

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)
YAVRULARINDA KEFİR İLAVELİ YEM KULLANIMININ *Aeromonas*
hydrophila PATOJENİNE KARŞI DİRENÇ VE BÜYÜME
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ecem Bercis YILDIZ

Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2014

©2014 [Ecem Bercis YILDIZ]

TEZ ONAYI

Ecem Bercis YILDIZ tarafından hazırlanan "**Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Yavrularında Kefir İlaveli Yem Kullanımının *Aeromonas hydrophila* Patojenine Karşı Direnç Ve Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

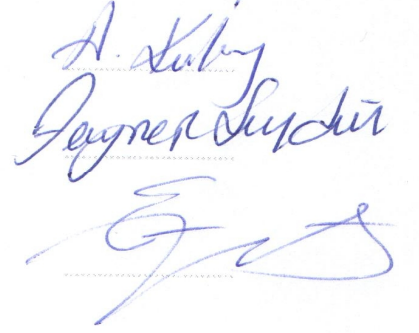
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ
Akdeniz Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Ahmet ŞAHİNER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ecem Bercis YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Gökkuşuğu Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ve Yetiştiriciliği.....	5
2.2. Kefir.....	8
2.2.1. Kefirin tanımı ve tarihçesi.....	8
2.2.2. Kefirin mikrobiyolojik özelliği.....	9
2.2.2.1. Lactococcus.....	11
2.2.2.2. Lactobacillus.....	11
2.2.2.3. Bifidobacterium.....	12
2.2.2.4. Laktik asit bakterileri.....	12
2.2.2.5. Mayalar.....	13
2.2.3. Geleneksel kefir üretimi.....	13
2.2.4. Kefirin sağlık üzerine etkisi.....	13
2.2.5. Kefirin probiyotik olarak canlılarda kullanımı.....	14
2.3. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Kullanımı.....	15
2.3.1. Probiyotiklerin büyüme üzerine etkisi.....	16
2.3.2. Probiyotiklerin bağırsak florası üzerine etkisi.....	18
2.3.3. Probiyotiklerin balık patojenleri üzerine etkisi.....	22
2.4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Deneme Balıkları.....	29
3.1.2. Deneme Yeri.....	29
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Balık Tankları.....	29
3.1.4. Kullanılan Su Kaynağı ve Suyun Kalitesi.....	30
3.1.5. Denemede Kullanılan Kefir.....	30
3.1.6. Denemede Kullanılan Yemler.....	30
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Kefirli Yemlerde Mikrobiyolojik Analizler.....	32
3.2.2. Kefirli Yemlerin Hazırlanması.....	34
3.2.3. Deneme Planı Ve Balıkların Kefirli Yemle Beslenmesi.....	34
3.2.4. Bağırsak Florasının Tespiti.....	35
3.2.5. Virulens Tespiti Ve <i>Aeromonas Hydrophila</i> Patojeninin LD ₅₀ Dozunun Belirlenmesi.....	36
3.2.6. Balıklara Epruvasyon Uygulaması.....	36
3.2.7. Büyüme Performansı Ve Yemden Yararlamadegerlerinin Hesaplanması.....	37
3.2.7.1. Büyüme parametrelerini hesaplanması.....	37
3.2.7.2. Kondüsyon faktörünün hesaplanması (KF).....	37

3.2.7.3. Yem değerlendirme oranının hesaplanması (YDO)	37
3.2.7.4. Protein etkinlik oranının hesaplanması (PER).....	38
3.2.7.5. Yaşama oranının hesaplanması (YO)	38
3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1. Farklı Formlarda Kefir İlave Edilen Alabalık Yemlerinin Mikrobiyolojik Analizlerine İlişkin Bulgular	39
4.2. Deneysel Olarak <i>Aeromonas hydrophila</i> İle Enfekte Edilen Balıkların Nispi Yaşama Oranı (RPS) Bulguları.....	39
4.3. Deneme Grubu Balıkların Deneme Başı Ve Deneme Sonu Büyüme Parametrelerine İlişkin Bulgular.....	40
4.3.1. Canlı ağırlık olarak büyüme bulguları	40
4.3.2. Boy olarak büyüme bulguları.....	42
4.3.3. Canlı ağırlık ve boy olarak oransal büyüme bulguları.....	43
4.3.4. Spesifik büyüme oranı bulguları (SBO).....	44
4.3.5. Kondüsyon faktörü bulguları.....	45
4.3.6. Yem değerlendirme oranı bulguları	45
4.3.7. Protein etkinlik oranı bulguları	46
4.3.8. Yaşama oranı bulguları.....	46
4.3.9. Bağırsak florasına ilişkin bulgular.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ	76

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM 1792) YAVRULARINDA KEFİR İLAVELİ YEM KULLANIMININ *Aeromonas hydrophila* PATOJENİNE KARŞI DİRENÇ VE BÜYÜME PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ecem Bercis YILDIZ

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu çalışmada, çeşitli probiyotik mikroorganizmaları doğal olarak bulunduran kefirin farklı oranlarını içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularının büyüme performansı, bağırsak florası ve *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı direnç araştırılmıştır.

Ticari alabalık yavru yemine (%55 HP ve %15 HY, 4200 Kcal/kg) %0, %2 ve %10 oranında kefir ilave edilerek üç farklı deneme yemi hazırlanmıştır. Denemede ortalama canlı ağırlıkları 0.12 ± 0.01 g olan 900 adet alabalık yavrusu kullanılmıştır. Deneme üç tekrarlı olarak 90 gün süreyle yürütülmüştür. Deneme başından itibaren her 15 günde bir boy ve ağırlık ölçümleri ile bağırsak florası için deneme gruplarından örneklemeler yapılmıştır. Farklı oranlarda kefir içeren deneme yemleriyle beslenen alabalık yavrularında *Aeromonas hydrophila* patojenine karşı oluşabilecek direnç denemenin 30.gününde yapılan eprüvasyon uygulaması ile saptanmıştır. Eprüvasyon uygulamasında ortalama canlı ağırlıkları 6.5 ± 0.01 g olan 225 adet alabalık yavrusu kullanılmıştır.

Deneme sonunda elde edilen bulgulara göre; deneme grupları arasında büyüme performansı ve yemden yararlanma parametreleri arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamıştır ($p > 0.05$). Farklı oranlarda kefir içeren yemlerle beslenen deneme grubu balıkların 15 günde bir bağırsak florasından yapılan ekimlerden elde edilen en yüksek mikroorganizma seviyesine 60. günde ulaşılmıştır.

Aeromonas hydrophila'ya karşı yapılan eprüvasyon denemesinde %2 kefir içeren yemlerle beslenen deneme grubu balıklarında en yüksek yaşama oranı (RPS) elde edilmiştir.

Sonuç olarak; %2 oranında kefir ilave edilen yemlerle beslenen alabalık yavrularında kefirin *Aeromonas hydrophila* patojenine karşı koruyucu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, kefir, probiyotik, bağırsak florası, eprüvasyon, *Aeromonas hydrophila*, büyüme.

2014, 76 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF EFFECT ON GROWTH PARAMETERS AND RESISTANCE AGAINST *Aeromonas hydrophila* PATHOGEN, IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM 1792) FRY BY USING FEED SUPPLEMENTED KEFİR

Ecem Bercis YILDIZ

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this study, growth rate, intestinal flora and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed with commercial pellet including different ratios of kefir which naturally contains various probiotics was investigated.

Commercial rainbow trout fry pellet (55% HP ve 15% HY, 4200 Kcal/kg) added kefir with 0%, 2% and 10% ratios are prepared as three different experimental feeds. In the study, 900 trout fry with average $0,12\pm 0,01$ g live weight are used. Experiment is carried out 90 days in triplicate. From the beginning of the experiment every 15'th day length and weight measured and intestinal flora sampled. On the 30'th day of experiment, possible resistance to *A. hydrophila* determined with challenge made. In challenge 225 trout fry with an average live weight of $6,5\pm 0,01$ g are used.

From the data retrieved from experiment, there is no statistically important difference of growth rate or feed utilization observed between experiment the groups ($p>0.05$). Kefir-fed rainbow trout fry the feeding days` 15 flora in the intestines have been identified kefir microorganisms and days` 60 has the highest level.

Challenge results against *A. hydrophilia*, with 2% kefir-fed rainbow trout fry groups than control group as good as survival rate (RPS) was determined.

As a result, 2% kefir-fed trout fry groups determined as showing protective effect against pathogen *A. hydrophila*.

KeyWords: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, kefir, probiotic, intestinal flora, challenge, *Aeromonas hydrophila*, growth.

2014, 76 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan saygıdeğer Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince çalışmanın yönlendirilmesi ve eksikliklerin giderilmesi konusunda fikir ve görüşleri ile tezin olgunlaşmasına katkı sağlayan sayın hocalarım; Prof. Dr. Zeynep Banu SEYDİM, Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ, Yard. Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince kullanılan kefirli tedarik eden Danem Ltd. Şti. (Göller Bölgesi Teknokenti, Isparta)'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Su Ürünleri Yüksek Mühendisi Hasan ERALP'e ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesinde 1120482 numaralı proje ile maddi olarak destek veren ve Yüksek Lisans Bursu sağlayarak beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, hep yanımda olan hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili annem Sedef YILDIZ ve sevgili ağabeyim Faik YILDIZ'a sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ecem Bercis YILDIZ
ISPARTA, 2014

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Gökkuşuğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	6
Şekil 2.2. Kefir fermente içeceğinin sağlık üzerine etkileri	14
Şekil 2.3. Laktik asit bakterilerinin ihtiva ettiği 6 familya	20
Şekil 4.1. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalıklarının dönemlere göre ağırlık ortalamaları	40
Şekil 4.2. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalıklarının dönemlere göre total boy ortalamaları	43
Şekil 4.3. %2 kefir ilave edilmiş grupta bağırsak florasının 15'er günlük değişim grafiği.....	48
Şekil 4.4. %10 kefir ilave edilmiş grupta bağırsak florasının 15'er günlük değişim grafiği.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri	5
Çizelge 2.2. 2007-2011 yılları arasındaki su ürünleri ihracat ve ithalat miktarları	7
Çizelge 2.3. Kefir ve kefir danelerinde farklı araştırmacıların belirlemiş olduğu bakteri ve maya türleri	9
Çizelge 2.4. Probiyotik bakterilerin konakçıda kalma süreleri	22
Çizelge 2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın biyokimyasal özellikleri.....	27
Çizelge 2.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> ve <i>Aeromonas caviae</i> suşlarının ayırımı.....	28
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan temel alabalık yeminin ticari ürün etiketine göre besin madde içeriği.....	31
Çizelge 3.2. Analiz edilen mikroorganizmaların inkübasyon şartları	32
Çizelge 3.3. Deneme planı.....	35
Çizelge 4.1. Kefirli yemlerin mikrobiyal analiz sonuçları (log kob/g)	39
Çizelge 4.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> patojeniyle enfekte edilmiş Alabalık yavrularında kontrol grubu ve diğer gruplara ait ölüm ve yaşama oranları.....	40
Çizelge 4.3. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarının dönemlere göre ağırlık ortalamaları	40
Çizelge 4.4. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarının dönemlere göre total boy ortalamaları (cm)	42
Çizelge 4.5. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme sonundaki ağırlık ve boy olarak oransal büyüme değerleri (%)	44
Çizelge 4.6. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme sonundaki SBO değerleri (% gün ⁻¹).....	44
Çizelge 4.7. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme başı ve deneme sonundaki kondüsyon faktörü değerleri.....	45
Çizelge 4.8. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme sonundaki yem değerlendirme oranları	45
Çizelge 4.9. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme sonundaki protein etkinlik oranları	46
Çizelge 4.10. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında deneme sonundaki yaşama oranları	46
Çizelge 4.11. Kefirli yemle beslenen gökkuşığı alabalığı yavrularının bağırsak florasında probiyotik bakterilerin sayısı.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
dk	dakika
g	gram
IU	international unit
i.p.	periton içi
Kcal	kilokalori
kg	kilogram
kob	koloni oluşturan birim
L	litre
log	logaritma
m ³	metreküp
mg	miligram
mL	mililitre
nm	nanometre
O ₂	oksijen
PBS	phosphate buffered saline
pH	hidrojen iyonu konsantrasyonu
s	saat
sn	saniye
%	yüzde
°C	derece santigrat
µm	mikrometre

1. GİRİŞ

İntensif balık yetiştiriciliğinde artan üretime paralel olarak hastalık problemleri sıklıkla yaşanmaktadır. Yüksek stoklama yoğunluğu, su kalitesindeki değişimler vb. bakteriyel hastalıkların yaygın olarak görülmesine neden olmaktadır. Hasta balıklar tedavi edilmez ise, büyümenin yavaşlaması ve balık ölümlerinin görülmesi gibi büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Bjöklund ve Bylund, 1990). Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde hastalıklar oluşmadan etkin koruma yöntemlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Ülkemizde yetiştiricilik endüstrisinde ekonomik olarak değerli bir tür olan gökkuşığı alabalığında (Anonim, 2009a) epizootilere neden olan bakteriyel etkenler zaman zaman izole edilmiştir (Çağırğan ve Yüreklitürk, 1991; Timur ve Timur, 1991; Diler vd., 2002). Gökkuşığı alabalığı üretiminde en sık görülen hastalıkların başında *Aeromonas hydrophila* gelmektedir.

Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan bazı antimikrobiyal maddeler, suda ve balık etinde kalıntıya (rezidü) neden olmakta dolayısıyla insan sağlığını tehdit etmektedir. Ayrıca bazı balık patojenlerinde bulunan direnç genlerinin insanlarda patojeniteye yol açan bakterilere aktarılabilirdikleri ve bu yüzden bazı antibiyotiklerin insan sağlığı için oldukça zararlı olduğu tespit edilmiş ve kullanımlarına sınırlamalar getirilmiştir (Schnick vd., 1997; Daly vd., 1999; Dos Santos, 2000). Tüm bu faktörlerin getirisi olarak, son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliğinde, balık hastalıklarının kontrolünü sağlayabilmek yani balıkları sağlıklı tutmak için özellikle doğal maddelerin kullanımına dikkat çekilmektedir (Sivaram vd., 2004).

Dünyada en hızlı gelişen endüstri kollarından biri akuakültürdür. Bu hızlı gelişimin devamında ortaya çıkan sorunların başında kültürü yapılan türlerde büyüme performansının, yem etkinliğinin ve aynı zamanda bu türlerin hastalıklara direncinin artırılması gündeme gelmiş ve bunlara çözüm üretilmesi bir gereklilik haline gelmiştir. Büyüme performansı ve yem etkinliği artırılması ile ortaya çıkan olası durum üretim maliyetinin azalmasıdır. Aynı zamanda hastalıklara dirençli ve market boyuna

ulaştırılmış balıklar, gerek tedavi maliyeti gerekse tüm üretim maliyetini yoğun bir şeklide dūřürmektedir.

Yemler hem zorunlu besin maddelerinin hem de sağlıklı canlıları koruyacak ve büyümeyi arttıracak katkı maddelerini içermektedir. Büyümeyi arttırıcı olarak kullanılan katkı maddelerinin bazıları hormonlar, antibiyotikler, iyonoforlar ve bazı tuzlardır (Fuller, 1992; Góngora, 1998; Klaenhammer and Kullen, 1999). Bunlardan antibiyotikler büyümeyi arttırmasına karşın, yanlış kullanılması durumunda hayvanlarda ve bu hayvanları tüketenlerde zararlı bakteriye karşı direnç geliştirme gibi olumsuz etkiler gösterebilmektedirler. Bu nedenden dolayı üreticiler antibiyotiklerin yerine kullanılabilir alternatif katkı maddeleri arayışına girmişlerdir (Sissons, 1989).

Su ürünlerinde kolay bir çıkış noktası olarak değerlendirilen ve kullanımı geleneksel hale gelmiş olan antibiyotiklerin; antibiyotiğe dirençli bakteri gelişimi, su ürünlerinde antibiyotik kalıntısı varlığı, sucul çevredeki mikrobiyal yoğunluğu yok etmesi ve sucul hayvanların bağışıklık sistemlerini baskılaması gibi nihai sonuçları son yıllarda tartışılmaktadır (Ringo vd., 2010). Avrupa Birliği 2006 yılından itibaren günümüzde antibiyotiklerin yem katkısı olarak kullanımını yasaklamıştır. Buna paralel olarak, bağırsak mikrobiotasının değiştirilmesi yoluyla hayvanlar üzerinde yararlı etkisi olan diğer maddeleri belirlemek için birçok çalışma başlatılmıştır. Antibiyotiklere seğenek olan bu maddeler arasında probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler ve esansiyel yağlar yer almaktadır (Simon, 2005).

Gastrointestinal mikrobiotadaki canlıların konakçı organizmada besleme ve sağlık üzerine önemli rolü vardır. Konakçı organizmada hastalıklara direnç, bağışıklık, sindirim ve gelişimin artırılması gibi yararlı etkileri sağlamak için bağırsak mikrobiotasının çeşitli yollarla değiştirilmesi insanlar kadar çeşitli karasal hayvanlarda da araştırılmıştır. Sindirilemeyen besin içerikleri olarak sınıflandırılan prebiyotiklerin yeme ilavesi, konakçıda büyümenin uyarılmasını ve bağırsaktaki *Lactobacillus* ve *Bifidobacter* türleri gibi sağlığı artırıcı bakterilerin sınırlı sayılarını aktive etmesi gibi yararlı etkileri vardır.

Canlı mikrobiyal besin ilavesi olarak tanımlanan probiyotiklerin mide-bağırsak mikrobiotası üzerine etkileri farklı balık türlerinde çalışılmıştır. Fakat akuakültürde; mikrobiyal uygulamaların başlangıç uygulamaları sucul ortamların kompozisyonlarının değiştirilmesidir. Genel olarak akuakültürde üretimi yapılan balıkların mikrobiotası, özellikle anaerobik mikrobiotası, zayıf olarak karakterize edilmektedir. Bu nedenle kültürü yapılan balıkların mikrobiyal komünitelerinde daha detaylı çalışmalara ve prebiyotik ve probiyotik ilavesinin etkinliğinin potansiyel olarak artırılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Kefir, geleneksel bir yol olan kefir danelerinin sütü fermente etmesiyle üretilen fermente bir süt ürünüdür; kefir daneleri laktik asit bakterilerinin, bazı mayaların ve asetik asit bakterilerinin zengin olarak bulunduğu doğal bir biyosistemdir (Seydim, 2001). Kefir, içerdiği yüksek miktardaki probiyotik bakteriler ile beraber bu bakteriler tarafından üretilen organik asitler, biyoaktif peptitler, konjuge olmuş yağ asitleri, bakteriyosinler vb. önemli metabolitleri de içermesi açısından önemlidir. Geleneksel fermente süt ürünlerinden birisi olan kefirin sütte bulunan besin maddelerinin hepsini bileşiminde bulundurmasının yanında, yapılan araştırmalarla antitümör özelliği, bağışıklık sistemi, sindirim sistemi, laktoz intolerans ve kolesterol üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir. Kefir içeceğinde bulunan mikroorganizmaların faaliyetleri ile büyük moleküllerin nispeten daha küçük moleküllere hidrolizi sonucu, ürünlerin sindirilebilme özelliği artmakta ve besin öğelerinin vücut tarafından emilimi kolaylaşmaktadır (Kök Taş, 2010).

Kefirin antimikrobiyal özellikleri ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* bakterilerinin (Serot vd.,1990); *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri* ve *Yersinia enterocolitica* bakterilerinin (Santos vd.,2003); *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 4b, *Y. enterocolitica* bakterilerinin (Gülmez ve Güven, 2003) ve *S. aureus* bakterisinin (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003; Rodrigues vd., 2005) gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir.

İnsan sağlığında önemli bir gereksinim olan hayvansal proteinin büyük bir kaynağı olan balık, yetiştiricilik ortamlarında maruz kalabileceği patojenlere karşı antibiyotik veya kimyasal maddeler yerine doğal maddeler kullanılarak korunabilmeleri durumunda hem çevreye olumsuz etki yaratan kimyasal madde kullanımı azaltılmış olacak hemde daha sağlıklı balık yetiştiriciliği söz konusu olacaktır. Ayrıca yapılan bu çalışma ile insanların sağlığı üzerindeki teröpatik özellikleri tespit edilmiş ve sağlık koruyucu fonksiyonel bir gıda olarak kabul edilen kefirin, balıklarda kullanımı gerçekteşecektir.

Su ürünleri yetiştiriciliği sektörü, sağlıklı ve hastalıklara karşı dayanıklı balık yetiştiriciliğinin yaygınlaştığı dünyada ve ülkemizde sürekli artarak gelişim gösteren önemli bir üretim koludur. Yetiştiricilikte balıkların bağışıklık sistemini güçlendirmek için çok çeşitli maddeler kullanılarak çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Ancak balıklar üzerinde bağışıklık sistemini güçlendirici maddelerden birisi olan kefir ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığı yavru yemine farklı oranlarda kefir ilave edilerek hazırlanan yemlerle beslenen alabalıkların büyümesi, bağırsak florası ve suda devamlı olarak bulunma özelliğine sahip fırsatçı bir patojen olan *Aeromonas hydrophila* patojenine karşı kefirin oluşturacağı direnç araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve Yetiştiriciliği

Salmonidae familyasının üyeleri olan alabalıklar tatlı su kökenlidir. Alabalık türleri coğrafik özellik bakımından Avrupa ve Amerikan kökenli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gökkuşığı alabalığı Kuzey Amerika kökenli olup, alabalık türleri içerisinde en yaygın yetiştiriciliği yapılan türdür (Yalçın, 2010). Dünya genelinde bilinen diğer alabalık türleri ise *Salmo salar* (Atlantik salmonu), *Salmo trutta f. trutta* (Deniz alabalığı), *Salmo trutta f. fario* (Dere alabalığı), *Salvelinus fontinalis* (Kaynak alabalığı), *Salvelinus alpinus* (Alp alabalığı) ve *Salvelinus namaycush* (Göl alabalığı)'dur (Çelikkale 1994).

Balıkçılık Derneği balık isimleri komitesi tarafından *Salmo gairdnerii* olarak bilinen gökkuşığı alabalığının bilimsel adı *Onchorynchus mykiss* olarak değiştirilmiştir (Smith ve Stearly, 1989, Gall ve Crandell, 1997). Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri

Bilimsel Sınıflandırma	
Hayvanlar Alemi (Regnum)	Animale
Hayvanlar Alt Alemi (Sub Regnum)	Metazoa
Bölüm (Divisio)	Eumetazoa
Şube (Filum)	Chordata
Alt Şube (Sub Filum)	Vertabrata
Sınıf (Classis)	Osteichthyies
Alt Sınıf (Sub Classis)	Actinoptergii

Takım (Ordo)	Salmoniformes
Alt Takım (Sub Ordo)	Salmonoidei
Familya (Familia)	Salmonidae
Cins (Genus)	Oncorhynchus
Tür (Species)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Pulları sikloit ve küçük olan gökkuşağı alabalıklarının vücutları uzamış ve üstten biraz basık olup, dorsal yüzgeçle kuyruk yüzgeci arasında bir yağ yüzgeci (adipöz) bulunur. Yumuşak yüzgeç ışınlarına sahip olan gökkuşağı alabalıklarının sırt yüzgecinde 10-12 adet, anal yüzgecinde ise 8-12 adet ışın bulunur. Gümüşi veya grimsi renkte olabilen vücut kenarlarında, çok sayıda küçük lekeler ve pembe bir bant bulunmaktadır (Şekil 2.1). Yumurtlama zamanı gökkuşağı alabalıkları anaçlarındaki bant kırmızı renk alırken, genel olarak balıkların rengi koyulaşmaktadır (Bayır, 2012).



