamında, eDNA metabarkodlama ile tespit edilen türler üzerine AS-ISK uygulanmış ve sonuçlar belirlenen kriterlere göre değerlendirilmiştir. AS-ISK analizi bir Excel programı uygulaması yoluyla gerçekleştirilmiştir. Program ücretsiz olarak internet üzerinden indirilebilmektedir; (<http://www.cefas.defra.gov.uk/our-science/ecosystems-and-biodiversity/non-native-species/decision-support-tools.aspx>).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Primer Sonuçları

Bu tez çalışmasına ilişkin balast analizlerinin genişletilmiş sonuçları;

- 12s: balık/omurgalı
- 16s: omurgalı
- COI: omurgasız
- 18sv4: ökaryot (plankton/alg/diatom)
- 18sv8: ökaryot (plankton/alg/diatom)

olarak 5 ayrı primer ile 5 ayrı sekmede düzenlenmiş ve aşağıda çizelgeler halinde verilmiştir.

Çizelgeler incelendiğinde, sonuçların sadece hedef grupları değil hedef grup dışındaki canlılara ilişkin de sonuçları içerdiği görülmektedir. Hedef dışı yüzdeler araştırma için önem arzetmekte olup tartışma bölümünde bu konuya daha detaylı değinilmiştir.

Ayrıca; siyah ile yazılı olan türler veri setinde en az 10 okumaya sahip olup referans tür dizisi ile %97 ve daha fazla eşleşme gösteren türlerdir. Mavi ile yazılı olanlar ise 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler olup daha tartışmalı sonuçlara sahiptir.

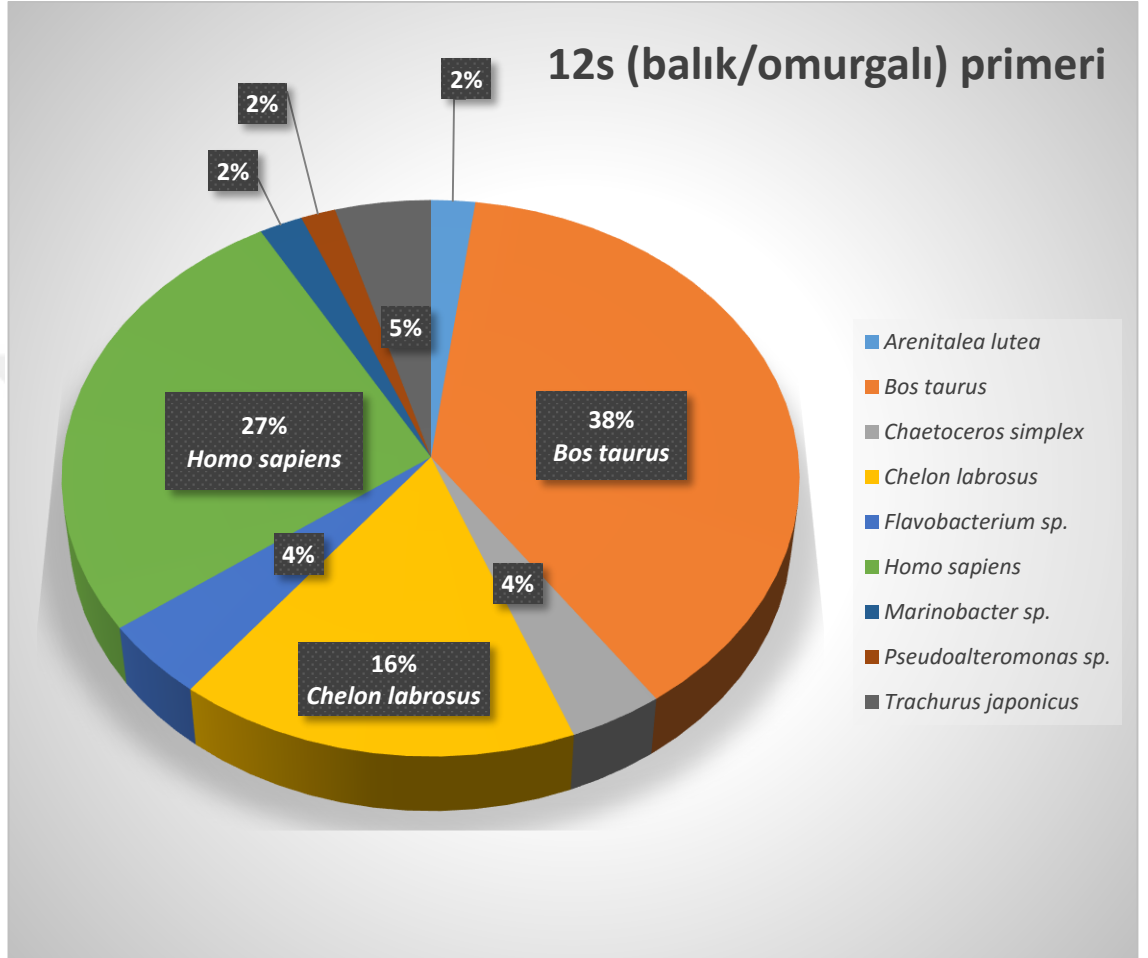
Çizelge 4.1' de yer alan 12s (balık/omurgalı) primeri sonuçlarına göre 44 adet farklı tür tespit edilmiş olup bunların 38 adedi hedef gruba dahilken, 6 adedi 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler yani şüpheli okuma olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 12s (balık/omurgalı) primeri sonuçları

Tür ismi	Okuma sayısı	Tür
<i>Actinobacteria bacterium</i>	49	Bakteri -
<i>Arenibacter algicola</i>	29	Bakteri -
<i>Arenitalea lutea</i>	1399	Flavo bakteri
<i>Arripis trutta</i>	500	Balık
<i>Bacillus sp.</i>	28	Bakteri +
<i>Bacterium enrichment</i>	15	Bakteri
<i>Bos taurus</i>	25751	Sığır
<i>Chaetoceros simplex</i>	2598	Diatom
<i>Chelon labrosus</i>	11054	Balık
<i>Congregibacter litoralis</i>	19	Bakteri -
<i>Craurococcus roseus</i>	14	Bakteri +
<i>Croceitalea sp.</i>	51	Bakteri
<i>Dokdonia sp.</i>	23	Flavo bakteri
<i>Flavobacterium sp.</i>	2985	Flavo bakteri
<i>Gaetbulibacter marinus</i>	17	Bakteri -
<i>Gamma proteobacterium</i>	336	Bakteri
<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>	93	Bakteri -
<i>Homo sapiens</i>	18092	İnsan
<i>Hyunsoonleella sp.</i>	14	Flavo bakteri
<i>Lacinutrix gracilariae</i>	115	Bakteri -
<i>Leisingera sp.</i>	647	Bakteri
<i>Lepidotrigla kanagashira</i>	2	Balık
<i>Lepidotrigla microptera</i>	67	Balık
<i>Lissotriton vulgaris</i>	1	Semender
<i>Mangifera indica</i>	135	Bitki (Mango)
<i>Maribacter sp.</i>	95	Flavo bakteri
<i>Marine bacterium</i>	47	Bakteri
<i>Marinobacter salsuginis</i>	194	Bakteri -
<i>Marinobacter sp.</i>	1385	Bakteri
<i>Nostoc sp.*</i>	241	Siyano Bakteri
<i>Planctomycete MSF145</i>	827	Bakteri
<i>Prosthecobacter algae</i>	14	Bakteri
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	1102	Bakteri
<i>Pseudomonas sp.</i>	446	Bakteri
<i>Psychroserpens damuponensis</i>	903	Bakteri -
<i>Psychroserpens sp.</i>	74	Flavo bakteri
<i>Roundia cardiophora</i>	23	Diatom
<i>Sulfitobacter dubius</i>	14	Bakteri
<i>Tamlana nanhaiensis</i>	1794	Bakteri
<i>Thalassomonas sediminis</i>	158	Bakteri
<i>Trachurus japonicus</i>	3045	Balık (Japon istavriti)
<i>Trachurus trachurus</i>	3	Balık (Karagöz İstavrit)
<i>Verrucomicrobiae bacterium</i>	65	Bakteri -
<i>Winogradskyella sp.</i>	239	Flavo bakteri

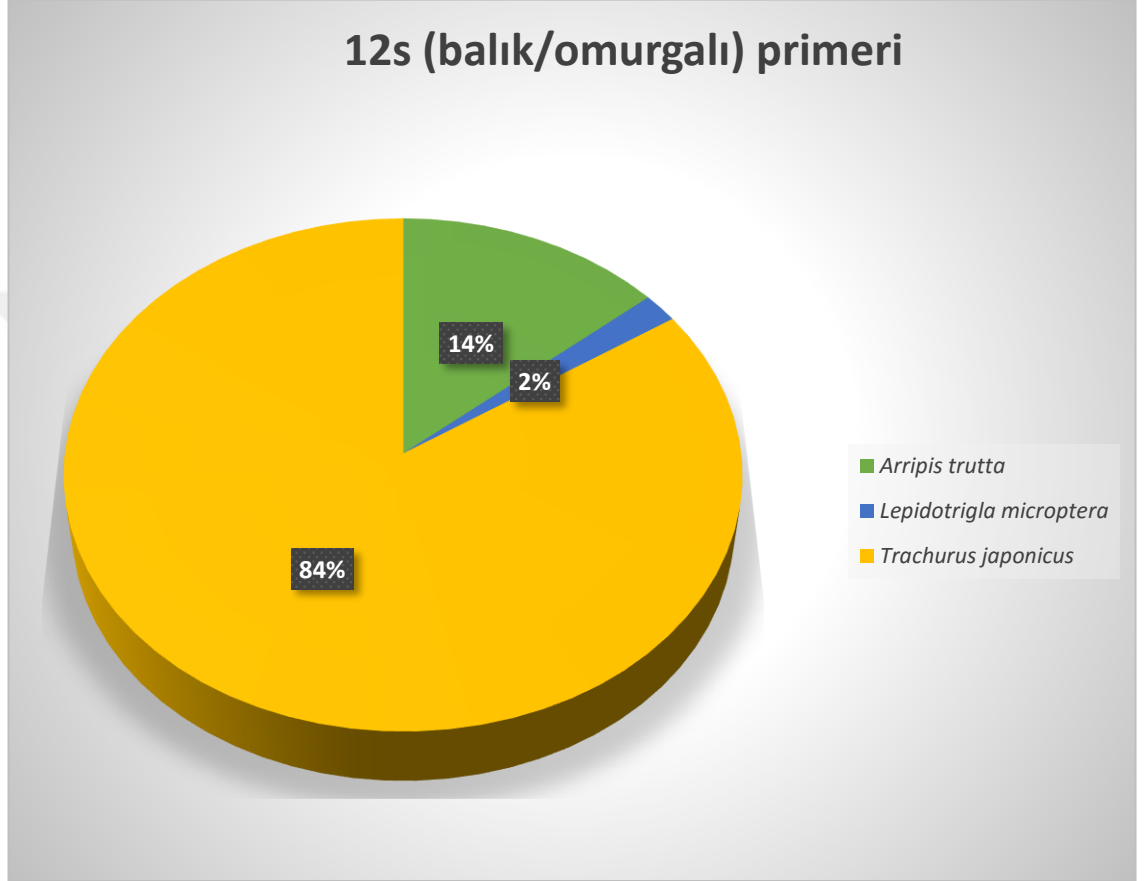
* İstilacı Tür

Aşağıda (Şekil 4.1) balık/omurgalı 12s primer okuma yüzdelere ait sonuçlar dilim grafik şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.1 12s primer okuma yüzdeleri

Aşağıda (Şekil 4.2) 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren balık/omurgalı 12s primer okuma yüzdelere ait sonuçlar dilim grafik şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.2 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren canlıların 12s primer okuma yüzdeleri

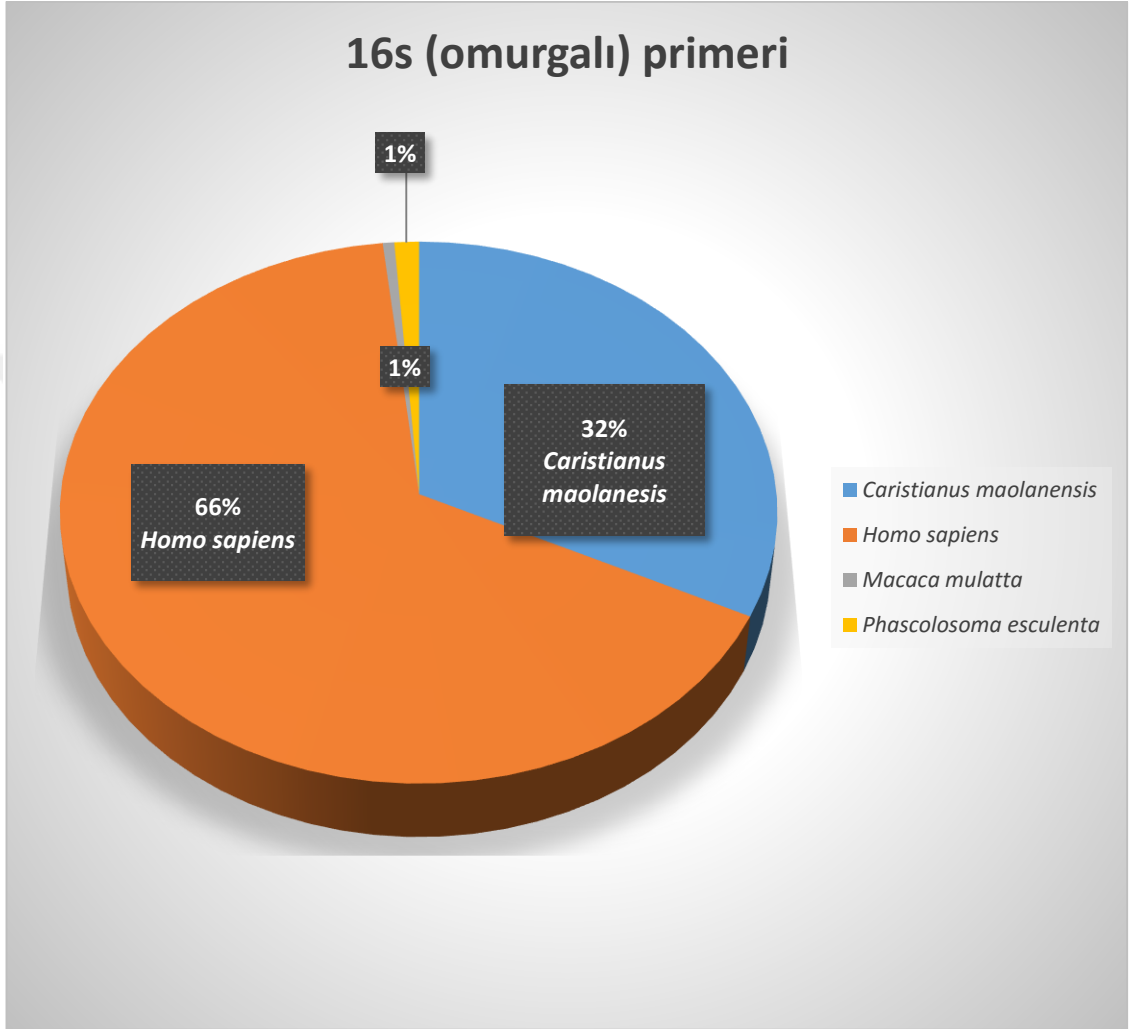
Çizelge 4.2' de yer alan 16s (omurgalı) primeri sonuçlarına göre 19 adet farklı tür tespit edilmiş olup bunların 2 adedi hedef gruba dahilken, 17 adedi 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler yani şüpheli okuma olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 16s (omurgalı) primeri sonuçları

Tür ismi	Okuma sayısı	Tür
<i>Archiaphyosemion guineense</i>	3	Balık
<i>Arnoglossus laterna</i>	1	Balık
<i>Boops boops</i>	1	Balık
<i>Brachionus urceolaris</i>	2	Rotifer
<i>Caristianus maolanensis</i>	130608	Böcek
<i>Chiropotes albinasus</i>	4	Maymun
<i>Craterium leucocephalum</i>	7	Mantar
<i>Ctenopoma kingsleyae</i>	1	Balık
<i>Daphnia tibetana</i>	1	Kabuklu
<i>Homo sapiens</i>	267354	İnsan
<i>Hydrictis maculicollis</i>	55	Su samuru
<i>Macaca mulatta</i>	2233	Hint Şebeği
<i>Pelophylax caralitanus</i>	1	Kurbağa
<i>Phascolosoma esculenta</i>	4793	Deniz solucanı
<i>Pongo abelii</i>	882	Sumatra orangutanı
<i>Scapholeberis mucronata</i>	11	Kabuklu
<i>Scriptaphyosemion schmitti</i>	1	Balık
<i>Solea ovata</i>	1	Balık
<i>Sphyraena sphyraena</i>	1	Balık

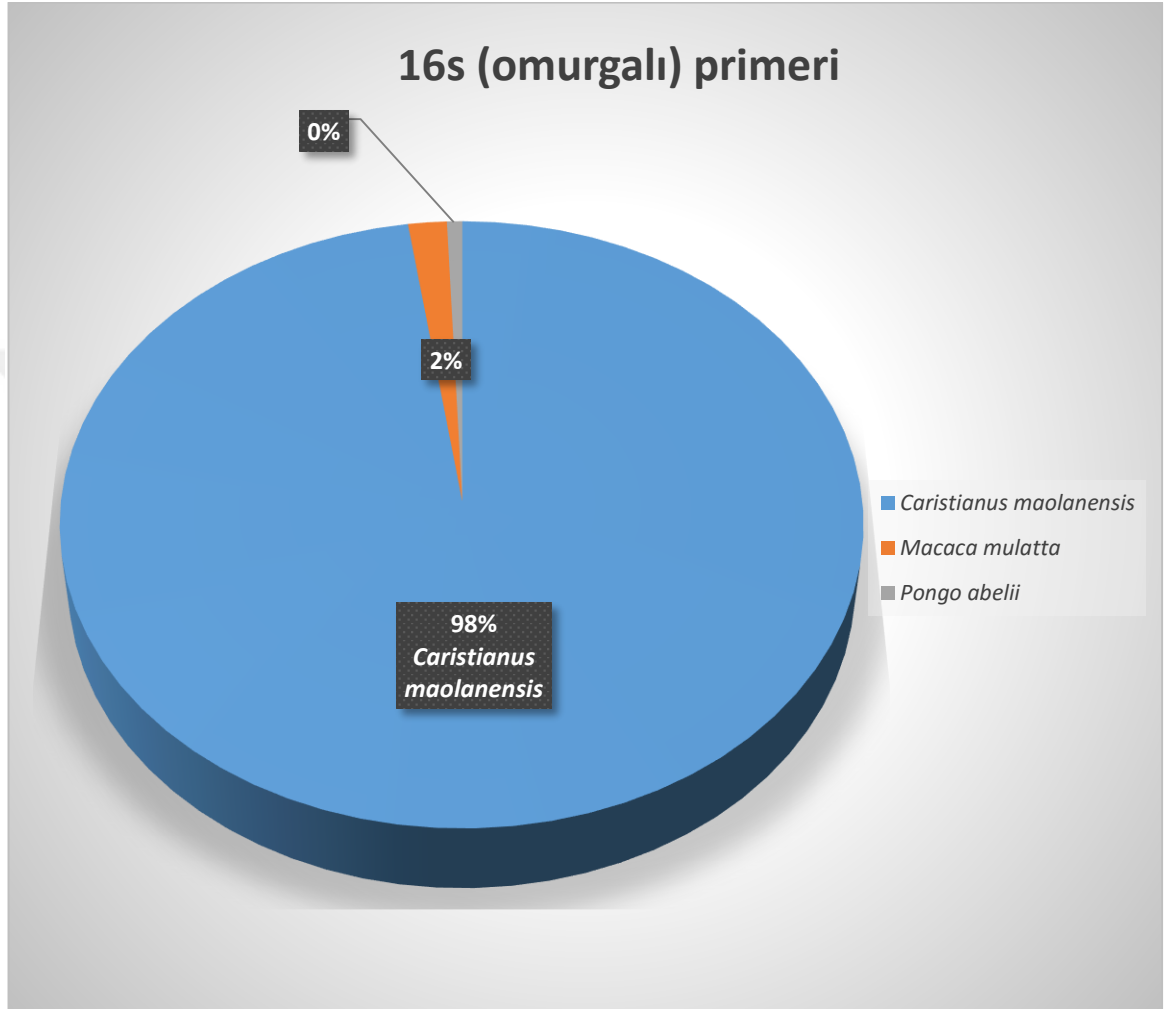
*İstilacı Tür

Aşağıda (Şekil 4.3) omurgalı 16s primer okuma yüzdelerine ait sonuçlar dilim grafik şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.3 16s primer okuma yüzdeleri

Aşağıda (Şekil 4.4) 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgalı 16s primer okuma yüzdelerine ait sonuçlar dilim grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.4 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgalı 16s primer okuma yüzdeler

Çizelge 4.3' de yer alan coi (omurgasız) primeri sonuçlarına göre 93 adet farklı tür tespit edilmiş olup bunların 14 adedi hedef gruba dahilken, 79 adedi 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler yani şüpheli okuma olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 coi (omurgasız) primeri sonuçları

Tür ismi	Okuma sayısı	Tür
<i>Absala dorcada</i>	1	Güve
<i>Actinopyga echinites</i>	169	Deniz hıyarı
<i>Aglaophenia octodonta</i>	11	Cnidania Hydrozoa
<i>Aglaophenia tubulifera</i>	1	Cnidania Hydrozoa
<i>Aporandria specularia</i>	5	Güve
<i>Asplanchna intermedia</i>	60	Rotifer
<i>Asplanchna sieboldi</i>	2	Rotifer
<i>Azadinium dalianense</i>	26	Dinoflagellat
<i>Blastocladiella emersonii</i>	460	Mantar
<i>Bos taurus</i>	1	Sığır
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	739	Bakteriyel flagellat
<i>Candida auris</i>	1	Maya
<i>Candida intermedia</i>	9	Maya
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	Maya
<i>Candida sake</i>	1	Maya
<i>Carcinopsis sp.</i>	3	Böcek
<i>Chrysochromulina tobinii</i>	234	Su yosunu
<i>Clydonella sawyeri</i>	547	Amip
<i>Codonium proliferum</i>	1	Cnidania Hydrozoa
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	3	Mantar
<i>Cyanea nozakii</i>	1	Deniz anası
<i>Cyclopoida environmental</i>	44	Kopepod
<i>Cylindrotheca closterium</i>	7	Diatom
<i>Didymium iridis</i>	9	Küf
<i>Dinoderus bifoveolatus</i>	321	Böcek
<i>Dolichomastix tenuilepis</i>	2	Yeşil alg
<i>Fistulifera solaris</i>	10	Diatom
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	Mantar
<i>Galactomyces candidum</i>	327	Maya
<i>Geotrichum candidum</i>	507	Maya
<i>Globisporangium acanthophoron</i>	13	Mantar
<i>Glossiphonia concolor</i>	4	Parazit kurt
<i>Gonium pectorale</i>	4	Yeşil alg
<i>Gorilla beringei</i>	13	Doğu gorili
<i>Haliphus fasciatus</i>	4	Böcek
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	660	DiNoflagellat
<i>Homo sapiens</i>	277	İnsan
<i>Hordeum vulgare</i>	9	Arpa
<i>Hypochilus bonneti</i>	10	Örümcek

Çizelge 4.3 coi (omurgasız) primeri sonuçları (devam)

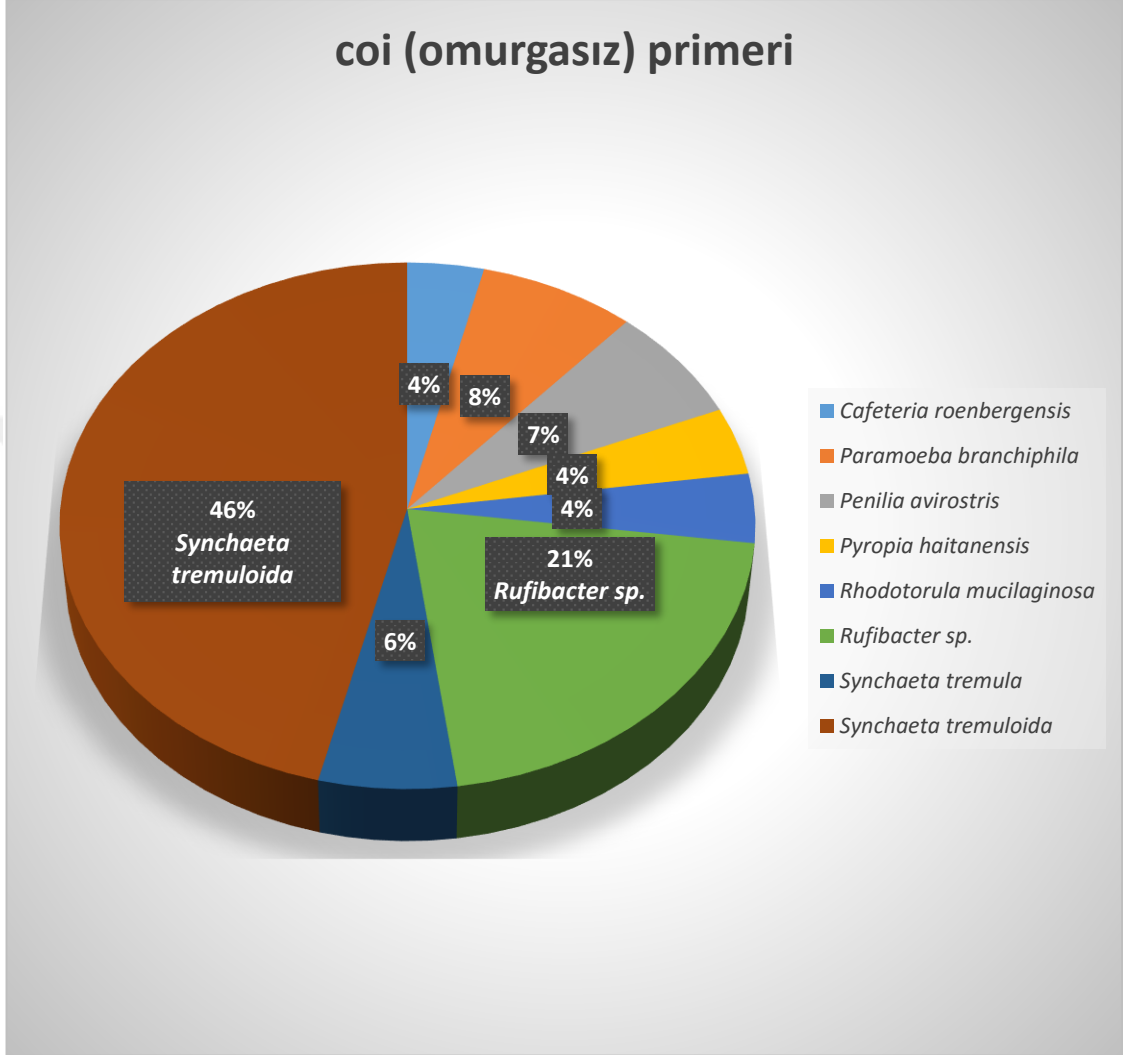
<i>Lichtheimia ramosa</i>	8	Mantar
<i>Lizzia blondina</i>	10	Cnidaria Hydrozoa
<i>Lytocarpia myriophyllum</i>	1	Cnidaria Hydrozoa
<i>Malassezia globosa</i>	73	Mantar
<i>Maribacter sp.</i>	41	Bakteri
<i>Minutocellus polymorphus</i>	14	Diatom
<i>Neoparamoeba sp.</i>	115	Amip
<i>Nitzschia frustulum</i>	1	Diatom
<i>Maribacter sp.</i>	41	Bakteri
<i>Minutocellus polymorphus</i>	14	Diatom
<i>Neoparamoeba sp.</i>	115	Amip
<i>Nitzschia frustulum</i>	1	Diatom
<i>Nitzschia palea</i>	5	Diatom
<i>Pan troglodytes</i>	29	Şempanze
<i>Paramoeba branchiphila</i>	1515	Parazit
<i>Paramoeba perurans</i>	44	Amip
<i>Paravannella minima</i>	42	Amip
<i>Penaeus vannamei</i> *	5	Karides
<i>Penilia avirostris</i>	1392	Kabuklu
<i>Phaeocystis pouchetii</i>	11	Alg
<i>Phoma sp.</i>	1	Mantar
<i>Phytophthora boehmeriae</i>	6	Mantar
<i>Phytophthora cajani</i>	15	Mantar
<i>Phytophthora moyootj</i>	16	Mantar
<i>Pichia kudriavzevii</i>	349	Maya
<i>Plecotus auritus</i>	2	Yarasa
<i>Plecotus ognevi</i>	2	Yarasa
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	4	Mantar
<i>Pongo abelii</i>	28	Sumatra orangutanı
<i>Prorocentrum micans</i> *	54	Dinoflagellat
<i>Pseudoceratina purpurea</i>	2	Sünger
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	9	Mantar
<i>Pseudopedobacter saltans</i>	7	Bakteri
<i>Pyropia haitanensis</i>	813	Kırmızı alg
<i>Pythium biforme</i>	5	Mantar
<i>Pythium emineosum</i>	150	Mantar
<i>Rhagoletis zephyria</i>	11	Meyve sineği
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	831	Mantar
<i>Rhopilema Nomadica</i> *	62	Deniz anası
<i>Rufibacter sp.</i>	4055	Bakteri
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Mantar

Çizelge 4.3 coi (omurgasız) primeri sonuçları (devam)

<i>Scapholeberis mucronata</i>	60	Kabuklu
<i>Schizophyllum commune</i>	26	Mantar
<i>Scrippsiella precaria</i>	41	Dinoflagellat
<i>Selenops sp.</i>	30	Örümcek
<i>Shiraia bambusicola</i>	1	Mantar
<i>Squamamoeba japonica</i>	51	Amip
<i>Symbiodinium sp.</i>	1	Mikroalg
<i>Synchaeta oblonga</i>	15	Rotifer
<i>Synchaeta tremula</i>	1181	Rotifer
<i>Synchaeta tremuloida</i>	9012	Rotifer
<i>Taphrina wiesneri</i>	10	Bitki patojeni
<i>Thecamonas trahens</i>	185	Bakteri
<i>Tremella fuciformis</i>	673	Mantar
<i>Trichoderma hamatum</i>	1	Mantar
<i>Tristramella simonis</i>	49	Balık
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	8	Mantar
<i>Vexillifera sp.</i>	350	Amip

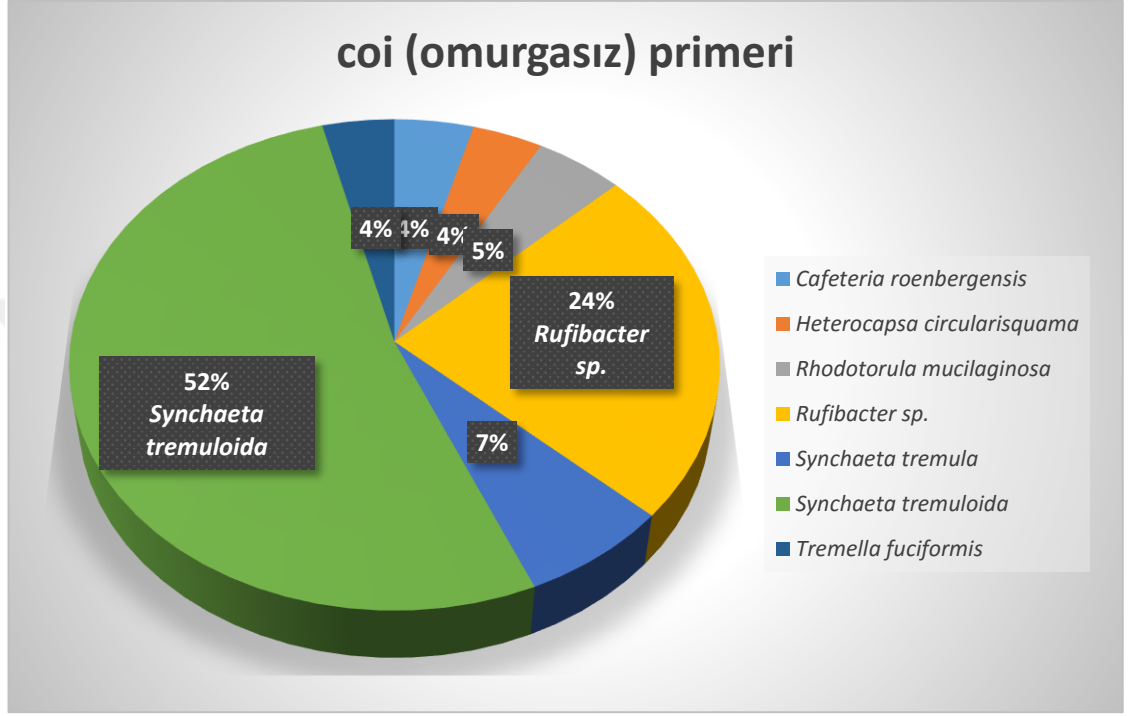
*İstilacı Tür

Aşağıda (Şekil 4.5)'de COI (omurgasız) primer okuma yüzdelere ait sonuçlar dilim grafik şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.5 coi primer okuma yüzdeleri

Aşağıda (Şekil 4.6) 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgasız coi primer okuma yüzdelerine ait sonuçlar dilim grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.6 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren omurgasız coi primer okuma yüzdeleri

Çizelge 4.4'de yer alan 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçlarına göre 241 adet farklı tür tespit edilmiş olup bunların 55 adedi hedef gruba dahilken, 186 adedi 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler yani şüpheli okuma olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları

Tür isimleri	Okuma sayısı	Tür
<i>Acanthocorbis unguiculata</i>	1	Yakalı kamçılı
<i>Acanthoecca sp.</i>	4	Yakalı kamçılı
<i>Acanthoecca spectabilis</i>	52	Yakalı kamçılı
<i>Adriamonas peritocrescens</i>	4793	Flagellat
<i>Alexandrium andersonii</i>	641	Dinoflagellat
<i>Alexandrium margaelefii</i>	328	Dinoflagellat
<i>Alexandrium minutum *</i>	49	Dinoflagellat (Toksik) siyah
<i>Alphamonas edax</i>	4	Flagellat
<i>Amastigomonas debrynei</i>	105	Omurgasız
<i>Amastigomonas mutabilis</i>	15	Omurgasız
<i>Amastigomonas sp.</i>	916	Omurgasız
<i>Amoebophrya sp.</i>	588	Dinoflagellat
<i>Amphora proteus</i>	1	Diatom
<i>Ancyromonas atlantica</i>	16	Tek hücreli
<i>Anomopus telphusae</i>	10	Rotifer
<i>Ansanella granifera</i>	85	Dinoflagellat
<i>Aplanochytrium sp.</i>	39	Parazit
<i>Aplanochytrium sp.</i>	2739	Parazit
<i>Aplanochytrium stocchino</i>	3	Parazit
<i>Armandia maculata</i>	1	Deniz Kurdu
<i>Assulina muscorum</i>	1	Su yosunu
<i>Aurantiochytrium sp.</i>	64	Tek hücreli
<i>Bacteriastrum elegans</i>	3	Diatom
<i>Barnettozyma hawaiiensis</i>	3	Maya
<i>Bicosoeca kenaiensis</i>	1	Flagellat
<i>Bicosoeca vacillans</i>	80	Flagellat
<i>Biecheleria brevisulcata</i>	264	Dinoflagellat
<i>Biecheleria sp. gym</i>	15	Dinoflagellat
<i>Blastocystis hominis</i>	3	Su yosunu
<i>Blastocystis sp.</i>	1	Su yosunu
<i>Bodomorpha sp.</i>	58	Su yosunu
<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	4	Bakteri
<i>Caecitellus parvulus</i>	84	Flagellat
<i>Cafeteria biegae</i>	25	Nanoflagellat
<i>Cafeteria chilensis</i>	103	Nanoflagellat
<i>Cafeteria graefae</i>	336	Nanoflagellat
<i>Cafeteria maldiviensis</i>	3	Nanoflagellat
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	2108	Bakteriyel flagellat
<i>Cafeteria sp.</i>	11	Nanoflagellat
<i>Candida plutei</i>	10	Maya

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Candida] Nrvegica</i>	3	Mantar
<i>Cedecea neteri</i>	2	Bakteri
<i>Cerataulina pelagica</i>	93	Diatom
<i>Cercomonas elliptica</i>	1	Su yosunu
<i>Cercomonas parincurva</i>	4	Su yosunu
<i>Cercomonas plasmodialis</i>	2	Su yosunu
<i>Cercozoa sp.</i>	112	Su yosunu
<i>Chaetoceros anastomosans</i>	1	Diatom
<i>Chaetoceros atlanticus</i>	2	Diatom
<i>Chaetoceros costatus</i>	9	Diatom
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	20	Diatom
<i>Chaetoceros neogracilis</i>	11	Diatom
<i>Chaetoceros sp.</i>	806	Diatom
<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	551	Diatom
<i>Chelonemonas masanensis</i>	286	Kamçılı Ökaryot
<i>Chlamyaster sterna</i>	6	Ökaryot
<i>Chrysochromulina rotalis</i>	14	Yosun Kürsüsü
<i>Chrysochromulina sp.</i>	23	Yosun Kürsüsü
<i>Chrysosolepidomonas sp.</i>	27	Alg
<i>Chrysophyceae sp.</i>	17	Alg
<i>Clavispora fructus</i>	2	Maya
<i>Clavispora lusitaniae</i>	79	Maya
<i>Cocconeis pediculus</i>	4	Diatom
<i>Collozoum inerme</i>	3	Su yosunu
<i>Colpodella pontica</i>	2	Karnivor Flagellat
<i>Colpodella sp.</i>	3	Karnivor Flagellat
<i>Colpodella tetrahymenae</i>	6	Karnivor Flagellat
<i>Comamonas sp.</i>	44	Bakteri -
<i>Crustomastix sp.</i>	4	Alg
<i>Cryothecomonas aestivalis</i>	3	Su yosunu
<i>Cryothecomonas sp.</i>	61	Su yosunu
<i>Cryptosporidium struthionis</i>	1	Parazit
<i>Culex brethesi</i>	6	Sinek
<i>Curvibasidium sp.</i>	37	Bazitli Mantar
<i>Developayella elegans</i>	246	Flagellat
<i>Develorapax marinus</i>	1	Su yosunu
<i>DiaphaNoeca sphaerica</i>	47	Yakalı kamçılı
<i>DiaphaNoeca spiralifurca</i>	225	Yakalı kamçılı
<i>DiaphaNoeca undulata</i>	31	Yakalı kamçılı
<i>DiNobryon cf. Sociale</i>	2	Alg
<i>DiNobryon ningwuensis</i>	5	Alg
<i>Ditylum brightwellii</i>	1	Diatom
<i>Duboscquella sp.</i>	5	Parazit