Şekil 2.1. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Dünyada 120-130 yıldır yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarının yapay olarak üretilmiş ilk defa Amerika'da yapılmıştır. Ülkemizde ise ilk özel çiftlik 1967-1968 yıllarında Marmara bölgesinde kurulmuş ve *Oncorhynchus mykiss* yumurtalarının Avrupa'dan ithal edilmesiyle gökkuşağı alabalıklarının yetiştiriciliğine başlanmıştır. Gökkuşağı alabalıklarının yetiştiriciliğinin diğer alabalık türlerine göre bu kadar yaygın

olması; çevre koşullarına kolay uyum sağlaması, 20-25 °C gibi yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması, kuluçka döneminin daha kısa sürmesi ve ayrıca yemden yararlanma kabiliyetinin yüksek olması nedeniyle kısa sürede iyi bir büyüme göstermesinden kaynaklanmaktadır (Tekelioğlu, 2005).

Ülkemizde 2012 yılında toplam su ürünleri üretimi 644.852ton düzeyinde olup bunun yaklaşık 432.442 tonu avcılık, 212.410 tonu ise yetiştiricilik olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel verilere bakıldığında 2012 yılında yetiştiricilik amaçlı su ürünleri üretiminin % 54'ünü iç sularda üretim, % 46'sini ise denizlerde üretim oluşturmuştur (Anonim, 2013).

Kültür balıklarının türlere göre dağılımında, 2012 yılında, iç su alabalıkları ile 100.239 ton üretimle en büyük miktarda yetiştiriciliği yapılan balık türü olmuştur. Bunu 47.013 ton ile levrek, 32.187 ton ile çipura ve 7.697 ton ile deniz alabalığı takip etmiştir (Anonim, 2013).

Japonya, ABD, İspanya, Fransa ve İtalya su ürünleri ticaretinde önemli ithalatçı ülkelerdir. Dünyadaki en önemli su ürünleri ihracatçı ülkeler ise Çin, Norveç, Tayland, Danimarka ve Vietnam'dır (Kocaman, 2011). Ülkemiz ise 2011 yılında, 66.737 ton ihracat ve 65.698 ton ithalat gerçekleştirmiştir (Anonim, 2012)(Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. 2007-2011 yılları arasındaki su ürünleri ihracat ve ithalat miktarları

Yıllar	İhracat (ton)	İthalat (ton)
2007	47.214	58.022
2008	54.526	63.222
2009	54.354	72.686
2010	55.109	80.726
2011	66.737	65.698

2.2. Kefir

2.2.1. Kefirin Tanımı ve Tarihçesi

Polisakkarit ve protein matriksi içine hapsedilmiş kefir; laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayaları içeren, kefir tanelerinin sütü fermente etmesi ile elde edilen, çok zengin bir floraya sahip, içilebilir kıvamdaki bir üründür (Dinç, 2008). Türk Gıda Kodeksi Fermente Sütler Tebliği'nde kefir; fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir danelerinin kullanıldığı fermente bir süt ürünü olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2009b).

Kefirin ilk olarak Kafkasya'da Elburus Dağları'nın eteklerinde yapıldığı ve buradan dünyaya yayıldığı görüşü hakimdir. Geleneksel kefir, Kafkasya'daki Gaucase Köyü'nde sütün deri keçi tulumu veya sığır işkembesi içerisinde pıhtılaştırılmasıyla elde edilmiştir (Kneifel ve Mayer, 1991). Türkçede kefir kelimesi "keyif veren, coşturan, mest eden" anlamına gelen "kef" ve Kafkasya'da ise "en iyi kalite" anlamındaki "keyf" sözcüğünden türediği bildirilmiştir (Guzel-Seydim vd., 2000b; Ertekin, 2008). Kefir kelimesi farklı ülkelerde kephir, kiaphur, kefyr, kephe, knapan, kepi ve kipe kelimeleriyle tanımlanmıştır (Sezer, 2003). Kefir hakkındaki bilgilerin, kesin olmamakla birlikte Rusya'da yayınlanan kaynaklarda bulunduğu ve bu kaynakların Almanca'ya çevrilmesiyle Avrupa'ya yayıldığı görüşü öne sürülmektedir (Vinderola vd., 2005). Kefir fermente içeceği, besleyici özelliğinin yanı sıra, fizyolojik özelliğiyle de 20. yüzyılın başlarında Birleşik Devletler, Macaristan, Polonya, Norveç, İsveç, Finlandiya ve Almanya gibi Avrupa ülkelerinde çok tercih edilen bir içecek olmuştur (Libudzisz ve Piatkiewicz, 1990).

2.2.2. Kefirin Mikrobiyolojik Özelliği

Kefir danesinin içerisinde simbiyoz halde yaşayan homofermentatif ve heterofermentatif *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter* türleri ile *Torula*, *Candida* ve *Saccharomyces* maya türlerine ait mikroorganizmalar bulunmaktadır (Angulo vd., 1993; Garrote vd., 2001; Akkuzu, 2005; Farnworth, 2005; Kesmen ve Kaçmaz, 2011; Kok-Tas vd., 2011).

Kefir danelerinde ve kefirde farklı araştırmacıların belirlemiş olduğu maya ve bakteri türleri Çizelge 2.3'de sunulmuştur. Mikroorganizmalar kefir danesinin farklı tabakalarında yer almaktadır. Danenin iç kısmında laktozu fermente edemeyen mayalar bulunurken, dış kısmında laktozu fermente eden mayalar bulunmaktadır. Laktik asit ve asetik asit bakterileri kefir danesinin yüzeyinde yer almaktadır (Guzel-Seydim vd., 2005).

Çizelge 2.3. Kefir ve kefir danelerinde farklı araştırmacıların belirlemiş olduğu bakteri ve maya türleri

Bakteri ve Maya Türleri	Kaynaklar
<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus viridescens</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida kefir</i> <i>Candida holmii</i> <i>Candida friedricchi</i> <i>Candida albicans</i> <i>Torulospira delbrueckii</i>	Angulo vd., 1993
<i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus parakefir</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Garrote vd., 2001

<i>Acetobacter</i> spp.	
<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus acidominimus</i> <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Leuconostoc dextranicum</i> <i>Leuconostoc cremoris</i> <i>Candida sphaerica</i> <i>Candida parapsilopsis</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida kefir</i>	Akkuzu, 2005
<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kok-Tas vd., 2011

Kök-Taş (2010), endüstriyel kullanım amacıyla kefir danesindeki mikroorganizma yoğunluğunu belirlemiştir; *Lactobacillus* içeriğini 9.21-9.28 log kob/mL, *Lactococcus* içeriğini 9.23-9.27 log kob/mL, *Lactobacillus acidophilus* içeriğini 5.78-6.43 log kob/mL, *Bifidobacterium* spp. içeriğini 3.19-6.14 log kob/mL, maya sayısını da 4.71-4.77 log kob/mL olarak tespit etmiştir.

Yaman vd. (2010), inek, koyun ve keçi sütünden yapılan kefirlerin sırasıyla *Lactobacillus* sayısını 7.57, 8.79 ve 8.0 log kob/mL, *Lactococcus* sayısını 9.28, 9.32 ve 8.11 log kob/mL, maya sayısını ise 5.72, 5.86 ve 5.20 log kob/mL belirlemiştir ve koyun sütünden yapılan kefirde mikroorganizma popülasyonunun en yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Dobson vd. (2011), inek sütünden yapılan kefirlerin *Lactococcus* ve *Lactobacillus* içeriğini belirlemiştir. Kefir örneklerinde *Lactococcus* sayısının 7.6×10^4 - 1.1×10^9 ve *Lactobacillus* sayısının ise 3.2×10^5 - 3.7×10^5 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, süt çeşidinin de kefirdeki *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve mayaların sayısı üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

2.2.2.1. Lactococcus

Laktokoklar; yuvarlak şekilli, mezofilik mikroorganizmalardır. Homofermantatiflerdir ve optimum 37 °C'da gelişmektedirler (Williams vd., 1990). *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* olmak üzere *Lactococcus lactis* türleri süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Axelsson, 1998). Kefir danelerinde *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* türleri tespit edilmiştir (Libudzisz ve Piatkiewicz, 1990; Angulo vd., 1993). Ayrıca, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* türü fermente sütlerde sitratı metabolize ederek diasetil üretmekte ve tereyağı aroması sağlamaktadır (Cogan, 1996).

2.2.2.2. Lactobacillus

Laktobasiller; Gram pozitif, genellikle hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde, anaerop veya mikroaerofil bakterilerdir. *Lactobacillus*un yaşlı kültürlerinde ise uzun zincir görünümü gözlenir ve bakteri Gram negatif reaksiyon vermektedir. Laktobasiller 5-55 °C olmak üzere oldukça geniş bir sıcaklık aralığında gelişmekte olup optimum sıcaklığı 37°C'dir. Optimum gelişme pH'sı 5.5-5.8 aralığında bulunmaktadır (Gönülateş, 2008).

Şeker metabolizmalarına göre Laktobasiller; obligat homofermantatif, fakültatif heterofermantatif olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Obligat homofermantatif laktobasiller pentozu fermente edemez iken, hekzozu fermente etmekte ve laktik asit üretmektedir. Fakültatif heterofermantatif laktobasiller; glikoliz yoluyla hekzozu laktik asite ve fosfoketolaz yoluyla pentozu laktik asit, etanol, format ve asetik asite fermente etmektedir. Kesin heterofermantatif laktobasiller ise hekzostan laktat, etanol (asetik asit) ve CO₂ üretmektedir (Kartepe vd., 2012). Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus kefiranofaciens* bakterinin kefiran üreten homofermantatif bir laktobasil türü olduğu ve kefir danelerinden Rogasa- CW agar seçici besiyeri kullanılarak izole edilebileceği belirlenmiştir. Ayrıca, heterofermantatif laktobasil olan *Lactobacillus kefir* kefir danelerinden izole edilerek tanımlanmıştır (Kojima vd., 1993).

2.2.2.3. Bifidobacterium

Bifidobakteriler; Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen anaerobik mikroorganizmalardır. Genellikle % 10 CO₂ içeren ortamda gelişirler, eğri çubuklar şeklinde ve sıklıkla dallanmış görünüme sahiplerdir (Leahy vd., 2005). Bifidobakterlerin en uygun gelişim sıcaklığı insanlarda 36-38 °C ve hayvanlarda 41-43 °C iken optimum pH aralığı 6.5-7.0 arasındadır. Ayrıca, *Bifidobacterium infantis*, *B. breve*, *B. longum* ve *B. adolescentis* bakterileri toksik etkilere karşı mikroorganizmaları koruyan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimini üretmektedir (Fooks vd., 1999; Leahy vd., 2005).

Probiyotik açıdan önemli olan bifidobakterler, sütte bulunan α - kazein proteinini fosfoprotein fosfataz enzimleri ile parçalayarak süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkı sağlamaktadır (Guarner ve Malageld, 2003). Bifidobakteriler bağırsak sisteminde B1, B2, B6, B12, nikotinik asit ve folik asit üretmekte ve vücudun vitamin ihtiyacının karşılanmasına destek olmakta, ince bağırsakta β -galaktozidaz veya laktaz enziminin yeterli miktarda bulunmaması durumunda laktoz intolerans hastalığı görülmesine karşı β - galaktozidaz enzimi üretimi sayesinde laktoz sindirimini iyileştirmektedir (Garsse vd., 2003, Rasic vd., 1983). Bağışıklık sistemi üzerine makrofaj ve antikor üretimi sağlayarak ayrıca antitümör özellik de göstererek etki etmektedir (Garsse vd., 2003).

2.2.2.4. Laktik asit bakterileri

Laktik asit bakterileri; Gram pozitif, genellikle hareketsiz, *Sporolactobacillus inulinus* türü hariç spor oluşturmeyen ve metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır. Kok ve çubuk şeklinde cinsleri bulunmaktadır. Havanın oksijeninde gelişebilen laktik asit bakterileri anaerob veya mikroaerofiliktir (Tekinşen ve Atasever, 1994; Yetişmeyen, 1995).

Fermantasyonda oluşan ürünler bakımından laktik asit bakterileri, homofermantatif ve heterofermantatif olarak sınıflandırılmaktadır. Homofermantatif laktik asit bakterileri fermantasyonla glukozu laktik asite dönüştürürken, az miktarda formik asit, asetik asit ve etanol oluşturmaktadır. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise, laktik asitin yanı sıra yüksek miktarda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluşturmaktadır.

Ayrıca, laktik asit bakterileri; laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür ve bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler üretme yeteneğindedir (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003).

2.2.2.5. Mayalar

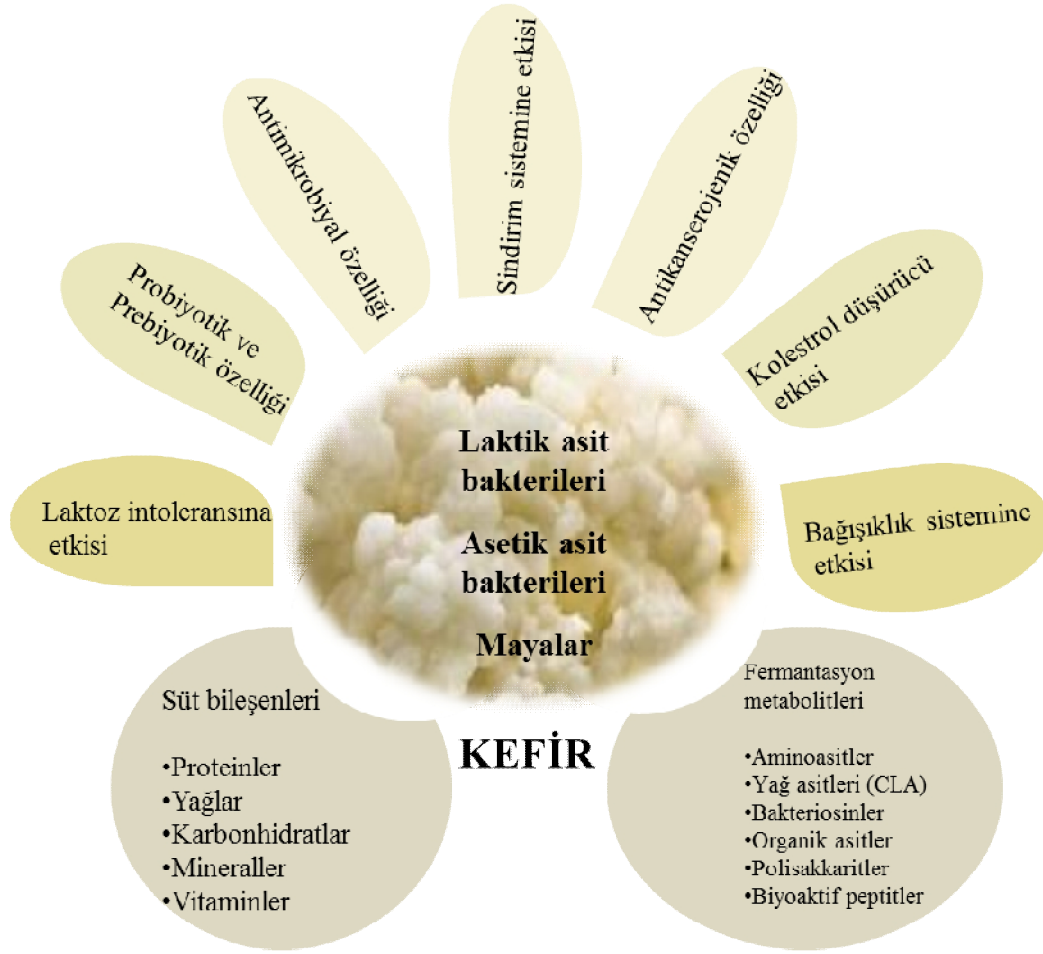
Küresel veya oval şekilli mayalar, fakültatif anaerob tek hücreli mantarlardır. Mayalar ürettikleri CO₂ ile kefirin kendine has lezzet ve aromasının oluşumuna katkı sağlamaktadır (Kartepi vd., 2012). Kefir danesinde laktozu fermente edebilen *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ve *Torula kefir* mikroorganizmaları ile; kefiri fermente edemeyen *Saccharomyces cerevisiae* tespit edilmiştir (Angulo vd., 1993).

2.2.3. Geleneksel kefir üretimi

Evlerde kaliteli bir süte kefir danelerinin ilavesiyle geleneksel kefir üretimi yapılmaktadır (Tamime ve Robinson, 1999). Pastörize edilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuş süte %2 oranında kefir danelerinin ilave edilmesi ve 25°C'da 24 saat inkübe edilmesiyle geleneksel kefir üretilmektedir. Fermantasyon sırasında CO₂'nin etkisiyle kefir daneleri yüzeyde toplanır, üretimden sonra süzülerek kefir daneleri tekrar kullanım için kaynatılmış ve soğutulmuş su ile yıkanır, süt veya su içerisinde buzdolabında saklanır. Danelerinden ayrılmış olan kefir buzdolabında bir gün olgunlaştıktan sonra tüketilmektedir (Seydim, 2001).

2.2.4. Kefirin sağlık üzerine etkisi

Yararlı mikroorganizmaları içeren kefir, sağlık açısından oldukça faydalı bir fermente süt ürünüdür. Araştırma sonuçları kefirin; antikansojen, kolesterol düşürücü, laktoz intoleransına karşı etkili, rahatlatıcı, bağışıklık ve sindirim sistemi üzerinde olumlu özellikleri belirlenmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kefir fermente içeceğinin sağlık üzerine etkileri (Guzel-Seydim vd., 2010; Kök Taş, 2010)

2.2.5. Kefirin probiyotik olarak canlılarda kullanımı

Probiyotikler sağlık için faydalı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. İnsanlarda sindirim sisteminde belirli sayılarda bulunarak bağırsak sistemindeki mikrobiyal dengeyi sağlar ve mukozal ve sistemik bağışıklığı düzenler. En iyi bilinen probiyotik bakteriler; Laktobasiller ve Bifidobakteriler; *Lactobacillus aciophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellebiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Bifidobacter bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilus* türleri ve *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *S. diacetylactis*, *S. intermedius* türleridir (Önganer, 2010).

İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkiye sahip bifidobakterleri içeren süt ürünleri, laktik asit oluşumuna bağlı olarak orta düzeyde asitli olup mikroorganizmalar tarafından üretilen B vitamini ve kısmen hidrolize olmuş protein ve laktozu içermektedir (Yıldırım ve Yıldırım, 2000).

Kefir retiminde starter kültür olarak kullanılan bifidobakterler, bağırsak florası üzerinde olumlu etkiye sahip olmaktadır (Molokeev vd., 1998). Ayrıca, kefir danelerine *L. acidophilus* ve streptokoklar ilave edilerek de kefir üretilmektedir (Falberg, 1987).

2.3. Su rnleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Kullanımı

Probiyotikler genel olarak “intestinal sistemin mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçı hayvanın sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikrobiyal yem destekleyicisi” (Fuller, 1989), veya su ürünleri yetiştiriciliğinde sağlığı geliştirmek amacıyla, gastrointestinal sistem içerisine girerek orada canlı kalan mikrobiyal hücreler” şeklinde tanımlanmaktadır (Gatesoupe, 1999). Bu mikroorganizmalar mide pH’sına dayanıklı özellikte ve sindirim kanalından geçiş sırasında canlılıklarını koruyabilmektedir (Yalçın vd., 1996). Patojen bakterilerin ortamdan azalması, probiyotik bakterilerin besin, yer ve oksijen için rekabete girmesi ve inhibitör madde üretmesiyle sağlanmaktadır (Vaseeharan ve Ramasamy, 2003). Probiyotikler, konakçı bağırsağındaki mikroorganizmaların stabilitesini sağlama, patojenlerin kolonizasyonunu engelleme, bağırsak epitellerini besleyici etkisiyle mukozal bariyerde etkili olma ve ayrıca bağışıklık sisteminin spesifik ve non-spesifik bileşenlerini düzenleme özelliklerine sahiptir (Guarner ve Malagelada, 2003; Tlaskalova vd., 2004; Balcazar vd., 2006; Balcazar vd., 2007). Probiyotikler özellikle lizozim aktivitesini ve eritrosit, lenfosit ve makrofajların sayısını arttırmaktadır (Balcazar vd., 2007; Panigrahi vd., 2007).

Kültürü yapılan akuatik hayvanlarda probiyotiklerin etkileriyle ilgili çalışmaların çoğunda; mortalitenin düştüğü ya da tam tersi yaşama oranının yükseldiği, hastalıklara karşı direnci arttırdığı, patojen olduğu varsayılan organizmalara karşı antogonistik etkilerinin olabildiği, böbrekteki bakteriyel hücrelerin miktarının düşürüldüğü, poliamin üretimi ve sindirim enzim aktivitesi ve hüresel sistemler yoluyla immun sistemi

geliştirdiği vurgulanmaktadır. Ancak, bu konuda yapılan araştırmaların yeterli olmadığı düşünülmektedir (Balcazar vd., 2006).

Probiyotiklerin yararlı etkisi özgül canlı kümelerine karşı doğrudan ters etki olarak gerçekleşir. Bu etki; bağışıklık sisteminin uyarılması, metabolizmayı etkileme ya da sayısal azalmaya neden olmalarıdır (Fuller, 1989).

Probiyotiklerin etki şekliyle ilgili olarak ileri sürülen hususlar şu şekilde sıralanabilir;

- Organik asitler üreterek (özellikle laktik asit) pH'ı düşürmek suretiyle nötr ya da bazik ortamda yaşayan bakterilerin üremelerinin engellerler.
- Redoks potansiyelini düşürürler, böylece aerobik patojenlerin oksijenden yararlanmalarını engelleyerek gelişimlerini durdururlar.
- Bağışıklık sisteminde etkili olurlar. Lenfosit etkinliğini yükseltir, antikor üretimini düzenler, fagosit hücrelerini ve antijen özgül hücrelerini etkinleştirirler.
- Toksik amonyak ve amin üreten mikroorganizmaların çoğalmalarını engelleyerek bu maddelerin birikimini önlerler.
- Sindirim sistemi işlevlerini düzenleyerek yemden yararlanmayı arttırırlar.
- B grubu vitaminleri sentezleyerek sindirime katkıda bulunurlar.
- Selülaz, ksilinaz, lipaz, proteaz, beta-glukanaz ve amilaz gibi sindirimde çok önemli olan enzimleri üretirler. Bu enzimler hayvanın kendi sindirim sisteminden salgılanan enzimlerle birlikte çalışırlar. Bu şekilde yemlerin sindirilebilirliği ve enerji değerinde artış sağlarlar.
- Laktik asit üreten mikroorganizmalar; acidolin, lactocidin, acidophilin, nisin ve diplococcin gibi antibiyotik etkili maddeler ve hidrojen peroksit üreterek zararlı birçok mikroorganizmanın gelişimini durdururlar (Karademir ve Karademir, 2003).

2.3.1. Probiyotiklerin büyüme üzerine etkisi

Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanımı ile ilgili somon balığı (Gildberg vd., 1997), gökkuşağı alabalığı (Nikoskelainen vd., 2001) ve kalkan balığı (Gatesoupe, 1994;

Gatesoupe, 1991) üzerinde yapılan bir çok çalışma mevcuttur. Kalkan balığı larvalarında; rotiferlerden izole edilen laktobasil ve karnobakterilerin (Gatesoupe, 1994) ve basil suşu IP 5832 sporlarının (Gatesoupe, 1991) *Vibrio spp.* suşuna karşı direnç sağladıkları ve alabalıkda büyüme hızını arttırdıkları, *Streptococcus lactis* ve *Lactobacillus bulgaricus* suşlarının ise larvaların hayatta kalmalarını desteklediği (Garcia de la Bandre vd., 1992) tespit edilmiştir.

Bogut vd. (2000), yayın balığının (*Siluris glanis*) 58 gün süreyle 2×10^8 kob/g düzeyinde *Enterococcus faecium* içeren yemlerle besleyerek balıkların büyüme performansındaki değişimi incelenmiş ve probiyotik ilaveli yemlerin daha iyi sonuç verdiğini tespit etmiştir.

Mazurkiewicz vd. (2005), sazan yemlerine üç farklı miktarda (0.5 g/kg; 1.0 g/kg; 1.5 g/kg) probiyotik BIOSAF (*Saccharomyces cerevisiae* suş Sc47'nin ürünü) ilave etmiş ve sazan juvenillerinin büyüme ve yem değerlendirme oranını araştırmıştır. Kontrol grubuna oranla, BIOSAF probiyotikli yemleri 50 gün boyunca tüketen balıklarda daha yüksek ortalama canlı ağırlık artışı gözlenmiştir. Spesifik büyüme oranının BIOSAF içeren yemlerde (1.0 g/kg probiyotik) maksimum ($\% 2.45 d^{-1}$) ve kontrol grubunda minimum ($\% 1.98 d^{-1}$) değerde olduğu saptanmıştır.