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Durinskia cf. baltica</i>	6	Dinoflagellat
<i>Ebria tripartita</i>	35	Su yosunu
<i>Eburneopus eclecticus</i>	1	Eklembacaklı
<i>Enibas tolerabilis</i>	9	Yakalı kamçılı
<i>Ensiculifera imariensis</i>	14	Dinoflagellat
<i>Entophlyctis sp.</i>	12	Mantar
<i>Eucampia groenlandica</i>	183	Diatom
<i>Euduboscquella crenulata</i>	6	Dinoflagellat
<i>Extubocellulus cupola</i>	28	Diatom
<i>Extubocellulus spinifer</i>	7	Diatom
<i>Exuviaella pusilla</i>	45	Dinoflagellat
<i>Flabellula sp.</i>	6	Amip
<i>Flamella arnhemensis</i>	2	Amip
<i>Flamella piscinae</i>	4	Amip
<i>Galactomyces citri-aurantii</i>	32	Maya
<i>Geotrichum candidum</i>	547	Maya
<i>GeraNomyces variabilis</i>	15	Mantar
<i>Goniomonas aff. Amphinema</i>	5	Nanoflagellat
<i>Goniomonas amphinema</i>	10	Nanoflagellat
<i>Goniomonas pacifica</i>	1	Nanoflagellat
<i>Goniomonas sp.</i>	548	Nanoflagellat
<i>Gonyaulax cf. Spinifera</i>	1	Dinoflagellat
<i>Gonyaulax polygramma</i>	15	Dinoflagellat
<i>Gotoius excentricus</i>	3	Dinoflagellat
<i>Guinardia delicatula</i>	4	Diatom
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7	Maya
<i>Hartmannella abertawensis</i>	246	Amip
<i>Hartmannella abertawensis</i>		
<i>Helgoeca nana</i>	84	Kamçılı Ökaryot
<i>Homo sapiens</i>	357	İnsan
<i>Incisomonas marina</i>	144	Flagellat
<i>Karlodinium veneficum</i>	4204	Dinoflagellat
<i>Katablepharis japonica</i>	13	Alg
<i>Kazachstania africana</i>	24	Mantar
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	179	Maya
<i>Kluyveromyces sp.</i>	215	Maya
<i>Labyrinthulochytrium haliotidis</i>	220	Mantar
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	5	Hayvan
<i>Leptocylindrus convexus</i>	80	Diatom
<i>Leptocylindrus danicus</i>	1	Diatom
<i>Lingulamoeba sp.</i>	8	Amip
<i>Lithodesmioides polymorpha</i>	6	Diatom

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Malacoceros fuligiNusus</i>	2	Halkalı solucan
<i>Malassezia globosa</i>	2	Mantar
<i>Mantamonas plastica</i>	135	Flagellat
<i>Massisteria marina</i>	4737	Su yosunu
<i>Massisteria sp.</i>	22	Su yosunu
<i>Massisteria voersi</i>	30	Su yosunu
<i>Metromonas simplex</i>	31	Amip
<i>Microcaecilia unicolor</i>	1	Amfibi
<i>Micrometopion nutans</i>	83	Amfibi
<i>MiNorisa minuta</i>	69	Plankton
<i>MoNorhizochytrium globosum</i>	170	Alg
<i>MoNosiga brevicollis</i>	1	Kamçılı Ökaryot
<i>Navicula trivialis</i>	12	Diatom
<i>Neocercomonas sp.</i>	2	Su yosunu
<i>Nolandella sp.</i>	363	Amip
<i>Notommata cordonella</i>	2289	Rotifer
<i>Ovulinata parva</i>	20	Su yosunu
<i>Parabirojimia similis</i>	19	Su yosunu
<i>Paraphysomonas butcheri</i>	153	Alg
<i>Paraphysomonas mikadiforma</i>	113	Alg
<i>Paraphysomonas sp.</i>	105	Alg
<i>Parvicardium exiguum</i>	5	Midye
<i>Paulinella micropora</i>	1	Su yosunu
<i>Pectinaria koreni</i>	61	Trompet solucanı
<i>Perideraion elongatum</i>	2	Diatom
<i>Philodina sp.</i>	14	Rotifer
<i>Pichia fermentans</i>	71	Maya
<i>Pichia kudriavzevii</i>	217	Maya
<i>Picomonas judraskeda</i>	42	Plankton
<i>Pierrecomperia catenuloides</i>	22	Diatom
<i>Pirsonia guinardiae</i>	58	Parazit
<i>Plagiopyliella pacifica</i>	27	
<i>PlaNomonas brevis</i>	2	Flagellat
<i>PlaNomonas elongata</i>	62	Flagellat
<i>PlaNomonas micra</i>	17	Flagellat
<i>Platyophrya bromelicola</i>	10	Su yosunu
<i>Polarella glacialis</i>	2	Dinoflagellat
<i>Polykrikos kofoidii</i>	1	Dinoflagellat
<i>Polyoeca dichotoma</i>	1	Kamçılı Ökaryot
<i>Prorocentrum mexicanum*</i>	62	Dinoflagellat (Toksik tür, 2004'de Akdeniz'de tespit edilmiştir.)
<i>Prorocentrum triestinum</i>	53124	Dinoflagellat

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

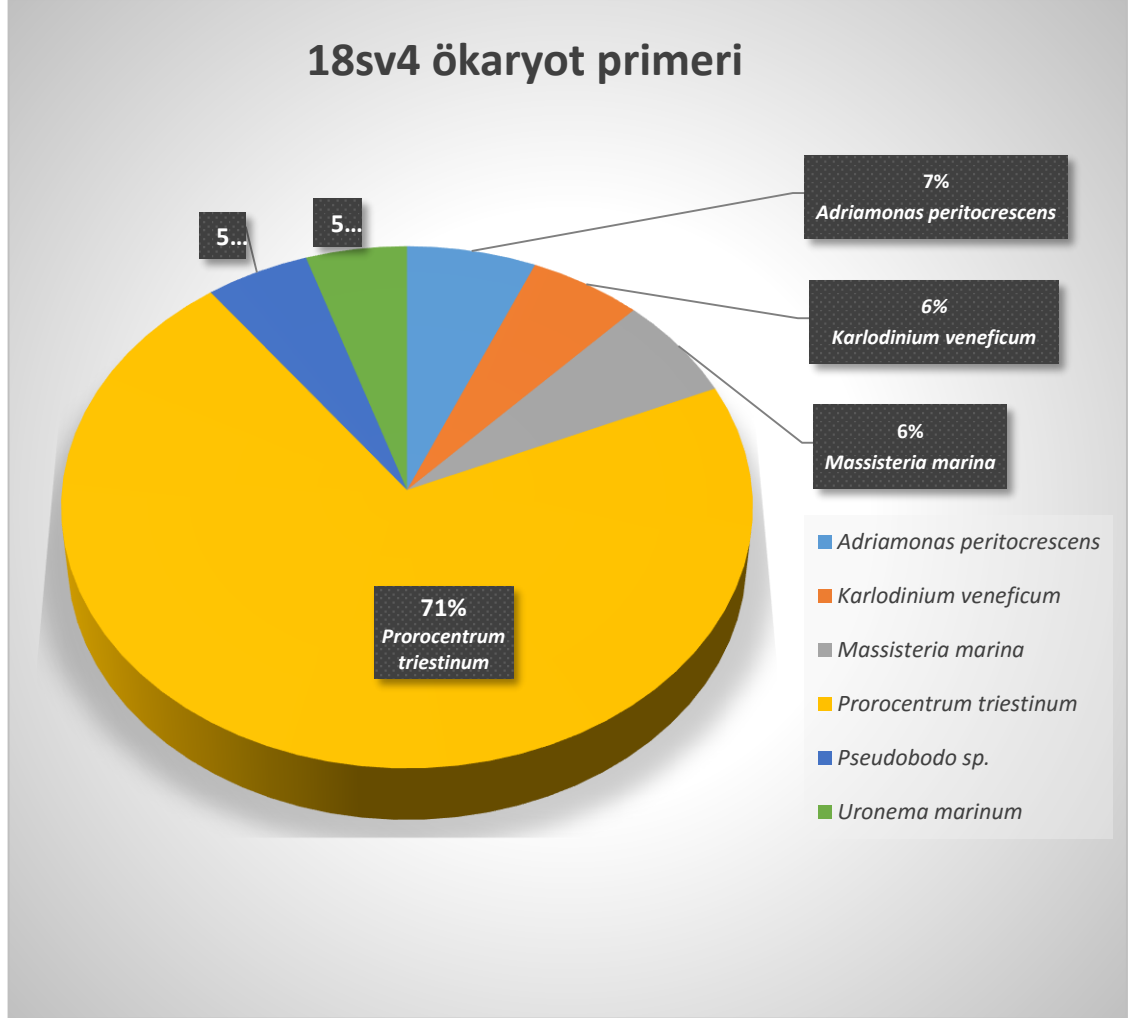
<i>Protaspis sp.</i>	11	Su yosunu
<i>Protostelium Nocturnum</i>	19	Amip
<i>Protostelium Nocturnum</i>		
<i>Pseudobodo sp.</i>	3859	Zooflagellat
<i>Pseudochilodonopsis mutabilis</i>	6	Su yosunu
<i>Pseudochlorella pringsheimii</i>	8	Yeşil alg
<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>	5	Su yosunu
<i>Pseudophyllomitus vesiculosus</i>	26	Patojenik flagellat
<i>Pseudostaurosira madagascariensis</i>	15	Diatom
<i>Pyramimonas sp.</i>	1	Yeşil alg
<i>Pyxinia crystalligera</i>	15	Su yosunu
<i>Reckertia gemma</i>	354	Su yosunu
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	1	Mantar
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>	9	Diatom
<i>Rhopilema nomadica *</i>	71	Denizanası
<i>Roubikia sp.</i>	1	Böcek
<i>Saccamoeba sp.</i>	4	Bakteri
<i>Salpingoeca macrocollata</i>	5	Kamçılı Ökaryot
<i>Salpingoeca urceolata</i>	13	Kamçılı Ökaryot
<i>Savillea micropora</i>	5	Kamçılı Ökaryot
<i>Schizochytrium minutum</i>	11	Alg
<i>Scrippsiella sp.</i>	1054	Dinoflagellat
<i>Sicyoidochytrium sp.</i>	5	
<i>Sourniaea diacantha</i>	4	Dinoflagellat
<i>Spizellomyces pseudodichotomus</i>	14	Mantar
<i>Spondylosium pulchellum</i>	1	Bitki
<i>Spumella sp.</i>	31	Alg
<i>Stellarchytrium dubum</i>	47	Su yosunu
<i>Stephanoea diplocostata</i>	1	Kamçılı Ökaryot
<i>Stephanoea Norrisii</i>	1	Kamçılı Ökaryot
<i>Stephanoea paucicostata</i>	2489	Kamçılı Ökaryot
<i>Stephanoea paucicostata</i>	1678	Kamçılı Ökaryot
<i>Stephanopyxis turris</i>	479	Diatom
<i>Strombidium sp.</i>	5	Planktonik siliyat
<i>Symbiodinium sp.</i>	5	Dinoflagellat
<i>Syncystis mirabilis</i>	1	Parazit
<i>Syracosphaera pulchra</i>	6	Alg
<i>Teleaulax amphioxeia</i>	2	Su yosunu

Çizelge 4.4 18sv4 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Teleaulax gracilis</i>	11	Su yosunu
<i>Telonema subtilis</i>	1402	Tek hücreli ökaryot
<i>Tetraselmis cordiformis</i>	17	Yeşil alg
<i>Tetraselmis rubens</i>	409	Yeşil alg
<i>Tetraselmis sp.</i>	233	Yeşil alg
<i>Thalassiosira gessneri</i>	6	Diatom
<i>Thalassiosira grvida</i>	1	Diatom
<i>Thalassiosira profunda</i>	690	Diatom
<i>Thalassiosira sp.</i>	22	Diatom
<i>Thaumatomastigidae sp.</i>	187	Su yosunu
<i>Thaumatomastix sp.</i>	64	Su yosunu
<i>Thaumatomastix sp.</i>	44	Su yosunu
<i>Thecamoeba sp.</i>	53	Amip
<i>Thraustochytriidae sp.</i>	87	Kahverengi alg
<i>Thraustochytrium multirudimentale</i>	38	protist
<i>Thraustochytrium sp.</i>	271	Mantar
<i>Tokophrya quadripartita</i>	1	Mantar
<i>Trachyrhizium urniformis</i>	11	Amip
<i>Triparma pacifica</i>	131	Alg
<i>Triparma pacifica</i>		
<i>Tunicothrix wilberti</i>	1	Su yosunu
<i>Ulkenia aff. visurgensis</i>	3	Mantar
<i>Umbraulva japonica</i>	1	Yeşil alg
<i>Uncinata gigantea</i>	729	
<i>Uronema marinum</i>	3753	Parazit
<i>Vannella samoroda</i>	1	Amip
<i>Ventrifissura artocarpoidea</i>	283	Su yosunu
<i>Ventrifissura sp.</i>	1155	Su yosunu
<i>Vexillifera abyssalis</i>	176	Amip
<i>Vexillifera bacillipedes</i>	1	Amip
<i>Vexillifera sp.</i>	50	Amip
<i>Wangodinium sinense</i>	1	Dinoflagellat
<i>Wolffia angusta</i>	19	Bitki
<i>Yarrowia deformans</i>	1	Maya
<i>Yarrowia lipolytica</i>	75	Mantar
<i>Yarrowia sp.</i>	1	Maya

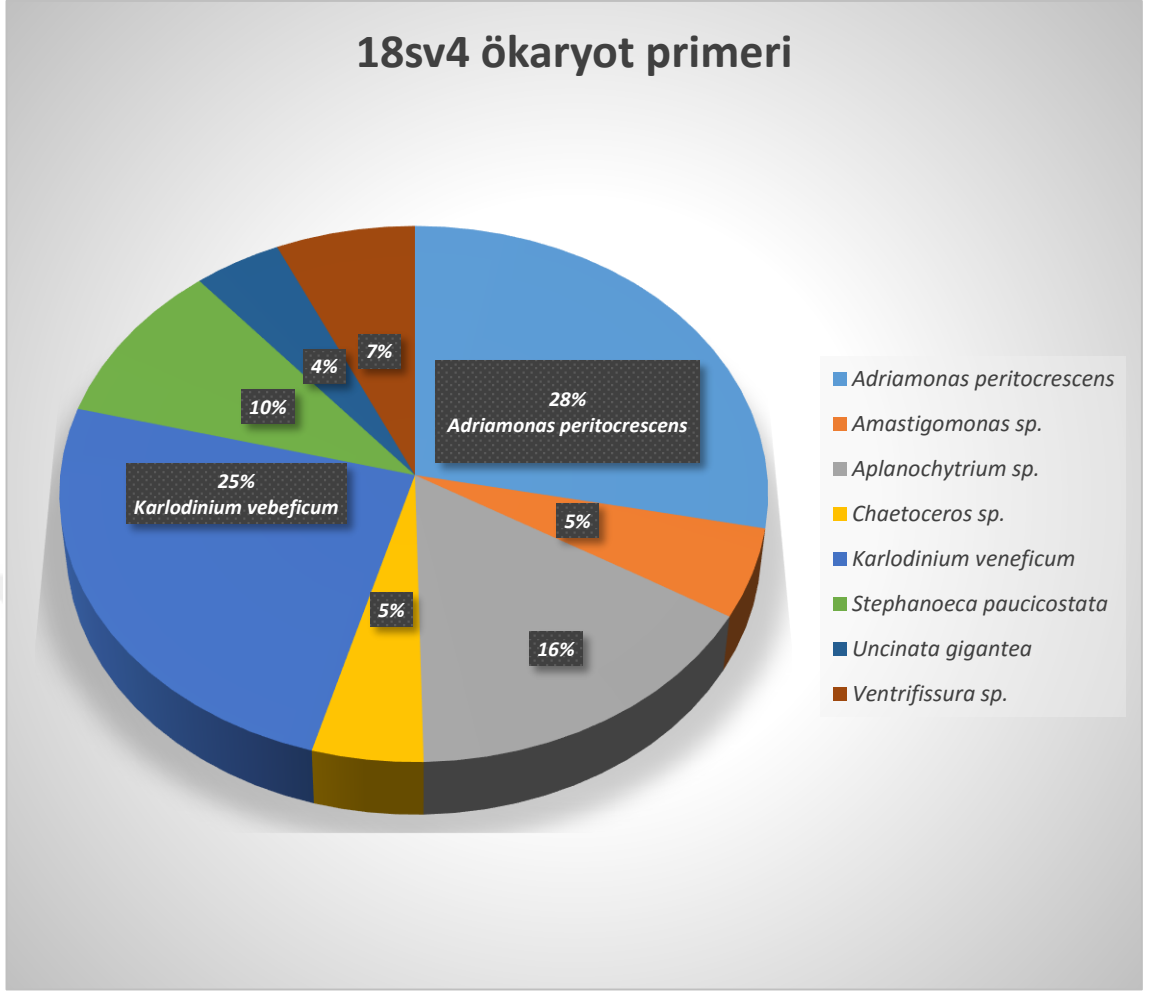
*İstilacı Tür

Aşağıda (Şekil 4.7)'de 18sv4 ökaryot primer okuma yüzdelere ait sonuçlar dilim grafik şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.7 18sv4 primer okuma yüzdeleri

Aşağıda (Şekil 4.8) 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren ökaryot 18sv4 primer okuma yüzdelere ait sonuçlar dilim grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.8 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren ökaryot 18sv4 primer okuma yüzdeleri

Çizelge 4.5' de yer alan 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçlarına göre 190 adet farklı tür tespit edilmiş olup bunların 51 adedi hedef gruba dahilken, 139 adedi 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren türler yani şüpheli okuma olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları

Tür ismi	Okuma sayısı	Türler
<i>Acanthoea spectabilis</i>	44	Protozoa
<i>Acrasis kona</i>	2	Protozoa
<i>Adineta vaga</i>	4	Rotifer
<i>Adriamonas peritocrescens</i>	48	Flagellat
<i>Alexandrium lusitanicum</i>	57	Dinoflagellat
<i>Alexandrium margalefii</i>	242	Dinoflagellat
<i>Allovahlkampfia spelaea</i>	10	Amip
<i>Amastigomonas mutabilis</i>	26	Protozoa
<i>Amastigomonas sp.</i>	163	Apuzosoa
<i>Amoebophrya sp.</i>	736	DiNoflagellet
<i>Amphidoma languida</i>	71	Dinoflagellat
<i>Ancyromonas kenti</i>	6	Protozoa
<i>Ancyromonas sp.</i>	64	Ökaryot
<i>Ansanella granifera</i>	99	Dinoflagellat
<i>Aplanochytrium sp.</i>	4923	Ökaryot
<i>Apusomonas proboscidea</i>	4	Flagellat
<i>Atrichum androgynum</i>	48	Bitki
<i>Bacteriastrum mediterraneum</i>	6	Bakteri
<i>Barnettozyma californica</i>	42	Mantar
<i>Bicosoeca petiolata</i>	2	Bicosoesia
<i>Bicosoeca vacillans</i>	34	Ökaryot
<i>Biecheleria cincta</i>	188	Dinoflagellat
<i>Biremis sp.</i>	2	Diatom
<i>Blastocystis hominis</i>	6	Parazit
<i>Blastocystis sp.</i>	18	Parazit
<i>Brevicalcar kilaueaense</i>	26	Mantar
<i>Bryophrya gemmea</i>	4	Bitki
<i>Cafeteria biegeae</i>	30	Ökaryot
<i>Cafeteria graefeeae</i>	596	Ökaryot
<i>Calliakantha sp.</i>	16	Ökaryot
<i>Candida parapsilosis</i>	6	Mantar
<i>Candida phayaonensis</i>	242	Mantar
<i>Chaetoceros neogracilis</i>	980	Diatom
<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	429	Diatom
<i>Chlamydomonas sternalis</i>	88	Alg
<i>Chrysochromulina andersonii</i>	42	Yosun
<i>Chrysochromulina rotalis</i>	11	Yosun
<i>Chrysochromulina strobilus</i>	22	Yosun
<i>Chrysophyceae sp.</i>	315	Alg
<i>Chrysotila carterae</i>	8	Alg
<i>Cocconeis pediculus</i>	16	Alg
<i>Coemansia reversa</i>	2	Eklembacıklı

Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Collozoum inerme</i>	4	Ökaryot
<i>Colpoda steinii</i>	18	Ökaryot
<i>Colpodella tetrahymenae</i>	6	Ökaryot
<i>Cryothecomonas sp.</i>	22	Su yosunu
<i>Cryptococcus albidus</i>	18	Patojen
<i>Cryptomonas curvata</i>	36	Flagellat
<i>Cyanophora paradoxa</i>	24	Flagellat
<i>Cymbella cistuliformis</i>	2	Diatom
<i>Debaryomyces sp.</i>	17	Maya
<i>Developyella elegans</i>	244	Plankton
<i>Diadumene leucolena</i>	24	Anemon
<i>Diaphanoeca grandis</i>	4120	Kamçılı ökaryot
<i>Didymoeca costata</i>	12	Kamçılı ökaryot
<i>Diophrys oligothrix</i>	8	Su yosunu
<i>Drechslera sp.</i>	12	Mantar
<i>Ebria tripartita</i>	28	Alg
<i>Echinamoeba exundans</i>	2	Ökaryot
<i>Ensiculifera imariensis</i>	388	Dinoflagellat
<i>Eocercomonas perecta</i>	12	Su yosunu
<i>Ephelota truncata</i>	2	Tek hücreli hayvan
<i>Epistylis elongata</i>	2	Su yosunu
<i>Eucampia sp.</i>	69	Diatom
<i>Euduboscquella crenulata</i>	18	Dinoflagellat
<i>Eurycercus lamellatus</i>	4	Eklembacaklı
<i>Exophiala nigra</i>	2	Mantar
<i>Fabomonas tropica</i>	10	Ökaryot
<i>Flamella piscinae</i>	6	Amip
<i>Galactomyces geotrichum</i>	237	Maya
<i>Geminigera cryophila</i>	4	Alg
<i>Geotrichum candidum</i>	470	Mantar
<i>Glaciozyma antarctica</i>	4	Maya
<i>Goniomonas sp.</i>	50	Alg
<i>Gonyaulax spinifera</i>	2	Dinoflagellat
<i>Graphis scripta</i>	6	Mantar
<i>Guillardia theta</i>	2	Alg
<i>GymNophrys sp.</i>	86	Ökaryot
<i>Hartmannella abertawensis</i>	68	Ökaryot
<i>Hemiselmis rufescens</i>	2	Alg
<i>Heterocapsa niei</i>	66	Dinoflagellat
<i>Heterophrys marina</i>	462	Ökaryot
<i>Holosticha bradburyae</i>	1374	Siliyat
<i>Homo sapiens</i>	89	İnsan

Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Hordeum vulgare</i>	4	Bitki
<i>Hyphochytrium cateNoides</i>	12	Ökaryot
<i>Ichthyophonus irregularis</i>	114	Parazit
<i>Ipomoea trifida</i>	42	Bitki
<i>Karlodinium veneficum</i>	7908	Dinoflagellat
<i>Katablepharis japonica</i>	16	Alg
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	241	Maya
<i>Korotnevelia pelagolacustris</i>	2	Protozoa
<i>Labyrinthuloides minuta</i>	103	Su yosunu
<i>Laetisaria fuciformis</i>	23	Mantar
<i>Leptocylindrus convexus</i>	18	Diatom
<i>Leptocylindrus danicus</i>	2	Diatom
<i>Leptomyxa reticulata</i>	22	Amip
<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	50	Mantar
<i>Leucosporidium sp.</i>	165	Mantar
<i>Leucosporidium yakuticum</i>	25	Mantar
<i>Lingulamoeba leei</i>	32	Amip
<i>Malassezia globosa</i>	29	Mantar
<i>Mallomonas akrokomos</i>	232	Alg
<i>Mallomonas tonsurata</i>	82	Alg
<i>Mamiella gilva</i>	136	Plankton
<i>Mantamonas plastica</i>	214	Flagellat
<i>Marchantia quadrata</i>	2	Bitki
<i>Massisteria marina</i>	5093	Su yosunu
<i>Massisteria sp.</i>	104	Su yosunu
<i>Massisteria voersi</i>	32	Su yosunu
<i>Melosira varians</i>	2	Diatom
<i>Micromonas pusilla</i>	4	Alg
<i>MoNosiga brevicollis</i>	8	Kamçılı ökaryot
<i>Myrothecium sp.</i>	158	Mantar
<i>Nausithoe rubra</i>	8	Deniz Anası
<i>Neohodgsonia mirabilis</i>	2	Bitki
<i>Neoparamoeba branchiphila</i>	33	Parazit
<i>Neoparamoeba sp.</i>	394	Parazit
<i>Nolandella sp.</i>	344	Amip
<i>Nurscia albofasciata</i>	10	Örümcek
<i>Nusuttodinium poecilochroum</i>	264	Dinoflagellat
<i>Ovulinata parva</i>	16	Su yosunu
<i>Paraflabellula hoguae</i>	4	Amip
<i>Paramoeba aestuarina</i>	276	Su yosunu
<i>Paramoeba branchiphila</i>	2773	Patojenik
<i>Paramoeba perurans</i>	324	Parazit

Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

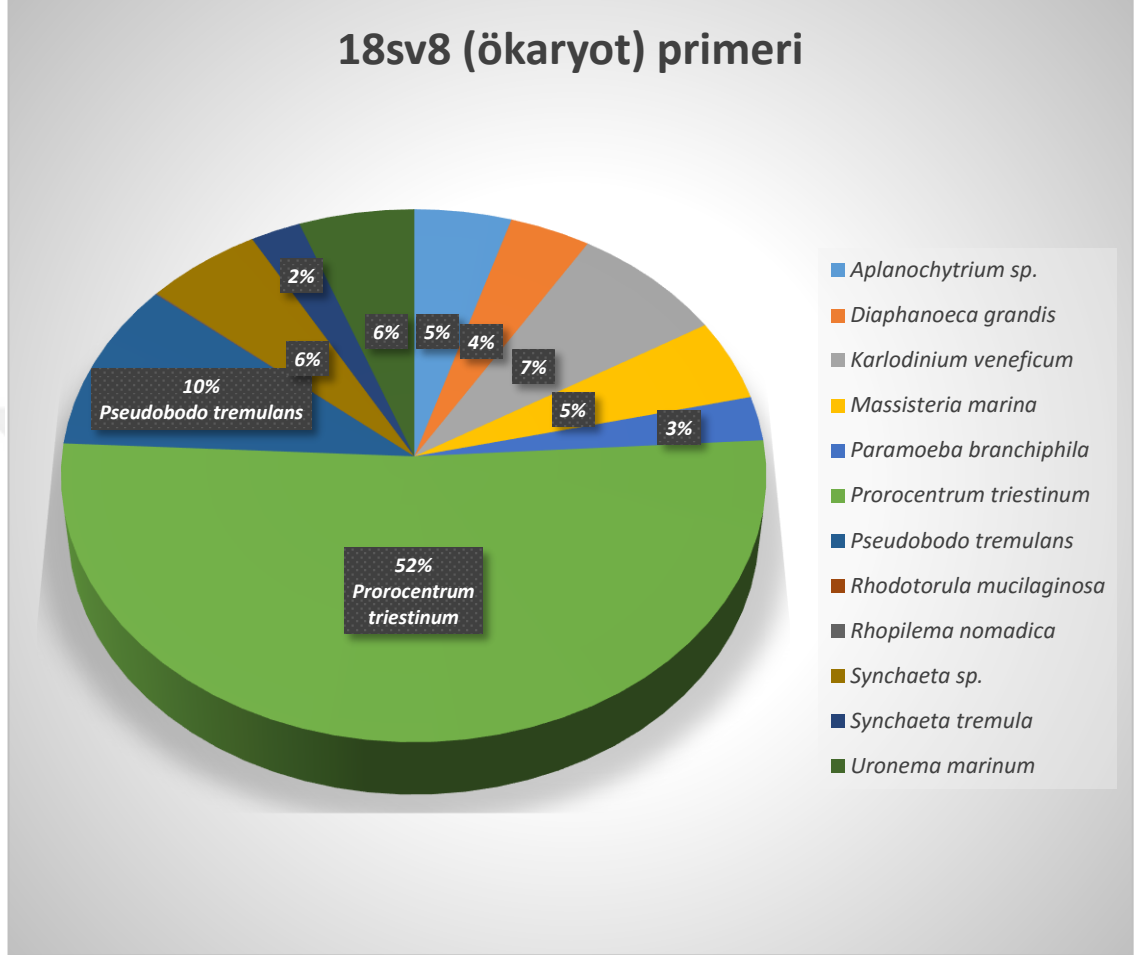
<i>Paraphysomonas imperforata</i>	178	Alg
<i>Parauronema virginianum</i>	160	Protozoa
<i>Paulinella chromatophora</i>	4	Amip
<i>Pectinaria koreni</i>	46	Deniz solucanı
<i>Penaeus duorarum</i>	4	Karides
<i>Pentapharsodinium sp.</i>	11	Dinoflagellat
<i>Peridinium sociale</i>	2	Dinoflagellat
<i>Phoma herbarum</i>	70	Mantar
<i>Pichia fermentans</i>	114	Maya
<i>Pichia sp.</i>	32	Mantar
<i>Picomonas judraskeda</i>	40	Plankton
<i>Pinus taeda</i>	2	Çam
<i>Pirsonia guinardiae</i>	99	Flagellat
<i>Plagiopyliella pacifica</i>	8	Su yosunu
<i>PlaNomonas brevis</i>	54	Flagellat
<i>PlaNomonas elongata</i>	12	biflagellated protists
<i>Platyamoeba contorta</i>	2	Amip
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	1484	Dinoflagellat
<i>Prorocentrum micans</i> *	10	Dinoflagellat
<i>Prorocentrum triestinum</i> *	53452	Dinoflagellat
<i>Pseliodinium pirum</i>	26	Dinoflagellat
<i>Pseudobodo sp.</i>	139	Alg
<i>Pseudobodo tremulans</i>	10618	Alg
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	41	Diatom
<i>Pseudoparamoeba pagei</i>	2	Amip
<i>Pyramimonas tetrarhynchus</i>	10	Yeşil Alg
<i>Rhizoclostratium sp.</i>	6	Mantar
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	29	Mantar
<i>Rhogostoma schuessleri</i>	2	Su yosunu
<i>Rhopilema Nomadica</i> *	41	Deniz anası
<i>Salpingoeca urceolata</i>	22	Yakalı Kamçılı
<i>Savillea micropora</i>	148	Yakalı Kamçılı
<i>Scrippsiella sp.</i>	405	Dinoflagellat
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	1004	Dinoflagellat
<i>Slooffia sp.</i>	10	Mantar
<i>Soletellina diphos</i>	2	Midye
<i>Strombidium sp.</i>	2	Planktonik sliyat
<i>Strombidium styliifer</i>	2	Planktonik sliyat
<i>Synchaeta sp.</i>	5918	Rotifer
<i>Synchaeta tremula</i>	2560	Rotifer
<i>Syncystis mirabilis</i>	2	Parazit

Çizelge 4.5 18sv8 ökaryot (plankton/alg/diatom) primeri sonuçları (devam)

<i>Synura sp.</i>	162	Alg
<i>Taphrina vestergrenii</i>	2	Mantar
<i>Tetraselmis marina</i>	976	Yeşil Alg
<i>Thalassiosira minima</i>	14	Alg
<i>Thaumatomastix sp.</i>	110	Su yosunu
<i>Thaumatomonas seravini</i>	546	Su yosunu
<i>Thraustochytrium sp.</i>	304	Kahverengi alg
<i>Tintinnidium mucicola</i>	2	Su yosunu
<i>Toxorhynchites amboinensis</i>	6	Fil sineği
<i>Trichia sordida</i>	6	Protozoa
<i>Trichodina meretricis</i>	232	Su yosunu
<i>Tripes tenuis</i>	2	Dinoflagellat
<i>Ulkenia profunda</i>	2	
<i>Uronema marinum</i>	5849	Parazit
<i>Vacuolaria virescens</i>	20	Yeşil Alg
<i>Vannella calycinucleolus</i>	340	Amip
<i>Vannella samoroda</i>	702	Amip
<i>Vannella sp.</i>	158	Amip
<i>Ventrifissura artocarpodea</i>	1402	Su yosunu
<i>Vexillifera abyssalis</i>	98	Amip
<i>Vexillifera armata</i>	64	Amip
<i>Vexillifera sp.</i>	21	Amip
<i>Yarrowia deformans</i>	4	Mantar
<i>Yarrowia lipolytica</i>	28	Mantar

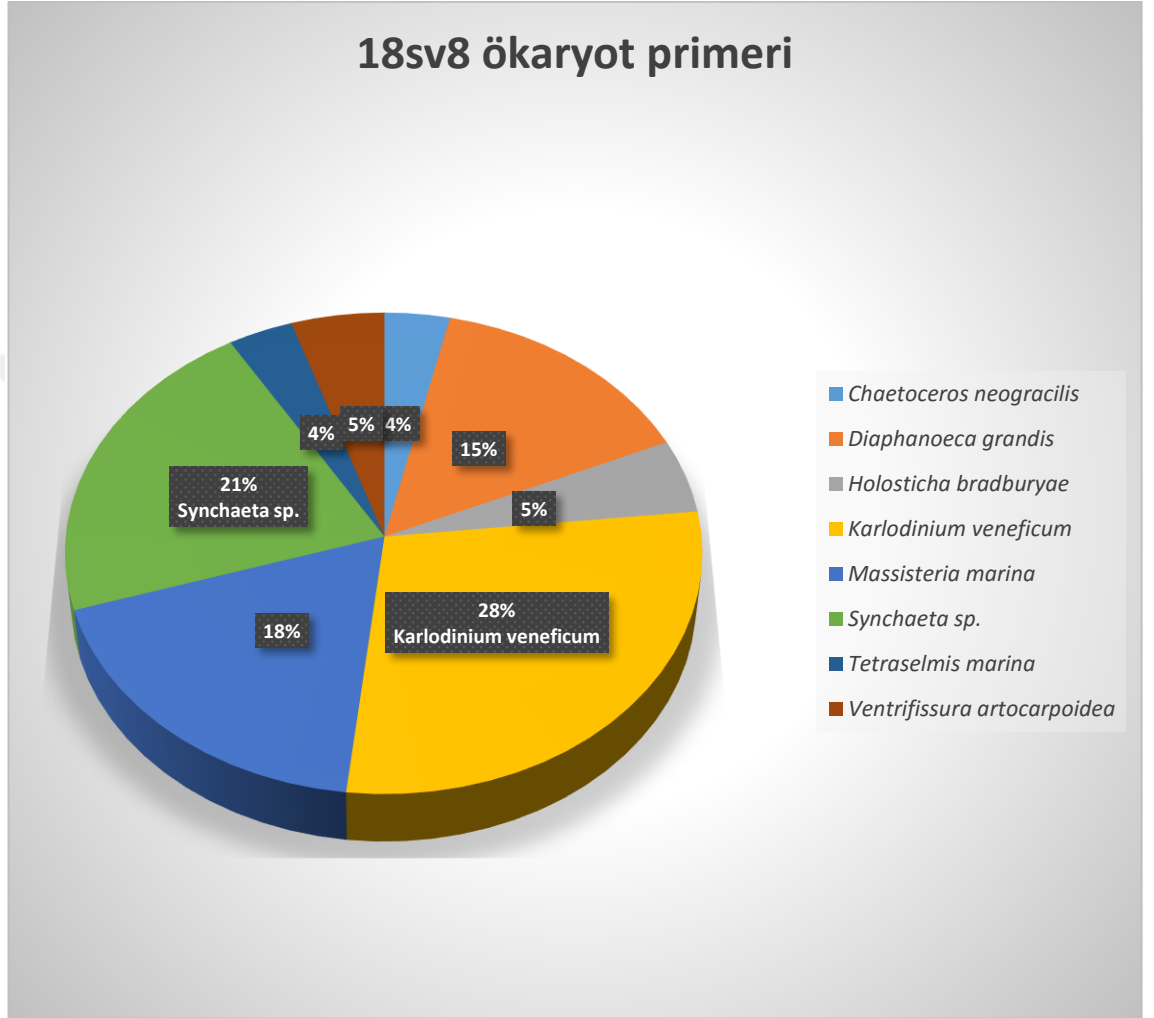
*İstilacı Tür

Aşağıda (Şekil 4.9) ökaryot 18sv8 primer okuma yüzdelerine ait sonuçlar dilim grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.9 18sv8 primer okuma yüzdeleri

Aşağıda (Şekil 4.10) 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren ökaryot 18sv8 primer okuma yüzdelerine ait sonuçlar dilim grafik şeklinde verilmiştir.



Şekil 4.10 10 okumadan az sonuç verenler ve %97'den daha az eşleşme gösteren canlıların 18sv8 primer okuma yüzdeler

Ayrıca, aşağıda primer okumalarına göre tespit edilen istilacı türler (Çizelge 4.6) ve şüpheli okuma yüzdelere göre primer okumaları (Çizelge 4.7) verilmiştir.