El-Haroun vd. (2006), tiliapia (*Oreochromis niloticus*) yavrularını $\% 0.5$, $\% 1.0$, $\% 1.5$ ve $\% 2.0$ oranlarında probiyotik Biogen® içeren yemlerle 120 gün süreyle besleyerek balıkların büyüme performansını ve yemden yararlanma düzeylerini incelemiştir. Deneme sonunda, büyüme performansı ve yemden yararlanmanın, probiyotik ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda probiyotik ilave edilmemiş yemlerle beslenenlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Kumar vd. (2006), *Labeo rohita* türü balıkları *Bacillus subtilis*'in 0.5×10^7 kob/g, 1.0×10^7 kob/g ve 1.5×10^7 kob/g konsantrasyonlarını içeren yemlerle 2 hafta süreyle beslemiştir. Oransal ağırlık artışının *B. subtilis* içeren yemle beslenen balıklarda $\% 35.55$ olduğu belirlenmiştir.

Öztürk (2007), levrek balıklarının beslenmesinde 50 güne kadar yetiştirme suyuna grubuna 10^6 kob/mL ve artemia kültürüne de 10^8 kob/mL oranında *Lactobacillus rhamnosus* kullanmıştır. 50. günden sonra ise 10^9 kob/g düzeyinde toz halindeki probiyotiği yeme ilave edip 2.5 ay boyunca beslenme programına devam etmiştir. Probiyotik uygulamasının farklı dönemlerdeki aylık ağırlık artışına ve yem değerlendirme oranına etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Bagheri vd. (2008), gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*) yavrularını 4.8×10^8 kob/g, 1.2×10^9 kob/g, 2.01×10^9 kob/g, 3.8×10^9 kob/g, 6.1×10^9 kob/g oranlarında *Bacillus* sp. probiyotiği içeren yemlerle beslemiş ve balıkların yem sindirimi, büyüme ve yaşama oranını değerlendirmiştir. En iyi büyüme performansını 3.8×10^9 kob/g düzeyinde probiyotik uygulanan grupların gösterdiği tespit edilmiştir.

Dulluç (2010), tilapia (*O. niloticus*) ve aynalı sazan (*C. carpio*) yavrularının yemine 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 kob/g düzeyinde Bactocell® (*Pediococcus acidilacticum* içeren) ilave ederek 3 ay süresince beslemiştir. Çalışmanın sonunda balık türlerinin her ikisinde de kontrol grubuna kıyasla büyümede istatistiksel olarak önemli bir değişimin olmadığını belirtirken; yem değerlendirme, protein etkinlik oranı ve besin madde sindirilebilirliklerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

2.3.2. Probiyotiklerin bağırsak florası üzerine etkileri

Deniz balıkları vücutlarındaki su kaybını önlemek için devamlı olarak su içmeye zorlanmaktadır ve devamlı olan bu su girişi, sucul ortamın balık üzerindeki etkisini arttırmaktadır. Aynı durum süzerek beslenenlerde, çift kabuklularda, karides larvalarında ve canlı yem organizmalarında da görülmektedir. Bundan dolayı, sucul hayvanların bağırsak ortamı su ve besinden gelen mikroorganizmaların girişiyle çok hızlı değişebilmektedir (Gatesoupe, 1999). Genellikle, balık bağırsaklarından izole edilen bakteriyel türlerin yetiştirme ortamından alınan su örneklerinde de bulunduğu bildirilmektedir (Hansen ve ark.,1992, Gatesoupe, 1999). Bazı araştırmacılar kültür balıklarının bağırsak mikroflorasının doğada yaşayan balıklarinkinden farklı olduğunu ve daha az bakteri türünün bulunduğunu belirtmiştir.

Balık gastrointestinal mikrobiyasının; balığın fizyolojisi, tuzluluk, immünolojik faktörler, diyet ve diyet bileşenlerine göre değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (Ringo ve ark., 1995; Ringo ve Gatesoupe, 1998).

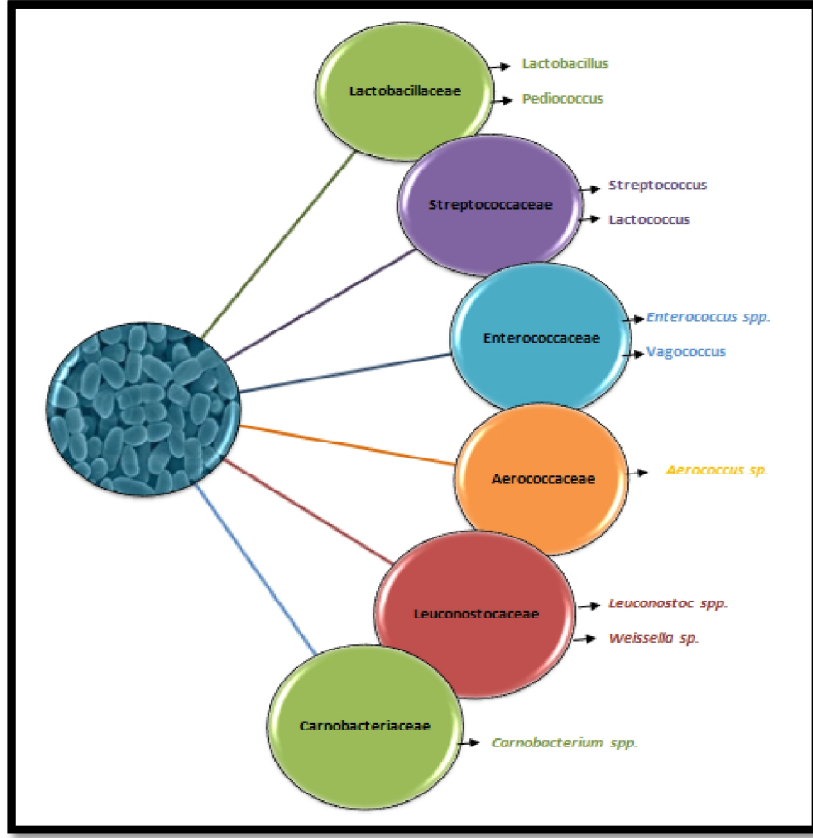
Spanggaard ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada; 3 farklı çiftlikten alınan gökkuşuğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*), bağırsak mikrobiyotaları karşılaştırıldığında büyük bireysel farklılıklar gözlenmiştir. *Carnobacterium spp.* bir çiftlikte belirli bir örnekleme tarihindeki ekimler sonucunda izole edilen bakteriler arasında dominant olarak bulunmuştur. Fakat bu cins diğer örnekleme tarihlerinde ne aynı çiftlikte ne de diğer çiftliklerde tespit edilememiştir (Gatesoupe, 2008).

Bunun üzerine Huber ve ark. (2004) bireylerde mikrobiyota takibini önermişlerdir. Bunun belirli zaman aralıklarında örneklemeyle yapılacağını ve balık bağırsağındaki laktik asit bakterilerinin gerçek insidansını tanımlamanın ancak böyle mümkün olabileceğini belirtmişlerdir.

Hayvanların sindirim sisteminde bulunan bazı yararlı bakterilerin, sistemi, zararlı bakterilerin üremesini engelleyerek koruduğu düşünülmektedir. Buna karşın balıkların gastrointestinal sistemindeki mikrobiyanın rolü tam olarak belirlenememiştir. Ancak balığın beslenme, büyüme ve hastalıklara karşı dayanıklılığında gastrointestinal floranın etkili olduğu bildirilmiştir (Schrijver ve Ollevier, 2000).

Balık mikrobiyasında bulunan *Lactobacillus*'ların, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila* gibi balık patojenlerinin gelişmesini inhibe eden maddeler üretebildiği ve bundan dolayı balık sağlığı için önemli olduğu vurgulanmıştır (Ashraf, 2000; Gomez ve ark.,2000; Katırcıoğlu, 2001).

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin, balık mide ve/veya bağırsaklarında 6 aile (Şekil 2.3) temsilcisinin bulunduğu tanımlanmıştır (Gatesoupe, 2008).



Şekil 2.3. Laktik asit bakterilerinin ihtiva ettiği 6 familya

Salmonidlerin bağırsaklarında 2×10^3 kob/g düzeyinde *Lactobacillus spp.* tespit edildiği bildirilmiştir (Jöborn ve ark., 1997).

Laktik asit bakterisinin yüksek dozda ilavesi bağırsak mikrobiyal flora içeriğinin geçici olarak değişimine neden olmuştur. Bakteri ilavesinin kesilmesinden birkaç gün sonra probiyotik bakterinin sayısının hızla azaldığı görülmüştür (Jöborn ve ark., 1997; Ringo ve Gatesoupe, 1998).

Conway (1996), bir bakterinin çoğalma oranının atılma oranından daha yüksek olması ile gastrointestinal sistemde uzun bir süre kalabildiğini ve bakterinin kolonize olabildiğini belirtmiştir. Laktik asit bakterileri larva ve yavru balık bağırsağında bir kaç gün canlı kalabilmektedir.

Laktik asit bakterileri sucul hayvanlarda doğal intestinal mikroflorada baskın olmadığından, laktik asit bakterilerinin hakimiyetini yapay olarak teşvik etmek amacıyla denemeler yapılmıştır (Verschuere ve ark., 2000).

28 gün boyunca 5×10^7 kob/g *Carnobacterium sp.* (K1 suşu) içeren yemlerle günlük olarak beslenen gökkuşığı alabalıkları, deneme yemiyle beslendiği sürece bağırsaklarındaki probiyotik bakteri sayısında devamlı bir artış gözlemlendiği ve besleme sonrasında maksimum değere ($7,4 \times 10^6$ kob/g bağırsak) ulaştığı tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslemenin kesilmesiyle birlikte bağırsaklardaki bakteri sayısının hızla azaldığı ve 6 gün sonra bağırsaklardan *Carnobacterium sp.*'nin izole edilemediği belirtilmiştir (Robertson ve ark., 2000).

Atlantik salmon bağırsağından izole edilmiş *Carnobacterium sp.* K1 suşunun gökkuşığı alabalıklarının gastrointestinal sisteminde ve suda kalma süreleri araştırılmıştır. Bu amaçla, 5×10^{10} kob/g *Carnobacterium sp.* K1 suşu içeren yemlerle günlük olarak yemlenmişlerdir. Denemenin 1. gününde dışkıdan yapılan ekimlerde probiyotik bakteri üremesi olmamıştır. Dışkıdaki *Carnobacterium sp.* K1 suşu sayısı denemenin 2. gününde $6,0 \times 10^7$ kob/g olarak tespit edilmiş, 7. gününde maksimum değere ($1,3 \times 10^8$ kob/g) ulaşıldıktan sonra probiyotik bakterisiz yem vermeye başlanmıştır. Probiyotik bakteri katkısız yem vermeye başlandıktan sonra bağırsaklardaki bakteri sayısının hızla azaldığı belirlenmiştir (Jöborn ve ark., 1997). Probiyotik bakterilerin konakçıda kalma süreleri ise Çizelge 2.4'de belirtilmiştir.

Gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) da *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 suşunun yem katkı maddesi olarak kullanımının bağırsak florası üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, canlı formdaki *L. rhamnosus* JCM 1136 suşu 10^9 ve 10^{11} kob/g olacak şekilde ticari yemlere ilave edilmiş ve 30 gün boyunca balıklar bu yemlerle beslenmişlerdir. Yemleme süresince balık bağırsaklarında probiyotik bakteri oranının artış gösterdiği tespit edilmiştir (Panigrahi vd., 2004).