Çizelge 4.6 Primer okumalarına göre tespit edilen istilacı türler

Species name	Read count	Primer	Tür
<i>Nostoc sp.</i>	241	12s	Siyano Bakteri
<i>Penaeus vannamei</i>	5	Coi	Karides
<i>Prorocentrum micans</i>	54	Coi	Dinoflagellat
<i>Rhopilema nomadica</i>	62	Coi	Deniz anası
<i>Alexandrium minutum</i>	49	18sv4	Dinoflagellat
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	62	18sv4	Dinoflagellat
<i>Rhopilema nomadica</i>	71	18sv4	Denizanası
<i>Prorocentrum mexicanum</i>	1484	18sv8	Dinoflagellat
<i>Prorocentrum micans</i>	10	18sv8	Dinoflagellat
<i>Rhopilema nomadica</i>	41	18sv8	Deniz anası

Çizelge 4.7 Şüpheli okuma yüzdelere göre primer okumaları

Primer	Tür Sayısı	Şüpheli Okuma	İstilacı Tür Sayısı	Şüpheli Okuma Yüzdesi
12s	44	6	1	%13
16s	19	17	0	%89
Coi	92	78	3	%84
18sv4	241	186	3	%77
18sv8	191	140	3	%73

4.2 Risk Analizi Bulguları

Bu araştırma kapsamında Hint Okyanusu ve Pasifik Okyanus kökenli olan ve Türkiye sularında bulunmayan “*Rhopilema nomadica*” türüne (Şekil 4.11) ait risk analizi sonuçları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.11 *Rhopilema nomadica*

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi
AS-ISK v2

Takson ve Değerlendirici Ayrıntıları	
Kategori	Omurgasızlar (deniz)
Tür ismi	<i>Rhopilema nomadica</i>
Ortak kullanım	Göçmen Denizanası
Risk izleme içeriği	
Sebep ve sosyo-ekonomik faydalar	
Risk değerlendirme Alanı	Akdeniz
Taksonomi	
Yerel aralık	
Tanımlanan aralık	
URL	-

			Cevap	Gerekçe	Güvenilirlik
A. Biyocoğrafya/Tarih					
1. Evcilleştirme/Yetiştirme					
1	1,01	Takson en az yirmi nesildir yetiştirilmekte midir?	Hayır	Bu konuda herhangi bir çalışma mevcutu değildir. Uzman görüşüm çerçevesinde bu türün yetiştiriciliği yapılamamaktadır.	Yüksek
2	1,02	Takson doğadan toplanıyor mu, ticareti yada canlı olarak kullanılması olası mı?	Hayır	Veri yok	Orta
3	1,03	Taksonun istilacı ırkları, çeşitleri, alt taksonları veya türdeşleri var mı?	Evet	Yu vd., 2007	Çok Yüksek

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

<i>2. İklim, dağılım ve ortama giriş riski</i>					
4	2,01	Risk Değerlendirme (RD) bölgesi ile taksonun doğal alanı arasındaki iklimsel koşullar ne kadar benzer?	Orta	Avşar, 1999; Köppen-Geiger verileri	Yüksek
5	2,02	İklim eşleştirme modeli verilerinin kalitesi nedir ?	Yüksek	Köppen-Geiger verilerine göre	Yüksek
6	2,03	Takson RD bölgesinde kapalı tutulduğu alanların (akvaryum, bahçe havuzu vb.) dışına dağılmış mı?	Evet	Soru bu tür için uygun değildir.	Çok Yüksek
7	2,04	Takson RD bölgesine girmek için kaç tane potansiyel vektör kullanılabilir?	>1	Galil, 1993; Spanier and Galil, 1991	Yüksek
8	2,05	Takson, RD bölgesine yakın bir yerde bulunuyor mu ve yakın bir gelecekte girme ihtimali var mı (istemli yada istemsiz giriş)?	Uygulanamaz	Galil et al., 1990; Lotan et al., 1992; Lotan et al., 1994; Kıdeys and Gücü, 1995; Öztürk and İşinibilir, 2010; Gülşahin and Tarkan, 2011	Yüksek
<i>3. Farklı ortamda istila durumu</i>					
9	3,01	Takson doğal alanının dışında doğallaştırılmış mı (hayatta kalanlar popülasyon oluşturmuş mu)?	Evet	Galil et al., 1990	Yüksek
10	3,02	Taksonun giriş yapmış olduğu alanlarda doğal stoklara yada ticari taksonlara olumsuz etkileri var mı?	Hayır	Galil, 1993; Sakınan, 2011	Orta
11	3,03	Taksonun giriş yaptığı alanlarda su ürünleri yetiştiriciliğine olumsuz etkileri var mı?	Hayır	Veri yok	Orta
12	3,04	Taksonun giriş yapmış olduğu alanlarda ekosistemin işleyişine olumsuz etkileri var mı?	Evet	Lotan et al., 1992	Orta
13	3,05	Taksonun giriş yapmış olduğu alanlarda bilinen olumsuz sosyo-ekonomik etkileri var mı?	Evet	Avşar, 1999; Uri et al, 2005; Öztürk and İşinibilir, 2010; Turan et al., 2011; Sakınan, 2011	Çok Yüksek

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

B. Biyoloji/Ekoloji					
<i>4. İstenmeyen (veya baskıcı) özellikler</i>					
14	4,01	Taksonun zehirli olma ya da insan sağlığı için risk taşıma olasılığı var mı?	Evet	Avian et al., 1995; Gusmani et al., 1997; Mariottini and Pane, 2010	Çok Yüksek
15	4,02	Taksonun bir ya da daha fazla yerli taksonu baskılama ihtimali var mı?	Hayır	Veri yok	Orta
16	4,03	Yabancı takson RD bölgesinde tehdit ya da koruma altında olan taksonların paraziti veya avcısı olabilir mi?	Hayır	Veri yok	Orta
17	4,04	Takson iklimsel ve çevresel koşullara adapte olabilir mi, dolayısıyla eğer RD bölgesine istila ya da potansiyel devamlılığı arttırabilir mi?	Evet	Galil et al., 1990; Avşar, 1999	Yüksek
18	4,05	Taksonun RD bölgesindeki sucul ekosistemlerde besin ağı yapısını/işleyişini, RD bölgesini istila etmişse ya da etme olasılığı varsa bozması mümkün mü?	Evet	Lotan et al., 1992	Yüksek
19	4,06	Taksonun RD bölgesindeki ekosistem servisleri üzerine olumsuz etkiler gösterme olasılığı var mı?	Hayır	Veri yok	Orta
20	4,07	Taksonun RD bölgesinde endemik olarak bilinen zararlı ve bulaşıcı hastalıklar için konak ya da taşıyıcı olma ihtimali var mı?	Hayır	Veri yok	Yüksek
21	4,08	Taksonun RD bölgesinde bulunmayan (Ya da RD bölgesi için yeni olan) zararlı ve bulaşıcı hastalıklar için konak ya da taşıyıcı olma olasılığı var mı?	Hayır	Veri yok	Yüksek
22	4,09	Taksonun kapalı tutulduğu alanlardan salıverilmesini sağlayacak kadar büyük boyutlara ulaşabilmesi olası mı?	Uygulanamaz	Soru bu tür için uygun değildir.	Orta

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

23	4,10	Takson değişken akıntı hızlarında yaşayabilme kabiliyetine sahip mi?	Evet	Galil et al., 1990; Lotan et al., 1992; Avşar, 1999; Kıdeyş and Gücü, 1995	Çok Yüksek
24	4,11	Taksonun ortamda bulunuşunun yada davranışlarının (örneğin, beslenmesinin doğal taksonların kalitelerini düşürmesi olası mıdır?	Hayır	Veri yok	Orta
25	4,12	Takson düşük yoğunluklarda bulunsa bile hayatta kalabilen bir popülasyon oluşturabilir mi (ya da kist gibi hareketsiz bir form oluşturarak olumsuz koşullarda devamlılık sağlayabilir mi) ?	Evet	Lotan et al., 1992; Lotan et al., 1994	Çok Yüksek
<i>5. Kaynak kullanımı</i>					
26	5,01	Taksonun RD bölgesindeki tehdit ya da koruma altında olan doğal taksonları tüketme ihtimali var mı?	Hayır	Veri yok	Orta
27	5,02	Taksonun RD bölgesinde doğal taksonlara zararlı olacak şekilde besin kaynaklarını (besleyici elemnetleride içine alacak şekilde) sömürebilmesi mümkün mü?	Hayır	Veri yok	Orta
<i>6. Üreme</i>					
28	6,01	Taksonun çevresel koşulların değişimine tepki olarak cinsi olgunluğa erişme yaşını düşürmesi mümkün mü?	Evet	Lotan et al., 1994	Yüksek
29	6,02	Taksonun (RD bölgesinde) hayatta kalan gamet üretebilmesi ya da çelikleme (tohum, spor gibi yapılar) ile üreyebilmesi mümkün mü?	Evet	Lotan et al., 1992; Lotan et al., 1994	Yüksek
30	6,03	Taksonun yerel türlerle doğal yollardan hibrit oluşturabilmesi mümkün mü?	Uygulanamaz	Soru bu tür için uygun değildir.	Orta

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

31	6,04	Taksonun hermafrodit olması ya da eşeysiz üreme sergileyebilmesi mümkün mü?	Evet	Lotan et al., 1992; Lotan et al., 1994	Çok Yüksek
32	6,05	Takson hayat döngüsünü tamalayabilmesi için başka bir taksonun varlığına (ya da belirli habitat özelliklerine) bağımlı mıdır?	Hayır	Veri yok	Yüksek
33	6,06	Takson kısa bir süre içinde (örneğin, <1) yüksek sayıda çelikleme ya da yavru üretmesiyle bilinir mi?	Evet	Lotan et al., 1992	Yüksek
34	6,07	Taksonun ilk cinsi olgunluğa erişmesi için ne kadar zaman birimi (gün, ay, yıl) gereklidir?	6	ay	Orta
7. Dağılım mekanizmaları					
35	7,01	Takson kaç farklı dahili potansiyel vektör kullanarak RD bölgesi içinde dağılabilir?	>1	akıntılar ve gemilerin balast suları ile (Galil et al., 1990, uzman görüşü)	Çok Yüksek
36	7,02	Bu vektörler herhangi bir taksonu bir ya da daha fazla koruma alanının çok yakınına getirebilir mi (Örneğin, ÖÇK ve deniz koruma alanları)?	Evet	uzman görüşü	Yüksek
37	7,03	Taksonun sert zeminlere (gemi gövdesi, iskele ayakları vb.) tutunabilecek, dolayısıyla da dağılımını kolaylaştıracak bir yapısı var mı?	Evet	Lotan et al., 1992; Lotan et al., 1994	Çok Yüksek
38	7,04	Taksonun RD bölgesindeki doğal dağılımının, larva ya da tohum ve sporlar vasıtasıyla olma ihtimali var mı?	Evet	uzman görüşü	Çok Yüksek
39	7,05	Taksonun RD bölgesindeki doğal dağılımının, larva ve juvenil ya da fide ve bitki parçası vasıtasıyla gerçekleşmesi olası mıdır?	Evet	larvalarının taşınması olasıdır, uzman görüşü	Yüksek
40	7,06	Taksonun daha ilerki yaşam evreleri için üreme amacıyla RD bölgesine göç etmesi olası mıdır?	Hayır	Veri yok	Orta

41	7,07	Taksonun larvalarının ya da çeliklemelerinin RD bölgesine diğer hayvanlar tarafından taşınması olası mıdır?	Hayır	Veri yok	Orta
42	7,08	Taksonun daha önceki yedi soruda (35-41), istemli ve istemsiz olarak) bahsedilen giriş vektörlerinden herhangi biriyle dağılımının hızlanma olasılığı var mıdır?	Evet	uzman görüşü; Deidun et al., 2011; Yahia et al., 2013; Balistreri et al., 2017	Yüksek
43	7,09	Taksonun dağılımı yoğunluğa bağlı mıdır?	Hayır	Veri yok	Orta
8. Tolerans özellikleri					
44	8,01	Takson hayat döngüsünün bazı evrelerinde en az 1 saat olmak kaydıyla su dışında kalmaya toleransı var mıdır?	Uygulanamaz	Soru bu tür için uygun değildir.	Orta
45	8,02	Takson çok farklı su kalite koşullarına toleranslı mıdır?	Hayır	Veri yok	Orta
46	8,03	Takson kimyasal, biyolojik ya da farklı araçlarla doğada kontrol edilebilir ya da ortadan kaldırılabılır mı?	Hayır	Veri yok	Orta
47	8,04	Taksonun çevresel ya da insan kaynaklı bozulmaları tolere edebilme ya da yararlanabilme olasılığı var mı?	Evet	Purcell et al., 2007; You et al. 2007	Yüksek
48	8,05	Takson, doğal ortamının tuzluluk koşullarından daha yüksek veya düşük seviyeleri tolere edebilir mi?	Hayır	Veri yok	Orta
49	8,06	Taksonun RD bölgesinde doğal düşmanları var mı?	Evet	uzman görüşü	Low
C. İklim Değişikliği					
9. İklim Değişikliği					
50	9,01	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun RD bölgesine girme riskleri artar mı, azalır mı yoksa değişmeden kalır mı?	Değişiklik yok	uzman görüşü	Orta

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

51	9,02	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun popülasyon oluşturma riskleri artar mı, azalır mı yoksa değişmeden kalır mı?	Değişiklik yok	uzman görüşü	Orta
52	9,03	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun RD bölgesinde dağılım riskleri artar mı, azalır mı yoksa değişmeden kalır mı?	Daha yüksek	uzman görüşü	Orta
53	9,04	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun taksonun biyoçeşitlilik ve/veya ekolojik bütünlük/durum üzerine gelecekteki potansiyel etkilerinin olası boyutu nedir?	Değişiklik yok	uzman görüşü	Orta
54	9,05	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun ekosistem yapısı ve işleyişi üzerine gelecekteki potansiyel etkilerinin olası boyutu nedir?	Değişiklik yok	uzman görüşü	Orta
55	9,06	Gelecekteki tahmini iklim koşullarında, taksonun ekosistem hizmetleri ve sosyo-ekonomik yapı üzerine gelecekteki potansiyel etkilerinin olası boyutu nedir?	Daha yüksek	uzman görüşü	Orta

Çizelge 4.8 *Rhopilema nomadica* türüne ait risk analizi (devam)

İstatistikler	
Puanlar	
BRA	19,0
BRA Sonuç	-
BRA+CCA	23,0
BRA+CCA Sonuç	-
Puan Dağılımı	
A. Biyocoğrafya/Tarih	7,0
1. Evcilleştirme/Yetiştirme	0,0
2. İklim, dağılım ve ortama giriş riski	2,0
3. Farklı ortamda istila durumu	5,0
B. Biology/Ecology	12,0
4. İstenmeyen (veya baskıcı) özellikler	5,0
5. Kaynak kullanımı	0,0
6. Üreme	3,0
7. Dağılım Mekanizması	4,0
8. Tolerans özellikleri	0,0
C. İklim Değişikliği	4,0
9. İklim Değişikliği	4,0
Cevaplanan	
Toplam	55
A. Biyocoğrafya/Tarih	13
1. Evcilleştirme/Yetiştirme	3
2. İklim, dağılım ve ortama giriş riski	5
3. Farklı ortamda istila durumu	5
B. Biyoloji/Ekoloji	36
4. İstenmeyen (veya baskıcı) özellikler	12
5. Kaynak kullanımı	2
6. Üreme	7
7. Dağılım Mekanizması	9
8. Tolerans özellikleri	6
C. İklim Değişikliği	6
9. İklim Değişikliği	6
Etkilenen Sektörler	
Ticari	7
Çevresel	4
Türler veya popülasyonda rahatsız edici özellikler	17

Eşik	
BRA	-
BRA+CCA	-
Güvenilirlik	
BRA+CCA	0,67
BRA	0,69
CCA	0,50
Tarih ve Zaman	
Tarih ve Zaman	14.09.2021 10:40:52

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tezin bu son bölümünde, gemi balast suları kaynaklı istilacı türlerin tespiti için güvenilir veriler sağlamak üzere genetik araçların kullanımına ve Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi'nin PSC'ler tarafından uygulanabilirliğine ilişkin edindiğimiz yeni bakış açılarını sunmak amaçlanmıştır. Ayrıca, limanlarda MARPOL kapsamında hızlı ve güvenilir balast suyu denetimleri yapmak için eDNA yönteminin kullanım potansiyelinin, tür tespitinde DNA metabarkodlama yönteminin kullanım zorluklarının ve yöntemin geliştirilmesi için ileriye dönük potansiyel farklı yöntemlerin tartışılmasına odaklanılmıştır.

5.1 Balast Suyu Sözleşmesi D-2 Standardına İlişkin Değerlendirmeler

Gemilerin önsörvey denetimi tarihlerine bağlı olarak balast sularının arıtılarak boşaltımına imkân sağlayan D-2 Standartlarına uyum rehberi IMO tarafından yayınlanmıştır (IMO 2021b). Rehberde göre D-2 standartlarına geçiş için 08 Eylül 2024 son tarih olarak verilmektedir. Yaklaşık 30 aylık bir sürenin kaldığı, 35 bin geminin bu dönüşümü yapmasının ön görüldüğü ve bu rakamın yaklaşık %700 oranında bir artışa karşılık geldiği bilinmektedir.

Ticaretin doğası gereği gemi sahipleri, bu sıkışık takvimi ve gemilerinin tersanede bekleme sürelerini öne sürerek D-2 standartlarına uyum için mevcut son tarihin ötelenmesini veya uygulama için belirli bir süre muafiyet istenmesi gibi önerilerini Liman veya Bayrak Devletlerine ya da ilgili kuruluşlara ileterek IMO'da görüşülmesi için ısrarcı olmaları muhtemel görünmektedir. Söz konusu durum; ticari açıdan, tersanelerde D-2 standardı dönüşümü için sıraya girecek olan gemiler, cihaz donatım sürelerinin uzamasından dolayı, piyasada gemi açığına yol açarak navlun fiyatlarında yükselişlerin meydana gelebileceği ve böylece ürün fiyatlarında kısa süreli de olsa artış olabileceği beklenmektedir. Çevresel açıdan ise istilacı tür taşınım olasılığının artması, dolayısıyla daha geniş bir bakış açısıyla biyolojik çeşitliliğin ve mevcut endemik deniz canlılarının popülasyonunun olumsuz yönde etkilenmesi olasıdır.

Ancak, D-2 uygulama son tarihinde uzamaya gidilmesi, gemilerde liman devleti kontrolörleri tarafından yapılan balast denetimlerinde gevşemeye sebep olabileceği gibi muafiyet veya D-1 standartlarına belirli bir süre daha devam edilmesi, istilacı tür riskini arttırarak son dönemlerde müsilağ tehdidıyla başa çıkmaya çalışan İzmit Körfezi üzerinde büyük bir baskı oluşturacaktır. IMO'nun deniz çevresini koruyacak kararlar alması olası gözükse de Örgüt'ün yapısı gereği, dünya deniz ticaretinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, belirli bir periyod için muafiyete veya süre uzatımına gidilmesi durumunu sürpriz bir karar olarak nitelendirmemek gerekmektedir.

5.2 Balast Suyu Sözleşmesi Kapsamında PSC'lerin Yaptıkları Liman Devleti Denetimlerine İlişkin Değerlendirmeler

Bu tez çalışmasında istilacı tür tespiti için 15 farklı tesise gelen 20 farklı gemiden 2018 Şubat ve 2019 Mart aylarında liman devleti kontrolörleri eşliğinde balast tanklarından veya manhole ya da hava firar noktaları gibi geminin muhtelif yerlerinden farklı yöntemlerle örnekler alınmıştır. Örneklemeler esnasında gemiler yoluyla istilacı tür dağılımını ilk etapta frenleyebilecek ve balast denetimi yapmakla yükümlü liman devleti kontrolörlerini gözlemlene fırsatı edinilmiştir. Örneklemeler esnasındaki gözlem sonuçları aşağıda sunulmuştur:

Kontrolörlerin neredeyse tamamının denizcilik kökenli olması sebebiyle balast suyunun gemi operasyon boyutuna hâkim olması ve gemi mürettebatı kaynaklı aksaklıkların tespiti yönünden oldukça maharetli olmalarının aksine, biyolojik çeşitliliğin korunması ve buna bağlı istilacı tür odaklı çalışma deneyimlerinin az olması nedeniyle balast suyuna dayalı liman devleti denetimlerinin, seyir güvenliğine dayalı denetimlerine kıyasla daha hafif boyutta ele alındığı gözlemlenmiştir. Örnek alımını takip eden süreç içerisinde Denizcilik Genel Müdürlüğünce, söz konusu zayıf noktaların iyileştirilmesine yönelik farkındalığın artırılması eğitimleri gibi bazı adımlar atılmıştır.

Öncelikle, Türkiye'de son zamanlarda ağırlıklı olarak Marmara Denizi ve İzmit Körfezi'nde meydana gelen müsilağ problemi, antropojenik kaynaklı atıklarda arıtım tesisi eksikliklerini ve var olan tesisler için denetim sorunları yaşandığını gün yüzüne

çıkarmıştır. İzmit Körfezi'nin yoğun kirlilik baskısı altında olduğu göz önünde bulundurarak, bu baskıya birde istilacı tür probleminin eklenmesi Körfez'in biyoçeşitliliğini olumsuz yönde etkileyebilecektir. Dolayısıyla müsilaj probleminin çözümüne yönelik Çevre Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı yönetiminde, Üniversiteler ve faydalı olabilecek kuruluşlarla bilimsel analizlere dayanan çalışmalar yapılarak biyolojik çeşitliliğin aslında sadece canlı boyutuyla değil ekonomi ve sosyoloji alanları ile de etkileşim halinde olduğu dikkate alınmalıdır.

Liman devleti kontrolörleri boyutunda, Denizcilik Genel Müdürlüğü direktifleri doğrultusunda 2021 Mayıs ayında, Marmara bölgesindeki Liman Başkanlıklarında çalışan kontrolörlerin katıldığı ve Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesinin detaylı anlatımının yanısıra, istilacı tür problemleri, D-1 ve D-2 standartları açısından örnek alma prosedürleri ve kontrolörlerce daha çok hangi hususlarda şüphe duyulduğunda mevcut gemiden örnek alınması gerekliliğini kapsayan bir sunum tarafımdan gerçekleştirilmiştir. Böylece istilacı tür boyutuna vurgu yapılarak, liman devleti kontrolörlerinin farkındalığı artırılmıştır.

Ayrıca, Tarım ve Orman Bakanlığı'nın UNDP ile yürüttüğü ve kurumumun faydalanıcısı olduğu MARIAS (Deniz kökenli istilacı türler) projesinin odak noktası olarak; proje tabanlı gelişmeler UNDP ile yapılan toplantılar ile takip edilmekte ve özellikle istilacı türlerin tespitinde kullanılması gündemde olan eDNA yöntemi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Proje bitimiyle beraber ortaya koyulacak çıktılar ışığında, liman devleti kontrolörlerine yenileme eğitimleri verilerek eDNA yöntemi hakkında bilgi paylaşımının yanısıra, bu yöntemi denetimlere nasıl entegre edebileceğimiz hususunda çalışmalar yapılacaktır.

5.3 Morfolojik Taksonomi Yerine Genetik Tabanlı Tür Teşhisinin Kullanımına İlişkin Değerlendirmeler

Gemi balast suları ile doğal yaşam ortamı dışındaki deniz bölgelerine ve bölgedeki limanlara taşınan istilacı türlerin tespitinde geçmiş dönemlerde yoğunlukla morfolojik taksonomiye dayalı tür teşhis yönteminden faydalanılsa da son dönemlerde genetik

tabanlı tür teşhis yöntemleri ön plana çıkmaktadır (Jeunen vd. 2019). Geleneksel yöntemlerin bazı avantajları olmasına rağmen dezavantajları daha baskın olduğundan, bu tez çalışmasında eDNA metabarkodlama yöntemi kullanılarak daha güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilmesi ve denizcilik sektörü ile istilacı tür taşınımı arasındaki ilişkinin doğru analizlere dayalı sonuçlarına ulaşılması amaçlanmıştır.

Taksonomiye dayalı tür teşhisinin zorlukları arasında; organizmaların (balast suyu gemi tanklarına pompalanırken veya seyir esnasında) morfolojilerinin bozulması veya hasar görmesinin yanısıra organizmaların larva evresinde olması gibi durumlarda tür teşhisinde taksonomik açıdan teşhiste engeller yaşanabilmektedir (Rey, 2019). İzmit Körfezi'nde gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, Rey (2019) tarafından uygulanan metodolojiyle paralel bir yöntem uygulanmış ve tür teşhisleri ortaya konulmuştur. Ancak, tür teşhis sonuçlarına göre canlının ortamda varoluşu kanıtlanamadığı için; taksonomiye dayalı tür teşhisi ile eDNA metabarkodlama yönteminin beraber yürütülmesi gerekliliği veya eRNA yönteminin canlılığı kanıtlama açısından daha başarılı olacağı düşünülmektedir.

Ayrıca, limanlarda gemi balast sularının izlenebilmesi için çok çeşitli organizmalar hakkında taksonomik olarak deneyimli çalışanlara ihtiyaç bulunmaktadır (David vd. 2015). Tez çalışma sonuçlarımıza göre; bu türden deneyimli çalışanlara sahip olmanın zorluğu, denizcilik sektörünün uluslararası bir sektör olduğu ve dünyanın en ücra köşesinden bile yerel olmayan bir türün balast suları ile taşınabilme olasılığı göz önünde bulundurulduğunda, organizmalar üzerinde geniş çapta taksonomik bilgiye sahip olmayan çalışanlarca yanlış tür tanımlamalarına veya organizmanın yeni bir tür olarak teşhis edilmesi gibi taksonomik inceleme açısından hatalara neden olabilme olasılığını doğurmaktadır.

Geleneksel yöntemler, çok sayıda ve büyük çapta örneklerin tanımlanması gerektiği durumlarda yoğun iş gücü ve yüksek maliyet gerektirmektedir (Pochon vd. 2013; Zhan vd. 2013). eDNA metabarkodlama yöntemine kıyasla yavaş sonuç vermesi denizcilik sektörü için zamanın altın değerinde olduğu da dikkate alındığında, yöntemin veriminin düşük olduğu tartışma konusu olabilir. Ancak, Pochon vd. (2013), Zhan vd. (2013), David vd. (2015)'den farklı olarak tez çalışma sonuçlarımız ışığında eDNA yöntemi, gemilerde

istilacı türlerin ön tespiti için geleneksel yöntemlere göre avantajlı bir konumda olmasına rağmen, balast tankı içerisinde bulunan organizmaların canlılığını kanıtlamayacağından, gemilerin tutulması ve cezai işlem uygulama adımları için yetersiz kalmakta ve bu nedenle geleneksel yöntemlere de ön tespit sonrası başvurulmasının gerektiği kanısındayız.

Valentini vd. (2016); denizlerde gemi kaynaklı istila durumuyla ilgili biyolojik çeşitliliğin korunması için teşhiste bulunmak, planlama yapmak ve çözüm üretmek için öncelikle hızlı ve güvenilir dataya ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır. DNA dizilerini tür adlarıyla eşleştiren zengin ve seçilmiş bir referans veritabanının varlığına dayanan bu yöntemin, belirli organizma grupları için zayıf veritabanına sahip olması, son zamanlarda canlı dizilerinin sayısını artırma yönünde özellikle ökaryotlar için yapılan çalışmalarla önemli derecede yol katetmesi Briski vd. (2016) ve Comtet vd. (2015) tarafından bildirilmiştir. Bu bağlamda, İzmit Körfezi'nde gerçekleştirdiğimiz doktora çalışmasında morfolojik teşhisin belli başlı sorunlarından sıyrılmak için eDNA tabanlı tür teşhisi yöntemi kullanılmıştır. Tez sonuçları; yukarıdaki araştırmacıları destekler nitelikte hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmiş olup veri tabanlarının zenginleşmesini kanıtlar nitelikte birçok ökaryotik canlı DNA'sı kullandığımız veri tabanları ile eşleşmiştir.

Visco vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, Cenevre'de bulunan 27 nehir bölgesinden, nehirlerde ve akarsularda su kalitesinin değerlendirilmesi için biyoindikatör olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta olan diatom örnekleri alınmış olup çevresel DNA ve RNA örneklerinde bulunan diatomları belirlemek ve niceliğini ölçmek için yeni nesil dizileme yaklaşımı test edilmiştir. Çalışma sonucunda, eRNA'nın canlı organizmaları tespitinde eDNA'ya nazaran daha başarılı bulunduğu belirtilmiştir. Li vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise farklı bakteri kombinasyonları ile deneysel olarak eklenmiş su numunelerinde canlı bakteri tespiti için DNA ve RNA bazlı 16s rRNA Illumina dizileme metodolojilerinin etkinliği ve hassasiyeti ölçülmüş olup sonuçlar RNA tabanlı dizilemenin, sudaki canlı bakteri hücrelerini tespit etmede DNA tabanlı yöntemlerden daha üstün olduğunu göstermektedir. Yine, Güney Çin Denizi'nde yapılan çalışmada, su sütunundaki mikrobiyal ökaryotların çeşitliliğini ve metabolik aktivitesini incelemek için, 2 bölgeden toplanan örneklerden DNA ve RNA ekstraksiyonu

yapılmıştır. Çalışma sonucunda DNA ve RNA veri setlerinin, mikrobiyal ökaryot topluluk bileşiminde önemli farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur (Xu vd. 2017). Doktora çalışmamızın tür teşhis sonuçları incelendiğinde, sığır (*Bos taurus*) ve şempanze (*Pan troglodytes*) gibi balast tanklarında hayatta kalması mümkün olmayan genler tespit edilmiştir. Bu durumda, Visco vd. (2015), Li vd. (2017) ve Xu vd. (2017) ile aynı görüşte olduğumuzu belirterek, eDNA yöntemine nazaran, eRNA yönteminin geliştirilerek uygulanmasının denizcilik sektörü açısından daha net sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Alternatif olarak, hedef organizmanın/organizmaların yaşayabilirliğini anlamak için eRNA örneklerine PCR araçları uygulanabilmektedir. Ribonükleik asit, protein sentezi için çok önemli bir bileşen olup genellikle bir hücrede tek sarmallıdır ve enzimler tarafından DNA'dan kopyalanabilmektedir. Dolayısıyla, biyolojik olarak aktif (canlı) organizmalarda üretilir. eDNA ile karşılaştırıldığında, eRNA deniz ortamında daha hızlı bozunur ve bu nedenle canlı biyotayı tespit etmek için daha güvenilir bir araç olarak kabul edilmektedir (Laroche vd. 2016). Ancak, RNA'nın hassas bir yapıda olması yani hızlı bozulabilmesi çalışmaları zorlaştırmaktadır. RNA örneklerinin toplanması, özel örnekleme protokolleri, daha dikkatli koruma ve depolama gerektirmektedir (Rey 2019) ve RNA'nın izolasyonu ile ilişkili ek işlem süresi ve maliyetleri de göz önünde bulundurulduğunda RNA çalışma potansiyeli nispeten daha nadir kullanılan bir yöntem haline gelmektedir (Zaiko vd. 2018). Doktora tez çalışmamız esnasında yapılan örnekleme çalışmaları maliyetleri nispeten karşılanmış olsa da, eDNA yöntemi yerine eRNA yöntemi tercih edilirken RNA'nın izolasyon maliyetleri göz önünde bulundurulmalı ve o doğrultuda planlama yapılması çalışmanın sonuçlanabilmesi açısından önem arz etmektedir. Ayrıca, RNA'nın balast suyu yoluyla ortama giren canlı organizmaların tespitine yönelik potansiyelini değerlendirmek ve gemilerde de genetik analizler için fizibilite çalışması yapabilmek için kapsamlı deneysel araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Visco vd. (2015) ve Zaiko vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, balast suyundaki canlı organizmaların tespitinde eDNA metabarkodlama yerine eRNA'yı hedefleyen çözümler önerilmiş ve bu yönde eRNA üzerine başarılı protokoller geliştirilmiştir. Ayrıca RNA izolasyonu ile tür teşhisinde canlı organizmaların tespiti söz konusu olduğundan bir

çok çalışmada DNA izolasyon yöntemine göre daha sık kullanılmıştır (Li vd. 2017; Xu vd. 2017; Zaiko vd. 2018). İzmit Körfezi'nde gemi balast suları üzerine yaptığımız tez çalışmasındaki tür sonuçları incelendiğinde, COI primer okuması ile “*Cyanea nozakii*” tespit edilen türler arasındadır. Ancak, “*Cyanea nozakii*” balast filtrelerinden geçemeyecek kadar büyük bir deniz anası türüdür. Bu sonuç diğer araştırmacıların sonuçlarını destekler nitelikte ve eDNA yönteminin tankın içindeki mevcut canlı organizmanın tespitinden ziyade DNA dizilerinin tür adlarıyla eşleşmesi prensibini kanıtlamakta olup canlı organizma tespiti için eRNA yönteminin ileride yapılacak çalışmalarda kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

5.4 Balast Suyu Sözleşmesi ve Rehberlerinin eDNA Metabarkodlama Yöntemiyle Uyumuna İlişkin Değerlendirmeler

Yaklaşık 3 yıl gibi bir süre zarfında, balast suyunun değişimini içeren D-1 standartlarından tümüyle balast suyunu arıtma işleminden geçirerek boşaltımı temel alan D-2 standardına geçiş yapılacağından, D-2 standartlarının denetimini hedef alacak sistemlerinin geliştirilmesi ve uygulanması dünya çapında önem kazanacaktır.

Sonuçlara bakıldığında, bu tez çalışmasında kullanılan genetik tabanlı yöntemlerin yerel olmayan türlerin tespitinde özellikle erken tanı için önemli etkisinin olabileceği ortaya çıkmıştır. eDNA metabarkodlama yöntemi; verilerin güvenilirliği, hızlı sonuç vermesi ve nispeten uygun maliyet avantajlarıyla genetik yöntemler içinde ön plana çıkmakta (Valentini vd. 2016) ve balast suyu izleme programlarında daha etkin kullanılması için yöntemin geliştirilmesine devam edilmelidir.

eDNA metabarkodlama yönteminin, Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi rehberlerinde bahsedilen ve yapılması gereken risk değerlendirmesinin sağlam ve güvenilir bilimsel verilere dayalı olması (G7), gemilerdeki balast suyunun zararlı sucul organizmalar ve patojenlerin girişine yönelik bir vektör olup olmadığının değerlendirilmesi (G13) ve balast suyu değişimine yönelik deniz alanlarının belirlenmesi (G14) gibi liman tabanlı araştırmalarda ve hedef tür tespitinde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için geliştirilerek çalışmaların ana eksenine oturtulması gerekmektedir. Böylece, istilacı türlerin ve

patojenlerin doğal ortama girişleriyle beraber çevre, insan sağlığı, mal veya kaynaklar üzerinde oluşturabileceği etkiler ve sonuçlar daha doğru yorumlanarak balast suyu yönetimi açısından önemli bir avantaj oluşturması beklenmektedir.

5.5 Balast Suyu Sözleşmesi kapsamında Muafiyetlerin ve G14 Rehberinin Değerlendirilmesi

Balast Suyu Sözleşmesi Bölüm A-4 incelendiğinde aynı rotada veya spesifik limanlar arasında seyir yapan gemiler için G-7 rehberi gereği risk değerlendirmesi yapılması koşuluyla 5 yıla kadar muafiyet verilebileceği hükümleri yer almaktadır. G-7 rehberinde risk değerlendirmesi için konumlar arasındaki çevresel koşulların karşılaştırılmasına dayanan “Çevresel eşleştirme risk değerlendirmesi”, yüksek riskli istilacıları belirlemek için kaynak ve hedef limanlarda/alanlarda çevresel benzerlik ve tür kompozisyonunu karşılaştırmaya dayanan “Türlerin biyocoğrafik risk değerlendirmesi” ve belirlenen hedef türlerin dağılımını ve özelliklerini değerlendirmeye dayalı “Türe özgü risk değerlendirmesi” şeklinde 3 farklı yöntem geliştirilmiştir (IMO, 2007b). Her yöntemin kendine özgü artıları ve eksileri olduğu göz önünde bulundurularak, bu yöntemlerden hangisinin tez çalışma bölgesi için uygun olduğunun belirlenmesi ve bu yönde protokollerin oluşturması önem arz etmektedir. Bu bağlamda, HELCOM-OSPAR’ın ortaklaşa çıkardığı ve Balast Suyu Sözleşmesi Bölüm A-4 kapsamında muafiyet protokollerinin belirlendiği ve ortaklaşa yayınladıkları bir rehber bulunmaktadır (Anonymous, 2003).

Tez çalışmasının yürütüldüğü Marmara Denizi içerisinde yer alan ve hassas bir bölge olan İzmit Körfezi bölgesinin istilacı türlere karşı korunması adına, değerlendirmenin bir biyocoğrafik bölge içinde sınırlı sayıda zararlı tür üzerinde gerçekleştirilebileceği durumlar için en uygun olduğu düşünülen “Türe özgü risk değerlendirmesi” gibi bir yöntemin kabul edilerek, Marmara Denizi’nin Karadeniz’in bir kolu ve fiziksel/ kimyasal özelliklerinin benzer olduğu da göz önünde bulundurulduğunda, Karadeniz’in Kirliliğe Karşı Korunması Bükreş Sözleşmesi altında faaliyet gösteren Karadeniz Komisyonunca (BlackSea Commission) muafiyete özgü protokollerin hazırlanması gerektiği düşünülmektedir.

Son olarak, balast suyu değişimine yönelik deniz alanlarının belirlenmesi (G14) rehberi uyarınca geminin sefer yapacağı iki liman arasında D-1 değişim standardı için uygun deniz alanları bulunmadığı durumlarda, geminin balast suyu değişimi için sefer bölgesi dışına çıkmaması şartıyla, bayrak devleti tarafından balast suyu değişimi yapılacak alanların belirlenmesi ve bu bölgelerde geminin limana varmadan balast değişimini tamamlaması gerekmektedir. Ancak, Ülkemizde bu bölgelerin henüz belirlenmemiş olması sebebiyle Yunanistan'ın doğu yüzüne bakan limanlarından İzmit bölgesine veya Karadeniz'e seyir yapan gemilerin balast değişimlerinden sorun yaşanmakta ve Ege Denizi'ne özgü türlerin Marmara ve Karadeniz'e taşınımı riski oluşmaktadır.

5.6 Farklı Primerlerin Kullanımı ile Elde Edilen Okuma Sonuçlarına İlişkin Değerlendirmeler

Tez çalışması kapsamında primer okumalarına göre sonuçlar incelendiğinde 12s primer okumasında 1, Coi primer okumasından 3, 18sv4 primer okumasında 3 ve son olarak 18sv8 primer okumasından ise 3 tane istilacı tür tespit edilmiş olup toplamda 6 farklı istilacı tür ile karşılaşılmıştır. Tespit edilen istilacı türlerden "*Penaeus vannamei*" ve "*Prorocentrum micans*" şüpheli okuma olarak karşımıza çıkmıştır. Tüm primer okumaları kendi içlerinde incelendiğinde; türlerdeki şüpheli okuma yüzdesi bakımından 16s primer okuması %89 ile ilk sırada yer alırken, Coi primer okuması %84, 18sv4 primer okuması %77, 18sv8 primer okuması %73 ve 12s primer okuması %13 ile sıralanmaktadır. Şüpheli okuma yüzdeleri rakamsal olarak detaylı bir şekilde incelendiğinde; eDNA metabarkodlama yöntemiyle tür tespitlerinde %89' luk şüpheli okuma yüzdesi ve hiç istilacı tür tespit edilememesinden ötürü 16s omurgalı primer okumalarının eDNA yönteminde tercih edilmesinden ziyade, %13 gibi düşük bir şüpheli okuma yüzdesine sahip ve diğer primer okumalarında tespit edilemeyen "*Nostoc sp.*" istilacı türünü tespit edebilmiş ve Zhang vd. (2020)'nin de çalışmasında belirttiği gibi 12s balık/omurgalı primer okumaları tercih edilebilir.

Ayrıca, COI primer okuması 18sv4 ve 18sv8 primer okumasıyla kıyaslandığında yüksek şüpheli okuma yüzdesi (%84) ve tespit ettiği istilacı türlerden birinin şüpheli okuma olarak tespit edilmesinden ötürü balast suyu örnekleme çalışmalarında primer okuma

tercihlerinde son sıralarda tercih edilmesi sonucu ortaya konabilir. 18sv4 ve 18sv8 primer okumaları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise birbirlerine göre artı ve eksileri olup birbirlerini tamamlamaktadır. Bu bağlamda; protistler için kullanılan (Forster vd. 2016) 18sv4 ve 18sv8 primer okumaları birbirlerine göre farklı istilacı türleri tespit ederken ("*Alexandrium minutum*" ve "*Prorocentrum micans*") birbirleriyle aynı türler de ("*Prorocentrum mexicanum*" ve "*Rhopilema Nomadica*") tespit edilmiştir. 18sv8 primer okumasında "*Prorocentrum micans*" şüpheli okuma olarak tespit edilirken, "*Prorocentrum mexicanum*" 18sv4 primer okumasına kıyasla yüksek okuma sayısı ile tespit edilmiştir. Doktora tez çalışması sonucunda kullanılan iki farklı primer okuması eDNA metabarkodlama yöntemi için önemli primer okumaları olarak öne çıkarken aynı zamanda birden çok primer kullanımının yüksek oranda tür eşleşmesinin tespiti açısından önemi ortaya çıkmaktadır ve (Zhang vd. 2020)'nin araştırmasında savunduğu birçok primerle çalışmanın tür tespiti açısından avantajlarını destekler niteliktedir.