Çizelge 2.4. Probiyotik bakterilerin konakçıda kalma süreleri (Gatesoupe, 1999)

Bakteri Türü	Konakçı	Konakçıda Kalma Süresi
<i>Lactobacillus sp.</i>	Japon dil balığı (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	-
Bağırsak bakterisi	Kalkan (<i>S. maximus</i>)	7 gün (15 °C)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Morina (<i>G. morhua</i>)	9 gün (8 °C)
<i>Carnobacterium sp.</i>	Gökkuşluğu alabalığı (<i>O. mykiss</i>)	4 gün (11 °C)

2.3.3. Probiyotiklerin balık patojenleri üzerine etkisi

Laktik asit üreten bakteriler, balığın sindirim sistemine kolonizasyonu ile bu bölgedeki patojenik mikroorganizmaların proliferasyonunu engelleyebilir. Böylece proteolitik bakteriler tarafından meydana getirilen toksinlerin neden olduğu hastalıklardan konakçı korunmuş olur. *Lactobacillus*'lar mikroorganizmaların üremesini engelleyebilecek bileşikler üretebilir. Bu bileşikler hidrojen peroksit, organik asitler ve özel bileşikler olan bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler bakterilere karşıaktif olan bakterisidal veya bakteriyostatik peptidlerdir. Bazı *L. lactis* türleri tarafından üretilen nisin şimdiye kadar en iyi bilinen ve en çok araştırılanıdır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler, *Listeria monocytogenes*, *A. hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* gibi bazı patojenleri inhibe edebilir (Gatesoupe, 1999).

Gramında 10^9 kob/g dozunda *L. rhamnosus* içeren yemlerin, gökkuşluğu alabalıklarını *A. salmonicida* 'nın neden olduğu furunculosis hastalığına karşı koruduğu bildirilmiştir (Nikoskelainen ve ark., 2001).

Salmonun bağırsak sisteminden izole edilen laktik asit bakterilerinin *V. anguillarum* ve *A. salmonicida* 'nın büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir (Katırcıoğlu 2001).

Rotiferlerden izole edilen *Lactobacillus/ Carnobacterium* türü, kalkan larvasının patojenik *Vibrio spp.*'ye karşı dayanıklılığını artırmaktadır. Ticari diyetlere kurutulmuş dondurulmuş olan *C. divergens* ilavesi *A. hydrophila* 'ya karşı salmon yavrularında dayanıklılığı artırmamıştır. Ancak benzer diyet ilavesi *V. anguillarum* 'a karşı Atlantik morina balığında ölüm oranını azaltmaktadır (Nikoskelainen ve ark., 2001).

Bioen kapsüle laktik asit bakterisi ilavesinin kalkan larvalarına verildiğinde canlı kalma düzeylerinde belirgin bir gelişme görülmüştür. Rotiferlere ve artemia larvalarına canlı veya inaktive olup olmadığı dikkate alınmadan *S. lactis* ve *L. bulgaricus* bakterileri ilave edilmiştir. Larval büyümede uygulanan bakteri grupları arasında bir fark olmamasına rağmen kontrol grubuna göre altı kat daha yüksek larval canlı kalma oranı elde edilmiştir (Skjeremo ve Vadstein, 1999).

Atlantik salmon balıklarından izole edilen *Carnobacterium spp.* nin alabalıklarda yapılan *In vitro* çalışmalarında bu bakterinin *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela*, *Streptococcus milleri*, *V. Anguillarum* ve *V. ordalii* 'ye karşı antagonistik etki göstermiştir (Robertson ve ark., 2000).

Lactobacillus spp. DS-12'nin, balık patojeni olan *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella piscicida*, *A. hydrophila* ve *V. anguillarum*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterirken; *Pseudomonas spp.* ve *Streptococcus faecalis* için aynı etkiyi göstermediği belirtilmiştir. (Byund ve ark., 1997).

Probiyotik olarak *L. rhamnosus* kullanımı ile gökkuşağı alabalığı ve kalkan balıklarında *A. salmonicida*, *V. anguillarum* ve *Flavobacterium psychrophilum* gelişiminin inhibe edildiği bildirilmiştir (Nikoskelainen ve ark., 2001).

İnsanlarda probiyotik olarak kullanılan *L. rhamnosus* ATCC 53103 suşunun balıkların immün sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *L. rhamnosus* ATCC 53103 iki hafta süreyle gökkuşağı alabalığı yemlerine ilave edilmiştir. 1, 2, 3 ve 4 hafta süreyle kan ve mukus örnekleri alınmış, yemleme periyodu boyunca yetiştirme suyu ve balık bağırsağında yüksek düzeyde bu bakteri tespit edilmiştir. İkinci haftanın sonunda kan

hücrelerinin komplement aktivitesinin önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak *L. rhamnosus* ATCC 53103 suşunun probiyotik olarak kullanımının gökkuşağı alabalıklarının immün parametrelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Nikoskelainen ve ark., 2003).

Tilapya (*Oreochromis niloticus*) balıklarında *Edwardsiella tarda* infeksiyonuna karşı *L. rhamnosus*'un koruyucu etkisi araştırılmıştır. Mortalitenin probiyotik ilave edilen grupta kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Probiyotik uygulanan grupta komplement aktivitesi önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (Pirarat ve ark., 2006).

Laktik asit bakterileri (*S. lactis* ve *L. bulgaricus*) kalkan larvalarında yem olarak kullanılan *Artemia* kültürüne ilave edilmiştir. Denemenin 17. gününde bakteri uygulanan grupta yaşama oranı % 55, kontrol grubunda ise % 34 olarak bulunmuştur (Verschuere ve ark., 2000).

Austin vd. (2006), doğuştan gelen savunma sisteminin probiyotiklerle desteklenmesi konusunda yaptıkları çalışmada; sağlıklı gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) barsaklarından izole edilen *Carnobacterium maltaromaticum* ve *Carnobacterium divergens* probiyotik olarak denenmiş; *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı yapılan direnç testlerinde başarı göstermiştir. Böylece alabalıklar bu bakterileri 10^7 hücre/ml içeren yemlerle beslenmişler ve yukarıda sayılan patojenlerin virülens suşları ile test edilmişlerdir. Dahası her iki bakteri de uygulamadan 3 hafta sonra bile midede bulunmuşlardır. Bu kültürler balıklarda humoral (salgisal) ve hücrel bağışıklık sistemini güçlendirmişlerdir.

Balıklardaki hastalıklara karşı probiyotiklerin minimum iki hafta kullanımı, direnci arttırmaktadır (Sharifuzzaman ve Austin, 2009a). Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Gram pozitif (*Carnobacterium* sp.) ve Gram negatif (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*) probiyotikler ile 10^7 kob/g düzeyinde iki hafta beslenmesi sonucu; humoral bağışıklığa (serum ya da mukus antikorları) kıyasla selülar bağışıklıkta (eritrositler, makrofajlar ve lenfositler) artış sağlanmıştır (Irianto ve Austin, 2002a).

Nikoskelainen vd. (2001), gökkuşığı alabalıklarında 10^9 kob/g düzeyinde *Lactobacillus rhamnosus* içeren balık yemleriyle beslenen grupların furunculosis hastalığına karşı dirençli olduklarını ve *Lactobacillus* cinslerinin büyüme oranını arttırdığını tespit etmiştir. Ayrıca salmon yavrularında *Carnobacterium divergens*'in kullanımının balıkların *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı dayanıklılığını da arttırdığı gözlenmiştir.

Pirarat vd. (2006), tilapia (*Oreochromis niloticus*) balıklarında *Lactobacillus rhamnosus*'un *Edwardsiella tarda* enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisini incelemiş ve probiyotik ilave edilen grupta kontrol grubuna kıyasla kümülatif mortalitenin önemli düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir.

Öztürk (2007), levrek balıklarının beslenmesinde 50 güne kadar yetiştirme suyuna grubuna 10^6 kob/mL ve artemia kültürüne de 10^8 kob/mL oranında *Lactobacillus rhamnosus* kullanmıştır. 50. günden sonra ise 10^9 kob/g düzeyinde toz halindeki probiyotiği yeme ilave edip 2.5 ay boyunca beslenme programına devam etmiştir. Larval yaşama oranının deneme gruplarında (% 27.4) kontrol gruplarına (% 18.9) kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Vendrell vd. (2008), alabalıklarda *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 ve *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 probiyotik suşlarını 30 gün süreyle 10^7 kob/g düzeyinde balıklara oral yol ile verdikten sonra, balıklara *Lactococcus garvieae* patojeni ile eprüvasyon yapmıştır. Probiyotikle beslenen balıklarda ölüm oranı % 46-54 düzeyindeyken, kontrol grubunda % 78 olarak belirlenmiştir. Probiyotik kullanımının ölüm oranını azalttığı tespit edilmiş ve laktokokosiz kontrolünde etkili olabileceği bildirilmiştir.

Bagheri vd. (2008), gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) yavrularını 4.8×10^8 kob/g, 1.2×10^9 kob/g, 2.01×10^9 kob/g, 3.8×10^9 kob/g, 6.1×10^9 kob/g oranlarında *Bacillus* sp. probiyotiği içeren yemlerle beslemiş ve balıkların yem sindirimi, büyüme ve yaşama oranını değerlendirmiştir ve *Bacillus* probiyotiği içeren yemlerle beslenen deneme gruplarının büyüme ve yaşama oranlarının da olumlu yönde etkilendiği tespit edilmiştir.

Hedayati ve Bagheri (2009), alabalık yavru yemlerine 4.8×10^8 , 1.2×10^9 , 2.01×10^9 , 3.8×10^9 ve 6.1×10^9 kob/g olmak üzere 5 farklı oranda *Bacillus* spp. probiyotik bakterisi ilave etmiş ve balıkları 2 ay süreyle beslemiştir. İlk hafta boyunca ölüm oranında çok azda olsa bir artış olmasına rağmen, probiyotik uygulanan balıklarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek yaşam oranı tespit edilmiştir.

2.4. *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila genellikle çeşitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda hemorajik septisemi ile seyreden hastalığa neden olur. *A. hydrophila*'nın hemorajik septisemi hastalığının etkeni olarak ilk keşfinden bu yana, *A. hydrophila* çok çeşitli tatlı su balıklarından patojen olarak izole edilmiştir.

Bu bakteri birçok tatlı su balığından ve ara sıra deniz balıklarından, sürüngenlerden ve insanlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte en önemli hastalık kültür tatlı su balıklarında meydana gelir. Bakteri tatlı sulara yayılmış bir biçimde, organik materyal içeren dip sedimentlerinde ve balığın bağırsaklarında bulunur (Austin ve Austin, 1989, Cipriano ve Bullock, 2001, Timur ve Timur, 2003).

Bununla birlikte Hazen vd. (1978) tatlı suyun denize karıştığı deniz sistemlerinde ve çok tuzlu sular hariç (>%0 100) her tuzlulukta *A. hydrophila*'nın bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bakteriyel septiseminin klinik bulgularını gösteren balıklarda *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria* izole edilmiştir. Fakat bunlardan en çok izole edilen *Aeromonas hydrophila* olmuştur (Cipriano ve Bullock, 2001, Timur ve Timur, 2003). Türler arasındaki ayırım Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Genellikle türler arasındaki ayırım karbonhidratlar ve diğer biyokimyasal reaksiyonlar temel alınarak yapılır (Çizelge 2.6.). *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria*, çeşitli ayırım faktörleri temel alınarak kolaylıkla birbirinden ayırt edilir. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A.*

sobria türlerinin birbirinden ayrımı Çizelge 3.'de gösterilmiştir (Koneman vd., 1992, Roberts, 1976).