Zhang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, 12s primerinin türlerin tespitinde başarılı sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Doktora tezimizin eDNA metabarkodlama tür tespit sonuçlarına göre ve Zhang vd. (2020) ile benzer şekilde ; eDNA metabarkodlama yönteminde ağırlıklı olarak 16s primer okuması yerine, 12s başta olmak üzere, 18sv4 ve 18sv8 primer okumaları takip edebilir. Keskin ve Atar (2013) tarafından yapılan çalışmada, DNA barkodlama yöntemi ile geleneksel yöntemlerin kıyaslaması yapılmış ve sitokrom oksidaz c alt ünite I (COI) geninin tür seviyesinde belirgin bir genetik varyasyon ve ayırım gücüne sahip olması, geniş bir taksonomik ölçekten canlılar için uygun evrensel primerler ile çoğaltılabilen, korunmuş uç bölgelerine sahip olması ve DNA izolasyonu ve PCR sırasında sorun yaratmayacak kısa dizi uzunluğuna sahip olması şeklinde sıralanmaktadır. Ancak, araştırma sonuçlarımız incelendiğinde Keskin ve Atar (2013)'den farklı olarak yüksek şüpheli okuma yüzdesi oluşturmamasından dolayı COI primer okuması 12s, 18sv4 ve 18sv8 primer okumalarını takip edebilir.

5.7 İstilacı Tür Sonuçları ve Risk Analizlerine İlişkin Değerlendirmeler

Doktora tez çalışmamız kapsamında istilacı tür sonuçları incelendiğinde 10 adet tür ile karşılaşılmış olup bazı türlerin tekerrürlü tespiti sağlanmıştır. Tekerrürlü sonuçlar gözardı

edildiğinde 6 adet istilacı türle karşılaşmakta olup bunlar; “*Nostoc sp.*”, “*Penaeus vannamei*”, “*Prorocentrum micans*”, “*Rhopilema Nomadica*”, “*Alexandrium minutum*” ve “*Prorocentrum mexicanum*” olarak karşımıza çıkmaktadır. “*Prorocentrum micans*” 18sv8 primer okumasında şüpheli okuma olarak karşımıza çıkmasına rağmen, Coi primer okumasında da tespit edildiği için dikkate alınmıştır. Ancak bir karides türü olan “*Penaeus vannamei*” çok düşük sayıda bir şüpheli okuma olarak tespit edilmesi ve tekerrürü bulunmaması sebebiyle dikkate alınmamıştır.

İzmit Körfezi’nde yaptığımız tez çalışması sonuçlarına göre türler açısından bir değerlendirme yapıldığında ise COI primeri ile bir karides türü, 12 s primeri ile bir bakteri türü, 18sv4 ve 18sv8 primerleri ile 3 dinoflagellat türü ve Douek vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada adı en tehlikeli istilacı türler arasında gösterilen ve Kızıldeniz kökenli olan bir deniz anası türü (*Rhopilema nomadica*), İzmit Körfez bölgesinden alınan balast suyu örnekleri için COI ve 18sv4/18sv8 primerleri ile tespit edilmiştir.

Bir taraklı medüz türü olan ve Batı Atlantikten gemi balast suları ile Karadeniz’e geldiği tahmin edilen istilacı tür “*Mnemiopsis leidy*”nin Karadeniz’in biyolojik çeşitliliğe, bölge turizmine ve dolayısıyla da bölge ekonomisine ne denli zararlar verdiği ve bu zararların telafisinin yıllar sürdüğü bildirilmiştir (Bat 2002, Sağlam vd. 2011). Gerçekleştirdiğimiz doktora tez çalışmasında “*Rhopilema nomadica*” türü için risk analizi yapılarak sonuçlar bulgular kısmında sunulmuştur. Süveyş Kanalı vasıtasıyla ülkemizin Akdeniz kıyılarına ulaşan Hint Okyanusu ve Pasifik Okyanus kökenli olduğu Silfen vd. (2003) tarafından bildirilen istilacı deniz anası türü “*Rhopilema nomadica*” için “*Mnemiopsis leidy*” vakasından edinilen bilimsel, teknik ve ekonomik deneyimler de göz önünde bulundurularak bir yaklaşım sergilenmelidir. Fridel vd (2016) tarafından belirtildiği gibi *Rhopilema nomadica* türünün alerjik dokunaçları insan sağlığını etkileyebilir. Ülkemiz turizminin lokomotif olan Akdeniz kıyılarının *Rhopilema nomadica* tarafından istilas durumunda bölgedeki turizm aktivitelerini olumsuz etkileyebileceği, balık ağlarına ve dolayısıyla balıkçılığa verebileceği zararlar ile biyolojik çeşitliliği ve bölge ekonomisini negatif şekilde etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalı, bu doğrultuda türe özgü bilimsel gözlem çalışmaları yapılarak, gelecekte verebileceği zararlar en aza indirilmeye çalışılmalıdır.

Li vd. (2018) ve Huang vd. (2021) tarafından yapılan çalışmalarda, Akdeniz ve Adriyatik'te tespit edilen "*Uronema marinum*" bir parazit cinsi olup balıkların yüzgeç, iç organ ve kas yapısında ağır enfeksiyona yol açarak ölümlerine sebep olduğu ortaya konulmuştur. İzmit Körfezi'nde gerçekleştirdiğimiz tez çalışması sonuçlarına göre "*Uronema marinum*" tespit edilen türler arasında yer almaktadır. Körfez'in yarı kapalı bir su kütlesi olduğu ve aşırı kirlilik yüküne maruz kaldığı göz önünde bulundurulduğunda, tespit edilen parazitin halihazırda kısıtlı olan balık popülasyonu için risk teşkil edebileceği, bu sebeple de izleme çalışmalarının önemli olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca, Feehan vd. (2013), Nowak ve Archibald (2018) ve Hernandez vd. (2020)'nin belirttiği üzere patojenik bir amip türü olan ve deniz kestanelerinde hastalığa yol açan "*Paramoeba branchiphila*" türü, İzmit Körfezi'nde gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, tespit edilen türler arasında yer almaktadır. Bat (2002) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği üzere, Kızıldeniz'de görülen dikenli ve zehirli deniz kestanesi, Süveyş Kanalı aracılığıyla ülkemiz kıyılarına ulaşmış, diğer istilacı balık türleri için korunma alanı oluşturmuş ve istilacı balık türlerinin yayılımını hızlandırdığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacı tarafından yapılan çalışmada geçmiş dönemde Karadeniz'de yaşanan "*Mnemiopsis leidyi*" denizanası istilası, yine bir istilacı taraklı organizma türü olan ve "*Mnemiopsis leidyi*" üzerinden beslenen "*Beroe Ovata*" türü ile düşüşe geçtiği belirtilmiştir (Bat 2002). Doktora çalışma sonuçlarımız kapsamında, tespit ettiğimiz "*Paramoeba branchiphila*" türünün deniz kestanelerinin kontrol altına alınması ve dolaylı olarak istilacı balık türlerinin yok edilmesi çalışmalarında olumlu bir etkiye sahip olacağı söylenebilir.

5.8 Genel Değerlendirmeler

Bu tez çalışması, ülkemizde en yoğun gemi trafiğine sahip, her çeşit geminin dünyanın her alanından uğrak yaptığı ve numune alınan 20 adet liman tesisini içinde barındıran İzmit Körfezi baz alınarak gerçekleştirilse, sonuçlarının her bölge için değerlendirilebilecek tarzda olduğu düşünülmektedir.

Dünya ticaretinin % 90'ına yakınının deniz yoluyla yapıldığı düşünüldüğünde gemi balast sularının ne denli risk barındırdığı açıktır. Geçmiş dönemler ile kıyaslandığında risklerin belli ölçüde değiştiği ortadadır. Sürekli gelişen teknolojiyle beraber hem gemilerin hızları artmış hem de uğrak yaptığı limanlardaki yük boşaltım süreleri kısalmıştır. Dolayısıyla istilacı tür taşınımında oluşan bu riskleri taraf olduğumuz 'Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi' göz önünde bulundurularak uygun bir şekilde yönetme gerekliliği, geleneksel yöntemlerdense eDNA metabarkodlama yöntemi gibi modern ve hızlı bir yöntemin kullanılmasını ön plana çıkarmıştır.

Küreselleşmeyle beraber artan deniz ticareti, gemi balast suları aracılığı ile ülkemiz sularına giren zararlı organizmaları (yerli olmayan türler ve kriptojenik/istilacı türler) ve patojenleri tespit etmek için genetik araçlara dayanan çalışmaların ve uygulanabilirliğinin değerlendirilmesinin önemini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, İzmit Körfezin'de daha önce gözlemlenmeyen istilacı türlerin güvenilir ve doğru tespiti, bölge ekolojisinin yönetimi açısından oldukça önemli olup eDNA metabarkodlama yöntemi, biyolojik çeşitliliğin korunması ve yönetimi açısından entegre bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Balast Suyu Yönetimi Sözleşmesi'ne göre, 08 Eylül 2024 tarihi itibarı ile 400 GT ve üzeri tüm gemiler D-2 standartlarına sahip olması şartı liman devleti kontrolörlerinin arıtım cihazlarının çalışma prensipleri üzerine biraz daha yoğunlaşması gerekliliğini cihazlarının çalışırılığının test edilebilmesi açısından ortaya çıkarmaktadır. Bir başka ifadeyle, sözleşme balast suyunda bulunan istilacı türlerin tespitinden ziyade belirli bir mililitredeki organizma sayısını hedef aldığından, kontrolörün cihazın verimli çalıştığından emin olması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. eDNA yöntemi, bir geminin taşıdığı balast suyunun D-2 standartlarına uygunluğunun değerlendirilmesi, yani canlı organizma sayısının tespiti için sınırlı bir olanak sağlasada, farklı balast suyu arıtım sistemlerinin verimliliğini karşılaştırmak için kullanılabilir. Diğer yandan, şüphe duyulan gemiden alınacak balast su örneği için eDNA metabarkodlama yöntemiyle tür tespiti yapıldıktan sonra türün istilacı tür listesinde taraması yapılarak istilacı olup olmadığına karar verilmesi gerekmektedir. Ancak halihazırda kapsamlı bir istilacı tür listesi ülkemizde bulunmamaktadır ve bu yönde bir veri havuzu oluşturulması önem arz etmektedir.

Bununla beraber olası bir istilacı tür tespitinde cezai işlem uygulanmasının nasıl olacağı ve balast suyunun nasıl bertaraf edileceği, Sözleşme'nin henüz deneyim kazanım sürecinde (experimental building phase) olması sebebiyle henüz netlik kazanmamıştır. Ayrıca, cezai işlem uygulamasında karşılaşılabilecek herhangi bir hukuksal durumda eDNA yöntemi türün tank içindeki mevcudiyetini kesin bir şekilde kanıtlamayacağı için geleneksel laboratuvar yöntemlerinden belli ölçüde faydalanılması düşünülebilir. COI primer okumasında düşük okuma yüzdesiyle tespit edilen genellikle hayalet denizanası olarak bilinen "*Cyanea nozakii*" aslında morfolojik olarak balast alım esnasında filtrelere takılacağı için balast tankına girişi oldukça zor ya da imkansız bir deniz anası türüdür. Bu kapsamda; eDNA metabarkodlama yöntemiyle tespit edilen tür sonuçlarının türlerin fiziki varlıklarından ziyade türün DNA sı olduğu veya DNA'nın gen bankası taramasında en yakın türle eşleşmesi olduğu göz önünde bulundurulması gereken önemli bir husustur.

Liman devleti kontrolörünün gemiye çıkmasıyla beraber adım atacağı prosedürler IMO'nun belirlediği kapsamda belli olsa da, numune alımının özellikle D-2 standardına sahip gemilerde nasıl yapılacağı ve sonrasında yapılacak iş ve işlemler, BWM Sözleşmesinin küresel olarak değerlendirilmesi açısından hala deneyim kazanım sürecinde (experimental building phase) olması ve bu süresin Ağustos 2022 tarihinde düzenlenecek olan MEPC 79 komite toplantısına kadar uzatılması nedeniyle tam anlamıyla netlik kazanamamıştır.

Ülke denizlerimizin korunmasının çok önemli bir politika olması, son yaşanan musilaj felakatiyle birlikte bir kez daha ortaya çıkmıştır. IMO'da alınacak kararları beklemeden, konumumuzu önceden belirleyerek bu doğrultuda numune alım sonrasında yapılması gereken fazların belirlenmesini takiben gemi balast suları ile taşınan istilacı türlerle mücadelemizde alacağımız ön tedbirler sayesinde büyük başarılar elde edebileceğimiz söylenebilir.

Günümüz teknolojileriyle beraber emisyonların azaltılmasına istinaden doğa dostu elektrikli gemilerin üretilmesi, gemi yakıtlarında kullanılan sülfür oranının azaltılması veya karbonsuzlaştırma politikası olarak gemilerin limanlarda demirde iken makinelerinin

limandan temin edilecek elektrikle idamesi (cold-ironing) gündemde olan Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri (SDGs) ve Avrupa Birliği çevre koruma politikalarıyla uyumlu gelişmelerdir. Ancak, bu teknolojik gelişmelerin hiçbiri gemilerin balast tanklarına olan ihtiyacının ve dolayısıyla istilacı türlerin dolaşımının önüne geçememektedir.

Denizcilik sektörü, biyolojik çeşitliliğe ve dolaylı olarak ekonomiye darbe vuran istilacı türlerle mücadele için balast suyu arıtım cihazlarının gemilere kurulumu yükümlülüğünü yürürlüğe koymuştur. Sadece arıtım cihazlarına güvenilmemeli, çalışabilirliği liman devleti kontrolörleri tarafından sıklıkla denetimden geçirilmelidir. Sonuç olarak; şüphe duyulan veya riskli bölgelerden gelen gemilerden alınacak örnekler için Üniversiteler veya farklı kurum/kuruluşlar ile Bakanlık arasında gerekli protokoller yapılarak hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle eDNA metabarkodlama yönteminin istilacı tür tespiti için balast suyu yönetim aşamalarına entegre edilmesi, sık örnek alımına gidilmesi ve bu doğrultuda istilacı tür riskini yönetme hususunda planlamaların yapılması büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Ammon, U. V., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Tait, L., Lavery, S., ... & Pochon, X. (2018). Combining morpho-taxonomy and metabarcoding enhances the detection of non-indigenous marine pests in biofouling communities. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- Anonymous 2003. Guidelines on the granting of exemptions under International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments Web sitesi: https://helcom.fi/media/documents/Joint-HELCOM_OSPAR-Guidelines.pdf. Erişim tarihi:10.08.2021
- Anonymous 2021a. Web sitesi: http://ec.europa.eu/environment/nature/invasivealien/index_en.htm. Erişim tarihi: 20.07.2021
- Anonymous 2021b. Web Sitesi: <https://shipandbunker.com/news/world/721451-35000-balast-water-management-system-installations-needed-in-40-months>. Erişim tarihi: 28.07.2021.
- Aylagas, E., Borja, Á., Muxika, I., Rodríguez-Ezpeleta, N., 2018. Adapting metabarcoding- based benthic biomonitoring into routine marine ecological status assessment networks. *Ecol. Indic.* 95, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.07.044>
- Bailey, S.A., Rajakaruna, H., 2017. Optimizing methods to estimate zooplankton concentration based on generalized patterns of patchiness inside balast tanks and balast water discharges. *Ecol. Evol.* 7, 9689–9698. <https://doi.org/10.1002/ece3.3498>
- Bat, L. (2002). Web sitesi: <https://www.hurriyet.com.tr/gundem/hamsi-bereketinin-sirri-38434179>. Erişim tarihi:13.01.2022
- Baumler, R. (2019b). The Balast Water Management Convention (Section D- Bllast Water Management Options). Lecture Presented At Lecture In World Maritime University, Malmo.
- Bewick, V.; Cheek, L.; Ball, J., 2004: Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit. Care* 8, 508–512.
- Bista S., I., Lodge, D.M., Vere, N. de, Pfrender, M.E., Bernatchez, L., 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26, 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Blackman, R. C., Constable, D., Hahn, C., Sheard, A. M., Durkota, J., Hänfling, B., ve Lawson Handley, L. (2017). Detection of a new Non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples--first record of *Gammarus fossarum* in the UK. *Aquatic Invasions*, 12(2).
- Blatchley, E.R., Cullen, J.J., Petri, B., Bircher, K., Welschmeyer, N., 2018. The Biological Basis for Balast Water Performance Standards: “Viable/Non-Viable” or “Live/Dead”? *Environ. Sci. TechNol.* 52, 8075–8086. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00341>.

- Bradley, I. M., Pinto, A. J., & Guest, J. S. (2016). Design and evaluation of Illumina MiSeq-compatible, 18S rRNA gene-specific primers for improved characterization of mixed phototrophic communities. *Applied and environmental microbiology*, 82(19), 5878-5891.
- Borrell, Y. J., Miralles, L., Do Huu, H., Mohammed-Geba, K., & Garcia-Vazquez, E. (2017). DNA in a bottle—Rapid metabarcoding survey for early alerts of invasive species in ports. *PloS one*, 12(9), e0183347.
- Carlton, J. (2003). *Invasive Species: Vectors And Management Strategies*. Island Press.
- Carney, K. J., Basurko, O. C., Pazouki, K., Marsham, S., Delany, J. E., Desai, D. V., ... ve Mesbahi, E. (2013). Difficulties In Obtaining Representative Samples For Compliance With The Balast Water Management Convention. *Marine Pollution Bulletin*, 68(1-2), 99-105.
- Chapin FS III, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, ReyNolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Diaz S (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405:234–242.
- Comtet, T., Sandionigi, A., Viard, F., ve Casiraghi, M. (2015). DNA (meta) barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biological Invasions*, 17(3), 905-922.
- Cox, M. P., Peterson, D. A., veamp; Biggs, P. J. 2010. vequot;SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing datavequot;,. *BMC bioinformatics*, 11(1), 485.
- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111, 978–988.
- Darling, J. A., ve Frederick, R. M. (2018). Nucleic acids-based tools for balast water surveillance, monitoring, and research. *Journal of sea research*, 133, 43-52.
- David, M., Gollasch, S., ve Hewitt, C. (2015). *Global Maritime Transport And Balast Water Management*. Springer Netherlands. doi, 10, 978-94.
- David, M., Gollasch, S., Elliott, B., ve Wiley, C. (2015). *Balast Water Management Under The Balast Water Management Convention*. In *Global Maritime Transport And Balast Water Management* (Pp. 89-108). Springer, Dordrecht.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer,
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. ve Miaud, C. (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953–959.
- Djurhuus, A., Pitz, K., Sawaya, N. A., Rojas-Márquez, J., Michaud, B., Montes, E., ... & Breitbart, M. (2018). Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(4), 209-221.