Çizelge 2.5. *Aeromonas hydrophila*'nın biyokimyasal özellikleri

Özellik	Cevap	Özellik	Cevap
Gram	-	Sitrat kullanımı	D
Hareket	+	Nişasta hidrolizi	+
Oksidaz	+	Asit üretimi	
Katalaz	+	Arabinoz	+
MR	-	Fruktoz	+
VP	+	Galaktoz	+
İndol	+	Glukoz	+
Arginin dihidrolaz	+	Gliserol	D
Lizin dekarboksilaz	D	İnositol	-
Ornitin dekarboksilaz	-	Laktoz	D
B-galaktosidaz	+	Maltoz	+
H ₂ S	+	Mannitol	+
5-37 ⁰ C'de üreme	+	Ramnoz	-
%6 tuzlulukta üreme	-	Salicin	+
B-Hemoliz	+	Sorbitol	-
Eskulin hidrolizi	+	Sukroz	+
Jelatin hidrolizi	+	Trehaloz	+
Üreaz	-	Ksiloz	-

(+): pozitif, (-): negatif, D: değişken

Çizelge 2.6. *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* ve *Aeromonas caviae* suşlarının ayırımı

Karakteristik	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
Hareket	+	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+	-
KCN broth'da üreme	+	+	-
Arginin dihidrolizi	+	+	-
Lizin dekarboksilaz	+	-	+
Arabinoz kullanımı	+	+	-
Salicin fermantasyonu	+	+	-
Asetoin üretimi(VP test)	+	-	+
Glukozdan gaz üretimi	+	-	+
Sistinden H ₂ S üretimi	+	-	+
B-hemoliz	+	-	+
(+): pozitif, (-): negatif			

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme balıkları

Çalışmada, büyüme parametreleri için ortalama ağırlıkları $0,12\pm 0,00$ g olan 900 balıkve eprüvasyon denemesi için ortalama ağırlıkları $6,5\pm 0,019$ g olan 225 adet gökkuşağı alabalığı yavrusu kullanılmıştır. Deneme balıkları Isparta'nın Aksu ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden temin edilip, oksijen takviyeli taşıma tankı ile canlı olarak nakledilmiştir. Gelen balıklar havuzlara yerleştirilmeden önce Kloramin - T (8-10 mg/L) ile dezenfeksiyona tabi tutulmuştur. Temin edilen balıkların enfeksiyon geçirmemiş ve daha önce aşı yapılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Balıklar iki hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Balıklarda, herhangi bir taşıyıcı enfeksiyon varlığı ve parazit varlığının tespiti için havuz içerisinden rastgele seçilen 10 adet balık muayene edilmiştir. Deneme öncesi adaptasyona tabi tutulan balıklar da hastalığa dair herhangi bir klinik semptom görülmemiştir. Alınan örneklerden yapılan muayenede endo-ekto parazitin bulunmadığı saptanmıştır. Ayrıca bakteriyolojik inceleme için alınan balık örneklerinden vasatlara ön böbrek ve karaciğer gibi bazı viseral organlardan ekim yapılmış ve balıkların patojen bir bakteri taşımadıkları tespit edilmiştir.

3.1.2. Deneme yeri

Araştırma, Haziran - Ağustos 2013 tarihleri arasında, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Üretim Tesisinde, deneysel enfeksiyon uygulamaları ise Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Araştırma Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Araştırmada kullanılan balık tankları

Çalışma boyunca $3\times 1\times 0,5$ m ebatlarındaki fiberglas tanklar kullanılmıştır. Denemeye başlamadan önce tanklar sodyum hipoklorit kullanılarak dezenfekte edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi

Denemede, 12 L/dk debiye sahip artezyen suyu kullanılmıştır. Deneme esnasında kullanılan sudan periyodik olarak sıcaklık, O₂ ve pH ölçümleri yapılmıştır. Ortalama sıcaklık 12 °C, çözülmüş oksijen 7.54 mg/L ve pH 7.2 olarak tespit edilmiştir.

3.1.5. Denemede kullanılan kefir

Deneme yemlerinde kullanılan kefir, Süleyman Demirel Üniversitesi Teknokenti bünyesindeki Danem Ltd. Şti.'den temin edilmiştir. Kefir, kefir daneleri kullanılarak üretilmiştir.

3.1.6. Denemede kullanılan yemler

Araştırmada %55 ham protein, %15 ham yağ ve 4200 Kcal/kg sindirilebilir enerji içeren ticari gökkuşuğu alabalığı yavru yemi kullanılmıştır. Denemenin başlangıcında 500-800µ yem, ilerleyen dönemlerde 1mm yem kullanılmıştır. Deneme için ticari yeme % 2 ve % 10 oranında kefir ilave edilerek yemler hazırlanmıştır. Ticari yem kontrol yemi olarak kabul edilmiştir. Denemede kullanılan ticari alabalık yeminin temel kompozisyonu Çizelge 3.1'de verilmiştir. Deneme süresince aylık olarak hazırlanan kontrol yemi ve kefirli yemler +4 °C sıcaklıkta depolanmıştır.

Çizelge3.1. Denemede kullanılan temel alabalık yeminin (*) ticari ürün etiketine göre besin madde içeriği

Besin Maddeleri	Değer
Ham protein	>55 (%)
Ham yağ	>15 (%)
Ham selüloz	<2 (%)
Ham kül	<12 (%)
Nem	<10 (%)
Sindirilebilir enerji	4200 Kcal/kg
Na	0.2-1
Lysine	>2 (%)
Methionine	>1,6 (%)
Cystine	0.2 (%)
Vit-A	18000 IU/kg
Vit-D3	2000 IU/kg
Vit-E	250 IU/kg
Vit-C	30 mg/kg
Vit-B2	100 mg/kg
Vit-B12	0.03 mg/kg
Vit-K	12 mg/kg
Inostiol	100 mg/kg
Choline	0.5 mg/kg

*Yem hammadde içeriği: Balık unu, tam yağlı soya, soya küspesi, buğday unu, balık yağı, ekstrude yemlere özel vitamin ve mineral, küf önleyici, antioksidanlar

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kefirli yemlerde mikrobiyolojik analizler

Deneme boyunca çeşitli periyotlarla hazırlanan kefirli yemlere yapılan mikrobiyolojik analizler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge3.2. Analiz edilen mikroorganizmaların inkübasyon şartları

Mikroorganizma	Besi Yeri	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	İnkübasyon Süresi (gün)	% 6 CO ₂
Lactococcus	M17	37	3	+
Lactobacillus	MRS	37	3	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS-S	37	3	+
<i>Bifidobacterium</i> spp.	MRS-NNLP	37	3	+
Maya	PDA	25	5	-
Toplam Bakteri	PCA	32-35	2	-

***Lactococcus* spp.** : Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kaplarına pipetlendikten sonra, 45 °C'a kadar soğutulmuş 15 mL M17 Agar (Merck Kat #) petri kutusuna ilave edilmiştir. İnkübasyon 37 °C'da, 3 gün, % 6 oranında CO₂ içeren inkübatörde yapılarak, 30-300 koloni bulunduran petrilerde sayımlar yapılmıştır.

***Lactobacillus* spp.** : Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kaplarına pipetlendikten sonra, 45 °C'a kadar soğutulmuş 15 mL MRS Agar (Merck Kat #) petri kutusuna ilave edilmiştir. İnkübasyon 37 °C'da, 3 gün, % 6 oranında CO₂ içeren inkübatörde (CO-150, New Brunswick Scientific, ABD) yapılarak, 30-300 koloni bulunduran petrilerde sayımlar yapılmıştır.

***Lactobacillus acidophilus*:** Kefir örneklerinde *L. acidophilus* kolonilerini saymak amacıyla MRS-D Sorbitol (Sigma, S1876-500G) agar kullanılmıştır. % 10 oranında hazırlanan sorbitol 0.43 µm'lik steril filtreden geçirilerek, 50 °C'a kadar soğutulmuş MRS Agar içerisine ilave edilip karıştırılmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kutularına inoküle edilmiş ve üzerine 15 mL MRS - Sorbitol agar eklenmiştir. İnkübasyon işlemi 37 °C'da, 3 gün, % 6 oranında CO₂ içeren inkübatörde gerçekleştirilerek, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

***Bifidobacterium spp.*:** Kefir örneklerinde *Bifidobacterium spp.* kolonilerini saymak amacıyla MRS - NNLP agar seçici besiyeri kullanılmıştır. NNLP karışımı, neomisin sülfat (Merck) (100 mg/L), nalidisik asit (Merck) (50 mg/L), lityum klorit (Merck) (3000 mg/L), paronomisin sülfat (Merck) (200 mg/L) tartılarak, üzerine 100 mL saf su ilave edilmiş ve 35 °C sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Hazırlanan karışım 0.43 µm'lik steril filtreden geçirilerek % 20 oranında MRS agar içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan örnek dilüsyonlardan 1 mL steril petri kutularına inoküle edilmiş ve üzerine 45 °C'a kadar soğutulmuş 15 mL MRS - NNLP agar ilave edilmiştir (Ozer vd., 2008). İnokülasyon 37 °C'da, 3 gün, % 6 oranında CO₂ içeren inkübatörde yapılarak, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

Maya - Küf Sayımı: Hazırlanan dilüsyonlardan 1 mL örnek steril petri kutularına inoküle edilmiş ve üzerine 45 °C'a kadar soğutulmuş PDA (Potato Dextrose Agar, Merck)'dan 15'er mL ilave edilmiştir. Dökümden önce petrilere bakteri gelişimini engellemek için besi yeri şişesine % 4 oranında hazırlanan laktik asitten % 1.4 oranında ilave edilmiştir. 25 °C'da 5 gün inkübasyondan sonra, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

Toplam Mezofilik Aerop Mikroorganizma Sayımı: Kefirde ve kefirli yemlerdeki genel bakteri sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck) kullanılmıştır. Dökme plak yöntemiyle ekim yapılan petrilere 30 °C'da 48 saat inkübe edildikten sonra, 30-300 koloni bulunduran petrilere sayımlar yapılmıştır.

3.2.2. Kefirli yemlerin hazırlanması

Deneme boyunca kullanılan kefir ilaveli ticari alabalık yavru yemleri, aylık olarak taze hazırlanmıştır. Kefirli yemlerin hazırlanmasında, ticari bir markanın granül (başlangıçta 500-800µ ileriki dönemlerde ise 1mm) alabalık yavru yemi kullanılmıştır. Yem yapımı için üretilen kefir bekletilmemiş, olgunlaşma sürecinin hemen sonrasında mikrobiyal analizler yapılarak balık yemlerine % 2 ve % 10 oranlarında karıştırılmıştır. Granül yemler sanayi değirmeninde öğütülmüş, öğütülen yemlere belirlenen oranlarda kefir ilave edilerek % 40 oranında su eklenmiş ve kıyma makinasından geçirilerek tekrar peletlenmiştir. Kefir ilave edilmeyen kontrol yemi de aynı şekilde öğütülüp, % 40 oranında su eklenerek tekrar peletlenmiştir. Peletlenen yemler serilerek, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan yemler havanda dövülerek balığın ağız açıklığına uygun boyutlara getirilmiştir. Bu işlemde yemler dövüldükten sonra birkaç farklı elek kullanılarak eilenmiş, ağız açıklığına uygun yem elde edilmiştir. Ayrıca her yem yapımından sonra, kuruyan yemlerin mikrobiyal ve analizleri yapıp, hazırlanan yemlerdeki mikrobiyal yük tekrar belirlenmiştir.

3.2.3. Deneme planı ve balıkların kefirli yemle beslenmesi

Deneme; büyüme parametrelerinin ve eprüvasyonun belirlenmesi amacıyla iki ayrı şekilde kurulmuştur. Her iki deneme planı da 3 grup ve her grup için 3 tekerrür olacak şekilde kurgulanmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge3.3. Deneme planı

Deneme Grupları	Balık Sayısı/Grup	Tekrar Sayısı	Toplam Balık Sayısı	Deneme Süresi
Flora veBüyüme Çalışması				
Kontrol (%0)	100	3	300	Büyüme ve flora çalışması- 15 günde bir boy ve ağırlık ölçümleri, 15 günde bir bağırsak florası ekimleri
%2	100	3	300	
%10	100	3	300	
Eprüvasyon Çalışması				
Kontrol (%0)	25	3	75	Eprüvasyon- 30. Günün sonunda <i>Aeromonas hydrophila</i> uygulaması
%2	25	3	75	
%10	25	3	75	

Büyüme parametrelerinin belirlenmesi için, her grupta 100 balık, toplamda 900 balık; eprüvasyon belirlenmesi için ise her bir grupta 25 balık, toplamda 225 balık kullanılmıştır (Çizelge 3.3.). Her iki ayrı deneme gruplarında 1.grup kontrol yemiyle, 2.grup % 2 oranında kefir ilave edilen yemle, 3.grup % 10 oranında kefir ilave edilen yemle beslenmiştir. Farklı oranlarda hazırlanan kefirli balık yemleri büyüme parametrelerinin araştırıldığı deneme grubuna 90 gün, eprüvasyon uygulanan deneme gruplarına ise 30 gün boyunca verilmiştir. Araştırmada balıklar deneme başlangıcında günde 4 kere vücut ağırlıklarının %7'sibeslenmişlerdir. Daha sonraki dönemlerde deneme gruplarındaki balıklara *adlibitum*metotla besleme uygulanmıştır.