- Doblin, M.A., Coyne, K.J., Rinta-Kanto, J.M., Wilhelm, S.W., Dobbs, F.C., 2007. Dynamics and short-term survival of toxic cyaNobacteria species in balast water from NOBOB vessels transiting the Great Lakes—implications for HAB invasions. *Harmful Algae* 6, 519–530.
- Douek, J., Harbuzov, Z., Galil, B. S., & Rinkevich, B. (2020). Developing novel microsatellite markers by NGS technology for *Rhopilema nomadica*, an invasive jellyfish. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4821-4825.
- Early, R., Bradley, B. A., Dukes, J. S., Lawler, J. J., Olden, J. D., Blumenthal, D. M., ... ve Sorte, C. J. (2016). Global Threats From Invasive Alien Species In The Twenty-First Century And National Response Capacities. *Nature Communications*, 7, 12485.
- Elbrecht, V., Leese, F., 2015. Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an InNovative Metabarcoding Protocol. *PLoS ONE* 10, e0130324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130324>
- Er, A. (2020). Uyuz Gölünde çevresel DNA ile biyoçeşitlilik tespiti: Göçmen kuşlar modeli (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., veamp; Green, P. 1998. vequot;Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessmentvequot;. *GeNome research*, 8(3), 175-185.
- Feehan, C. J., Johnson-Mackinnon, J., Scheibling, R. E., Lauzon-Guay, J. S., & Simpson, A. G. (2013). Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Diseases of aquatic organisms*, 103(3), 209-227.
- Friedel, N., Scolnik, D., Adir, D., & Glatstein, M. (2016). Severe anaphylactic reaction to mediterranean jellyfish (*Ropilhema nomadica*) envenomation: Case report. *Toxicology reports*, 3, 427-429.
- Forster, D., Dunthorn, M., Mahé, F., Dolan, J. R., Audic, S., Bass, D., ... & Stoeck, T. (2016). Benthic protists: the under-charted majority. *FEMS microbiology ecology*, 92(8).
- Ghabooli, S., Zhan, A., Paolucci, E., Hernandez, M.R., Briski, E., Cristescu, M.E., MacIsaac, H.J., 2016. Population attenuation in zooplankton communities during transoceanic transfer in balast water. *Ecol. Evol.* 6, 6170–6177. <https://doi.org/10.1002/ece3.2349>
- Gibb, C., Pratt, N., Sessa, R. 2013. Web Sitesi: <http://www.fao.org/3/i3157e/i3157e02.pdf>. The Youth Guide to Biodiversty. Erişim Tarihi: 21.07.2021
- Globalast (2014-2017c). Globalast E-Learning Portal. Retrieved From: [Http://Archive.Iwlearn. Net/Globalast.Imo.Org/Learning/Index.Html](Http://Archive.Iwlearn.Net/Globalast.Imo.Org/Learning/Index.Html).
- Grey, E. K., Bernatchez, L., Cassey, P., Deiner, K., Deveney, M., Howland, K. L., ... & Lodge, D. M. (2018). Effects of sampling effort on biodiversity patterns estimated from environmental DNA metabarcoding surveys. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.

- Hernández, J. C., Sangil, C., & Lorenzo-Morales, J. (2020). Uncommon southwest swells trigger sea urchin disease outbreaks in Eastern Atlantic archipelagos. *Ecology and Evolution*, 10(15), 7963-7970.
- Huang, Y. X., Wang, S., Gao, Y. Q., Chen, J. H., Wang, X. L., & Li, R. J. (2021). Comparison of mitochondrial genome and development of specific PCR primers for identifying two scuticociliates, *Pseudocohnilembus persalinus* and *Uronema marinum*. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1-10.
- International Maritime Organization, IMO (2007). Guidelines for risk assessment under regulation A-4 of the BWM Convention (G7). Marine Environment Protection Committee, Resolution MEPC.162(56), 13 July 2007. International Maritime Organization, 13 Feb 2004, London.
- International Maritime Organization, IMO (2009). International Convention For The Control And Management Of Ships Ballast Water And Sediments, 2004 BWM.2/Circ.20 21 July 2009. Retrieved From : https://www.classnk.or.jp/hp/pdf/activities/statutory/ballastwater/Bwmcirc_20.Pdf
- International Maritime Organization, IMO (2017). Global Treaty to Halt Invasive Aquatic Species Enters into Force (Press Briefings). Retrieved From <http://www.Imo.Org/En/Mediacentre/Pressbriefings/Pages/21-BWMEIF.Asp>.
- International Maritime Organization, IMO (2017a). Harmful Aquatic Organisms In Ballast Water Comments On The Draft Alternate Amendments To Regulation B-3 Of The BWM Convention And Associated Draft MEPC Resolution Submitted By China [MEPC 71/4/17 From International Maritime Organization Cong., 71 Sess.]. London, United Kingdom: International Maritime Organization.
- International Maritime Organization, IMO (2019a). Introduction to IMO. Retrieved From <http://www.Imo.Org/En/About/Pages/Default.aspx>
- International Maritime Organization, IMO (2019c). Marine Environment Protection Committee. (2019). Harmful Aquatic Organisms in Ballast Water Practicality And Safety Of Ballast Water Exchange Plus Treatment (BWE+BWT) [MEPC 74/INF.22 From International Maritime Organization Cong., 74 Sess.]. London, United Kingdom: International Maritime Organization.
- International Maritime Organization, IMO (2019f). IMO Frequently Asked Questions Implementing The Ballast Water Management Convention. Retrieved From: [Http://www.Imo.Org/En/Mediacentre/Hottopics/Documents/FAQ%20%20Implementing%20The%20Ballast%20Water%20Management%20Convention.Pdf](http://www.Imo.Org/En/Mediacentre/Hottopics/Documents/FAQ%20%20Implementing%20The%20Ballast%20Water%20Management%20Convention.Pdf)
- International Maritime Organization (IMO, 2019). International Convention for The Control And Management Of Ships' Ballast Water And Sediments (BWM). Retrieved From [http://www.Imo.Org/En/About/Conventions/Listofconventions/Pages/International-Convention-For-The-Control-And-Management-Of-Ships'-Ballast-Water-And-Sediments-\(BWM\).Aspx](http://www.Imo.Org/En/About/Conventions/Listofconventions/Pages/International-Convention-For-The-Control-And-Management-Of-Ships'-Ballast-Water-And-Sediments-(BWM).Aspx).

- International Maritime Organization (IMO, 2021a).
[https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/About/Conventions/StatusOfConventions/StatusOfTreatiesByCountry%20\(2\).pdf](https://wwwcdn.imo.org/localresources/en/About/Conventions/StatusOfConventions/StatusOfTreatiesByCountry%20(2).pdf). Erişim tarihi: 15.07.2021.
- International Maritime Organization (IMO, 2021b). International Convention for The Control And Management Of Ships' Ballast Water And Sediments (BWM). Retrieved From
<https://www.imo.org/en/MediaCentre/HotTopics/Pages/Implementing-the-BWM-Convention.aspx>. Erişim tarihi: 28.07.2021.
- Jeunen, G. J., Knapp, M., Spencer, H. G., Taylor, H. R., Lamare, M. D., Stat, M., ... ve Gemmell, N. J. (2019). Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecology and evolution*, 9(3), 1323-1335.
- Jones, J. (2013). Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species.
- Keskin, E., & Atar, H. H. (2013). DNA barkodlama: Mitokondriyal COI geni kullanılarak moleküler tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 01-08.
- Kideys, A.E., Roohi, A., Bagher, S.I., Finenko, G. And Kamburska, L., 2005. Impacts Of Invasive Ctenophore On Fisheries Of The Black Sea And Caspian Sea. *Black Sea Oceanography*, 18(2):76-85.
- Killi, N., Tarkan, A. S., Kozic, S., Copp, G. H., Davison, P. I., & Vilizzi, L. (2020). Risk screening of the potential invasiveness of non-native jellyfishes in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110728.
- Köseoğlu, B., Töz, A. C. Ve Şakar, C. (2016). “Deniz Atıklarının Değerlendirilmesi Ve Geri Dönüşümü: İstaç Örneği”. *Dokuz Eylül Üniversitesi Denizcilik Fakültesi Dergisi*, ULK 2015 Özel Sayı, 153-177.
- Kubilay, H. (2014). “Türk Hukukuna Göre Boğazlar Rejimi: Çevre Hukuku Yönünden Değerlendirme”. *İnönü Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi*, Cilt: 5, Sayı: 1, 35-64.
- Kutluk, E. (2018). İstanbul Boğazı’ndan Geçen Gemilerin Oluşturduğu Trafik Yükünün Çevresel Etkileri: Ro-Ro Gemileri Özelinde Bir İnceleme. *Siyasal Bilimler Dergisi*, 6(1), 285-310.
- Laroche, O., Wood, S. A., Tremblay, L. A., Ellis, J. I., Lejzerowicz, F., Pawlowski, J., ... & Pochon, X. (2016). First evaluation of foraminiferal metabarcoding for monitoring environmental impact from an offshore oil drilling site. *Marine Environmental Research*, 120, 225-235.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in zoology*, 10(1), 1-14.
- Levine, J. M., ve D'Antonio, C. M. (2003). Forecasting Biological Invasions with Increasing International Trade. *Conservation Biology*, 17(1), 322-326.

- Li, R., Gao, Y., Hou, Y., Ye, S., Wang, L., Sun, J., & Li, Q. (2018). Mitochondrial genome sequencing and analysis of scuticociliates (*Uronema marinum*) isolated from *Takifugu rubripes*. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2), 736-737.
- Li, R., Tun, H. M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Dilantha Fernando, W. G., ... & Khafipour, E. (2017). Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Lockwood, J. L., Hoopes, M. F., & Marchetti, M. P. (2013). *Invasion Ecology*. John Wiley & Sons.
- Lodge, D.M., Turner, C.R., Jerde, C.L., Barnes, M.A., Chadderton, L., Egan, S.P., Feder, J.L., Mahon, A.R., Pfrender, M.E., 2012. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2555–2558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>
- Lohan, K.P., Fleischer, R.C., Carney, K.J., Holzer, K.K., Ruiz, G.M., 2015. Amplicon-Based Pyrosequencing Reveals High Diversity of Protistan Parasites in Ships' Ballast Water: Implications for Biogeography and Infectious Diseases. *Microb. Ecol.* 1–13.
- Macher, J. N., Vivancos, A., Piggott, J. J., Centeno, F. C., Matthaei, C. D., & Leese, F. (2018). Comparison of environmental DNA and bulk- sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers. *Molecular ecology resources*, 18(6), 1456-1468.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963.
- McGeoch, M. A., Butchart, S. H., Spear, D., Marais, E., Kleynhans, E. J., Symes, A., ... & Hoffmann, M. (2010). Global Indicators of Biological Invasion: Species Numbers, Biodiversity Impact and Policy Responses. *Diversity and Distributions*, 16(1), 95-108.
- Miralles, L., Ardura, A., Arias, A., Borrell, Y.J., Clusa, L., Dopico, E., de Rojas, A.H., Lopez, B., Muñoz-Colmenero, M., Roca, A., Valiente, A.G., Zaiko, A., Garcia-Vazquez, E., 2016. Barcodes of marine invertebrates from North Iberian ports: Native diversity and resistance to biological invasions. *Mar. Pollut. Bull.* 112, 183–188.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- Mutlu, E., 2009. Recent Distribution and Size Structure of Gelatinous Organisms In The Southern Black Sea And Their Interactions With Fish Catches. *Marine Biology*, 156(5):935-957.
- Nathan, L.M., Simmons, M., Wegleitner, B.J., Jerde, C.L., Mahon, A.R., 2014. Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12800–12806.

- Nowak, B. F., & Archibald, J. M. (2018). Opportunistic but lethal: the mystery of Paramoebae. *Trends in Parasitology*, 34(5), 404-419.
- Ojaveer, H., Galil, B.S., Carlton, J.T., Alleway, H., Gouletquer, P., Lehtiniemi, M., Marchini, A., Miller, W., Occhipinti-Ambrogi, A., Peharda, M., Ruiz, G.M., Williams, S.L., Zaiko, A., 2018. Historical baselines in marine bioinvasions: Implications for policy and management. *PLOS ONE* 13, e0202383.
- Orhan, A. K. Ülkemiz Sularında Hamsi İle İlgili Yapılan Bilimsel Çalışmalar. *Aquaculture Studies (Eski Yunus Araştırma Bülteni)*, 2010(2).
- Özdemir, G., ve Ceylan, B. (2007). Biyolojik İstila Ve Karadeniz'deki İstilacı Türler. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2007(3).
- Özdemir, Ü. (2012). “Türkiye’de Gemilerden Kaynaklı Deniz Kirliliğinin İncelenmesi”. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, Cilt 1, Sayı 2, 373-384.
- Özdemir, S., Erdem, E. and Birici Özdemir, Z., (2014). Preliminary Study of A Bycatch Of Pelagic Trawl Fishery In The Southern Black Sea Coast Of Turkey: Moon Jellyfish Aurelia Aurita. *Indian Journal of Geomarine Science* 43(10): 1832-1836.
- Patil, J.G., Gunasekera, R.M., Deagle, B.E., Bax, N.J., Blackburn, S.I., 2005. Development and evaluation of a PCR based assay for detection of the toxic Dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* (Graham) in balast water and environmental samples. *Biol. Invasions* 7, 983–994.
- Pereira, F., Carneiro, J., Amorim, A., 2008. Identification of species with DNA-based techNology: current progress and challenges. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2, 187–199.
- Pochon, X., Bott, N.J., Smith, K.F., Wood, S.A., 2013. Evaluating detection limits of next- generation sequencing for the surveillance and monitoring of international marine pests. *PLoS One* 8, e73935.
- RabotNova, A. (2012). Global Approach and Regional Cooperation of Black Sea Countries on The Problem Of Invasive Species/By Anna RabotNova.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., ve Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459.
- Reise, K., van Beusekom, J.E.E., 2008. Interactive effects of global and regional change on a coastal ecosystem. *Helgoland Marine Research* 62, 85–91.
- Rey, A. (2019). From port to balast water: application of ADN metabarcoding of shipborne biodiversity.
- Sağlam, N. E., Kesici, U. Y., Ve Akdoğan, P. (2011). Karadeniz’deki Bazı İstilacı Türler Ve Karadeniz Ekosistemi Üzerine Olan Etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 25-38.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O’Neil P, Parker IM, Thompson

- JN, Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst* 32:305–332.
- Sanguri, M, (2010). Balast Water Exchange and the Need For A Balast Water Management Plan. Retrieved From: <https://www.brightengineering.com/marine-history/63157-balast-water-management/>
- Schmieder, R., Lim, Y. W., Rohwer, F., veamp; Edwards, R. 2010. vequot;TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from geNomic and metageNomic datasetsvequot;. *BMC bioinformatics*, 11(1), 341.
- Shaw, J.L.A., Weyrich, L., Cooper, A., 2017. Using environmental (e)DNA sequencing for aquatic biodiversity surveys: a beginner’s guide. *Mar. Freshw. Res.* 68, 20–33. <https://doi.org/10.1071/MF15361>
- Silfen, R., Vilan, A., Wohl, I., & Leviav, A. (2003). Mediterranean jellyfish (*Rhopilema nomadica*) sting. *Burns*, 29(8), 868-870.
- Simberloff D, Parker IM, Windle PN (2005) Introduced species policy, management, and future research needs. *Front Ecol Environ* 3:12–20.
- Simberloff D (2014) Biological invasions: What’s worth fighting and what can be won? *Ecol Eng* 65:112–121
- Seebens, H., Essl, F., Dawson, W., Fuentes, N., Moser, D., Pergl, J., ... ve Blasius, B. (2015). Global Trade Will Accelerate Plant Invasions In Emerging EcoNomes Under Climate Change. *Global Change Biology*, 21(11), 4128-4140.
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M., 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods Ecol. Evol.* 8, 635–645. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12683>
- Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., ... & Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- Taberlet, P., Coissac, E., PompaNon, F., Brochmann, C., Willerslev, E., 2012. Towards next- generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21, 2045– 2050.
- Takahara, T., Minamoto, T. ve Doi, H. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, 8, e56584.
- Tarkan, A., Ekmekçi, F. ve Uludağ, A. (2016). Workshop On Risk Assessment Tools In Aquatic Species, 28-29 April 2016, Duzce, Turkey.
- Theoharides, K. A., ve Dukes, J. S. (2007). Abstract. *New Phytologist*, 176(2), 256-273.
- Turk Loydu (2019). Balast Suyu Yonetim Planı. Retrieved From: www.turkloydu.org/Pdf-Files/Bayrak-Devleti-Hizmetleri/Balast_G4_Turkce.Docx

Unctad, 2021. Web Sitesi: <https://hbs.unctad.org/merchant-fleet/> Erişim Tarihi: 07.01.2022.

United Nations Development Programme, (UNDP, 2018). Türkiye'nin Denizleri İşgalc Türlerin Tehdidi Altında- Biyoçeşitliliğe En Büyük Tehdit: Türkiye'de İstilacı Yabancı Türler Ve Mcadele Etmenin Yolları. Retrieved From <Http://Www.Tr.Undp.Org/Content/Turkey/Tr/Home/Presscenter/Articles/2018/03/Turkish-Seas-Under-Threat-Of-Invasive-Alien-Species.Html>

United Nations Environment Programme/Global Synthesis (UNEP/2010). A Report from the Regional Seas Conventions And Action Plans For The Marine Biodiversity Assessment And Outlook Series. Retrieved From <Http://Icriforum.Org/Sites/Default/Files/UNEP%20Global%20Synthesis%20Marine%20Biodiversity%20Series.Pdf>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... ve Gaboriaud, C. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 25(4), 929-942.

Vences, M. et al., 2016. Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conservation Genetics Resources*, pp.2–6

Verna, D.E., Harris, B.P., 2016. Review of ballast water management policy and associated implications for Alaska. *Mar. Policy* 70, 13–21.

Visco, J. A., Apothloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Esling, P., Pillet, L., & Pawlowski, J. (2015). Environmental monitoring: inferring the diatom index from next-generation sequencing data. *Environmental science & technology*, 49(13), 7597-7605.

Vural, G., Yonsel, F. (2016). Balast Suyu Arıtım Sistemlerinde Mevcut Durum (In Turkish). Retrieved From: https://www.Researchgate.Net/Publication/292894326_Balast_Suyu_Aritim_Sistemlerinde_Mevcut_Durum_In_Turkish.

Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B. *et al.* (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, **300**, 791– 795.

Werschkun, B., Banerji, S., Basurko, O. C., David, M., Fuhr, F., Gollasch, S., ... ve Kehrler, A. (2014). Emerging Risks from Ballast Water Treatment: The Run-Up to the International Ballast Water Management Convention. *Chemosphere*, 112, 256-266.

Xiong, W., Li, H., Zhan, A., 2016. Early detection of invasive species in marine ecosystems using high-throughput sequencing: technical challenges and possible solutions. *Mar. Biol.* 163, 1–12.

Xu, D., Li, R., Hu, C., Sun, P., Jiao, N., & Warren, A. (2017). Microbial eukaryote diversity and activity in the water column of the South China Sea based on DNA and RNA high throughput sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, 1121.

- Zaiko, A., Martinez, J. L., Ardura, A., Clusa, L., Borrell, Y. J., Samuiloviene, A., ... ve Garcia-Vazquez, E. (2015). Detecting nuisance species using NGST: methodology shortcomings and possible application in ballast water monitoring. *Marine Environmental Research*, 112, 64-72.
- Zaiko, A., Schimanski, K., Pochon, X., Hopkins, G.A., Goldstien, S., Floerl, O., Wood, S.A., 2016. Metabarcoding improves detection of eukaryotes from early biofouling communities: implications for pest monitoring and pathway management. *Biofouling* 32, 671–684. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1186165>.
- Zaiko, A., Pochon, X., Garcia-Vazquez, E., Olenin, S., & Wood, S. A. (2018). Advantages and limitations of environmental DNA/RNA tools for marine biosecurity: management and surveillance of non-indigenous species. *Frontiers in Marine Science*, 322.
- Zhan, A., Hulák, M., Sylvester, F., Huang, X., Adebayo, A.A., Abbott, C.L., Adamowicz, S.J., Heath, D.D., Cristescu, M.E., MacIsaac, H.J., 2013. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities. *Methods Ecol. Evol.* 4, 558–565. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12037>.
- Zhang, S., Zhao, J., & Yao, M. (2020). A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(12), 1609-1625.