3.2.4. Bağırsak florasının tespiti

Gökkuşığı alabalığı yavrularının bağırsak florasının tespiti için, 15 günde bir, gruplardaki her tekerrürden 2 balık steril petri kaplarına aktarılmıştır. Vücut yüzeyleri

%70'lik etil alkol ile silinmiştir. Steril bir bistüri bıçağı ile larva döneminde 0,1 gr, yavru döneminde 1 g örnek alınıp 9 ml peptonlu su içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizattan 1/10 seyreltme oranına dikkat edilerek 10^{-7} dilüsyonlara kadar seyreltme yapılmıştır. Kefirin ihtiva ettiği probiyotik bakteriler için spesifik besiyerleri kullanılarak (MRS agar, MRS-Sorbitol Agar, M17 agar, MRS-NNLP agar), total bakteri için PCA, maya ve küf için ise PDA kullanılarak uygun sıcaklık ve şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde gelişen kolonilerin sayımı yapılmıştır (Collins, 1970).

3.2.5. Virülens Tespiti ve *Aeromonas hydrophila* patojeninin LD₅₀ dozunun belirlenmesi

Kullanılacak *Aeromonas hydrophila* suşunun belirlenmesi için fakültemizde bulunan 5 farklı *A. hydrophila* suşu arasından seçim yapabilmek için her suşlar (Kayseri, FTdal1, AH4, AH16, AH94) 10 balıkta denenmiş ve en yüksek mortalite gösteren suş seçilmiştir. *Aeromonas hydrophila* patojenin %50 mortalite yapan bakteri sayısı, LD₅₀ oranını saptamak için her biri 10 ar balıktan oluşan iki guruba iki farklı doz uygulanmıştır. Deneysel enfeksiyon çalışmaları neticesinde elde edilen LD₅₀ sonucu logaritmik eğri analizi ile (Curve Expert 1.1) $3,66 \times 10^5$ bakteri/ml olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Balıklara eprüvasyon uygulaması

Farklı oranlarda kefir ilave edilen yemlerle beslenen alabalıkların motil aeromonas septisemi hastalığına karşı direnç sağlayıp sağlamadığını belirlemek için, tüm gruplara 30. günün sonunda eprüvasyon uygulanmıştır. Bu amaçla anestezi yapılan balıklara önceden LD₅₀ dozu belirlenmiş olan (3.66×10^5 kob/mL) *Aeromonas hydrophila* ayrı ayrı intraperitoneal (i.p) olarak 0.1 mL dozunda verilmiştir. Enjeksiyondan sonra 30 gün süreyle balıklar takip edilerek ölüm oranları kaydedilmiştir. Ölen balıklardan triptik soy agara (TSA) ekimler yapılarak ölümlerin hastalık oluşturan patojenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı reizolasyon yapılarak belirlenmiştir. Kefirin balıklarda sağladığı nispi hayatta kalma oranı (RPS) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Divyagnaneswari vd., 2007).

RPS= [1- (Uygulama grubunda mortalite oranı % / kontrol grubunda mortalite oranı %)] × 100

3.2.7. Büyüme performansı ve yemden yararlanma değerlerinin hesaplanması

3.2.7.1. Büyüme parametrelerinin hesaplanması

Araştırmada canlı ağırlık ve boy olarak büyüme; mutlak oransal ve spesifik büyümenin hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir. Büyüme parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Çetinkaya, 1995; Hoşsu vd., 2001).

- **Canlı Ağırlık Artışı** (CAA, g) = Deneme Sonu Ortalama Balık Ağırlığı- Deneme Başı Ortalama Balık Ağırlığı
- **Yüzde Canlı Ağırlık Artışı** (YCAA, %) = [(Deneme Sonu Ortalama Balık Ağırlığı- Deneme Başı Ortalama Balık Ağırlığı)/ Deneme Başı Ortalama Balık Ağırlığı] ×100
- **Spesifik Büyüme Oranı** (SBO, % gün⁻¹) = 100 × [(ln Son ağırlık - ln Başlangıç Ağırlık)/Gün]

3.2.7.2. Kondüsyon faktörünün hesaplanması (KF)

Kondüsyon faktörü (KF) canlı ağırlığın (W,g), total boyun (L,cm) küpüne oranının yüzdesi olarak,

- $KF = (W/L^3) \times 100$ şeklinde ifade edilen formülden hesaplanmıştır.

3.2.7.3. Yem değerlendirme oranının hesaplanması (YDO)

Yem değerlendirme oranı (YDO), deneme süresince verilen toplam yemin (g), kazanılan toplam canlı ağırlığa (g) oranından hesaplanmıştır.

- Yem Degerlendirme Oranı(YDO)= Alınan Yem (g) / Vücut Ağırlık Kazancı (g)

3.2.7.4. Protein etkinlik oranının hesaplanması (PER)

Protein etkinlik oranı (PEO) deneme periyodunda kazanılan canlı ağırlığın (g) yemle alınan ham protein oranından hesaplanmıştır.

- $PEO = [\text{Canlı ağırlık kazancı (g)} / \text{Yemdeki protein (g)}] \times 100$

3.2.7.5. Yaşama oranının hesaplanması (YO)

Yaşama oranı (YO), deneme sonunda tankta kalan balık sayısının (Ns) deneme başındaki balık sayısına (Nb) oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

- Yaşama Oranı (YO, %)= $(Ns / Nb) \times 100$

3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar

Denemede elde edilen veriler (büyüme değerleri, yem dönüşüm oranları gibi) SPSS 17.0 paket programında Anova testi ile değerlendirilmiştir (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Denemede incelenen çeşitli parametrelerin önem derecelerini karşılaştırırken Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmış ve önem düzeyi $p < 0.05$ olarak seçilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Farklı formlarda kefir ilave edilen alabalık yemlerinin mikrobiyolojik analizlerine ilişkin bulgular

Doğal kefir ile hazırlanmış yem örneklerinde *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., maya ve toplam mikroorganizma içeriklerinin Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge4.1. Kefirli yemlerin mikrobiyal analiz sonuçları (log kob/g)

	Lactococcus	Lactobacillus	<i>L.acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Maya	Toplam Mikroorganizma
(%2)	7.02±0.00	7.09±0.00	7.50±0.45	3.30±0.04	3.34±0.20	7.60±0.01
(%10)	8.12±0.00	8.35±0.00	9.18±0.01	3.14±0.00	1.00±0.12	8.97±0.45
Kontrol Yemi	0	0	0	0	0.50±0.01	4.08 ±0.01

4.2. Deneysel Olarak *Aeromonas hydrophila* İle Enfekte Edilen Balıkların Nispi Yaşama Oranı (RPS) Bulguları

Farklı oranlarda kefir ilave edilen yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalığı yavrularına, denemenin 30. gününde $3,66 \times 10^5$ hücre/mL dozunda (LD₅₀) *Aeromonas hydrophila* bakterisi uygulanmıştır. *Aeromonas hydrophila* ile eprüvasyon yapılan gruplarda ise en yüksek ölüm oranı kontrol grubunda tespit edilmiştir. *Aeromonas hydrophila* verilen deneme gruplarında nispi yaşama oranına bakıldığında en yüksek değer % 2 kefir ilave yemle beslenen balık grubunda bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge4.2. *Aeromonas hydrophila* patojeniyle enfekte edilmiş alabalık yavrularında kontrol grubu ve diğer gruplara ait ölüm ve yaşama oranları

Gruplar	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite (%)	Yaşama Oranı	RPS
%2 Kefir	75	18	24	76	46
%10 Kefir	75	43	57	43	9
Kontrol	75	39	52	48	

4.3. Deneme Grubu Balıkların Deneme Başı Ve Deneme Sonu Büyüme Parametrelerine İlişkin Bulgular

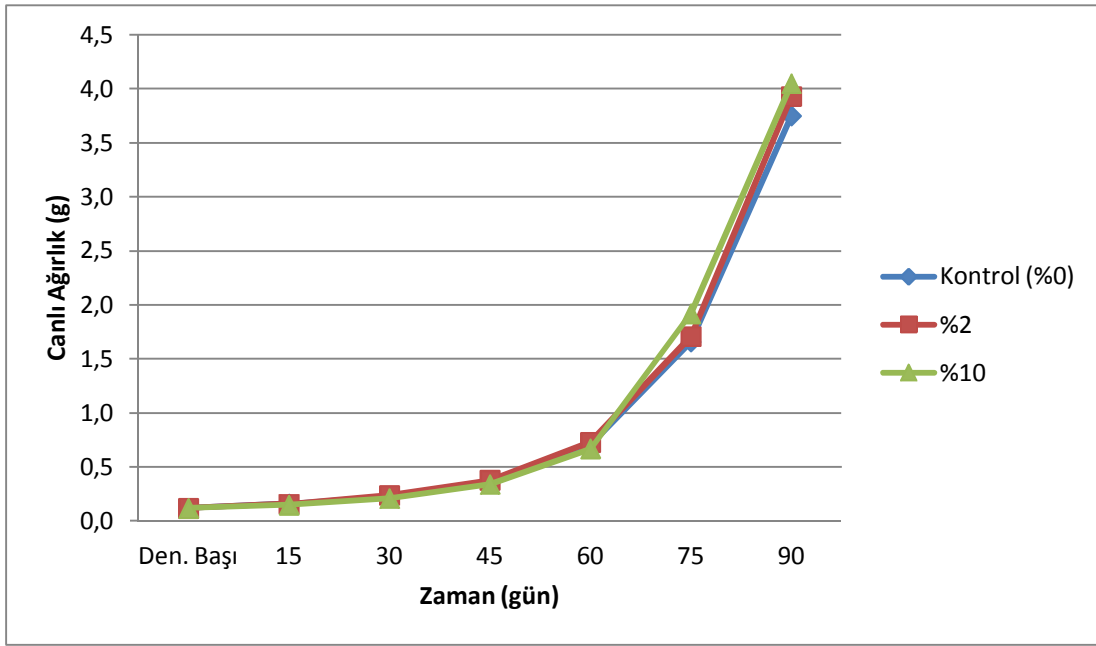
4.3.1. Canlı ağırlık olarak büyüme bulguları

Araştırmada kullanılan % 55 ham protein, % 15 ham yağ ve 4.200 Kcal/kg sindirilebilir enerji içeren ticari gökkuşağı alabalığı yavru yemine farklı oranlarda kefir ilave edilmiş ve yemlerle beslenen gökkuşağı alabalığı yavrularında 15 günde bir ölçülen canlı ağırlık ortalamaları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının dönemlere göre ağırlık ortalamaları (g)

Deneme Grupları			
Dönemler	Kontrol (%0)	%2	%10
Den. Başı	0.12±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00
15. gün	0,16±0.02	0.16±0.00	0.15±0.00
30. gün	0,23±0.00	0.24±0.00	0.21±0.00

45. gün	0.37±0.02	0.38±0.01	0.34±0.00
60. gün	0.71±0.05	0.73±0.04	0.67±0.03
75. gün	1.66±0.21	1.71±0.16	1.92±0.12
90. gün	3.75±0.56	3.93±0.43	4.05±0.02



Şekil 4.1 Farklı oranlarda kefir ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalıklarının dönemlere göre ağırlık ortalamaları

Denemede, başlangıç ağırlık ortalamaları 0.12 ± 0.00 g olan yavru gruplarında 75. güne kadar %10 kefirle beslenen grupta ağırlık artışı kontrol ve %2 kefirli yemle beslenen gruba göre daha düşük olmasına rağmen 90. günde en iyi büyüme oranı $4,05\pm 0.02$ g ile %10 deneme grubu balıklarında görülmüş, bu grubu sırasıyla alabalık yemi içerisine % 2 kefir ilave edilen yemlerle ve kontrolyemi ile beslenen balık grupları takip etmiştir. Yapılan istatistikî analiz sonucu gruplar arasında ağırlık artışı ile ilgili olarak herhangi bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).