

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PROBİYOTİK ÜRÜNLERİN ÇİPURA (*Sparus aurata*) LARVA
KÜLTÜRÜNDE KULLANIMI: BÜYÜME PARAMETRELERİ
VE ENZİMATİK AKTİVİTE**

Nihan ARIĞ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cüneyt SUZER

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 504.04.01

Sunuş Tarihi : 07.09.2012

Bornova-İZMİR

2012

Sayın Nihan ARIĞ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “İki Farklı Ticari Probiotik Ürünün Çipura (*Sparus aurata*) Larva Kültüründe Kullanımı: Büyüme Parametreleri ve Enzimatik Aktivite Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.09.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Cüneyt SUZER.....
Raportör Üye : Doç. Dr. Deniz ÇOBAN.....
Üye : Prof. Dr. Kürşat FIRAT.....

ÖZET**PROBİYOTİK ÜRÜNLERİN ÇİPURA (*Sparus aurata*) KÜLTÜRÜNDE
KULLANIMI: BÜYÜME PARAMETRELERİ VE ENZİMATİK
AKTİVİTE**

ARIĞ, Nihan

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Cüneyt SUZER
Eylül 2012, 45 sayfa

Bu çalışmada çipura larva kültüründe probiyotik bakterilerin kullanım olanakları ve larval dönem üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yeşil su tekniğinde 3 tekrarlı sürdürülen denemeler kapsamında çipura larvalarının ilk 20 günlük besleme döneminde canlı yeme ve tank ortamına *Bacillus* sp. grubu probiyotik uygulaması yapılmış ve 40 gün boyunca büyüme parametreleri ile sindirim enzim aktiviteleri izlenmiştir. Çipura larvalarında deneme sonunda 40. günde elde edilen sonuçlar incelendiğinde total boy deneme grubunda 21.12 ± 1.8 mm, ağırlık 28.12 ± 2.3 mg, spesifik büyüme oranı 7.8 %/gün ve yaşama oranı da %16.7 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 40. günde total boy 17.03 ± 1.2 mm, ağırlık 24.28 ± 2.7 mg, spesifik büyüme oranı 7.1 %/gün ve yaşama oranı da %8.2 olarak bulunmuştur. Büyüme parametreleri açısından deneme grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Bununla birlikte, eksojen besin alımı ile eş zamanlı olarak pankreatik sekresyon tespit edilmiş ve en yüksek alkaline proteaz aktivitesi deneme grubunda 145.2 ± 13.2 mU/mg protein⁻¹ ölçülmüştür. Alkaline proteaz aktivitesi açısından deneme grubu ile kontrol grubu arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Fonksiyonel mide oluşumu ve asit proteaz aktivitesi larvalarda 35. günde tespit edilirken denemeler sonunda deneme grubu ile kontrol grubu arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Sonuçta, çipura larvalarında *Bacillus* sp. grubu bakterilerin çipura larva üretiminde kullanımının olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Çipura, larva, probiyotik, *Bacillus* sp., sindirim enzimleri.

ABSTRACT**THE USING OF PROBIOTICS IN SEA BREAM (*Sparus aurata*)
LARVICULTURE: GROWTH PARAMETERS AND ENZYME
ACTIVITY**

ARIĞ, Nihan

MSc in Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cüneyt SUZER

September 2012, 45 pages

In this study, using properties and beneficial effects of probiotics have been investigated in sea bream larviculture. Larval culture was triplicated in green water technique. *Bacillus* sp. probiant have been administrated both for live food rotifer and also culture environment during the first 20 days and also growth parameters and digestive enzyme activities were examined until on day 40. At the end of the experiment, total length, weight, specific growth rate, and survival rate were determined as 21.12 ± 1.8 mm, 28.12 ± 2.3 mg, 7.8 %/day, and 16.7%, respectively. In control group, these parameters were estimated as 17.03 ± 1.2 mm, 24.28 ± 2.7 mg, 7.1 %/day, and 8.2%, respectively. There is no significant differences in growth parameters between experimental and control group ($p > 0.05$). However, pancreatic secretion was firstly detected concurrently with starting of exogenous feeding and also the peak of alkaline protease was determined in experimental group as 145.2 ± 13.2 mU/mg protein⁻¹. Significant differences were found in specific activities of alkaline protease between experimental and control group ($p < 0.05$). Formation of functional stomach and acid protease activities was firstly detected on day 35 but there is no significant differences between experimental and control group ($p > 0.05$). As a result, it is determined that using of probiotics has some remarkable and beneficial effects in sea bream larviculture.

Keywords: Sea bream, larvae, probiotic, *Bacillus* sp., digestive enzymes.

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca her koşulda yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, manevi desteğini her zaman hissettiğim sayın hocam Doç. Dr. Cüneyt SUZER'e,

Tez sürecimde yardımlarını, fikirlerini esirgemeyen meslektaşım ve eşim Mustafa ARIĞ'ya,

Tez çalışmam yanı sıra meslek hayatımda büyük emeği olan dostum, meslektaşım Burhan BAĞCI'ya

Çalışmam süresince tecrübeleriyle isteklerimi yanıtsız bırakmayan, manevi olarak her zaman yanımda hissettiğim ve beni daima yüreklendiren sayın hocam Doç. Dr. Fatih BAŞARAN'a ve Nektar Yem A.Ş. çalışanlarına,

Çalışmamın yürütülmesinde sahip oldukları imkanları kullanmamı sağlayan üretim müdürü Alaaddin ÖZKARA nezninde tüm Kılıç Holding Ören Deniz Ürünleri A.Ş. çalışanlarına,

Tezimin hazırlanması esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Alize GÖKVARDAR'a

Ne koşulda olursa olsun beni yalnız bırakmayan AİLEME sonsuz teşekkürler.

Nihan ARIĞ

Eylül, 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	3
2.1 Çipura Balığının Biyolojik Özellikleri	3
2.2 Çipura Larva Yetiştiriciliği	5
2.2.1 Prelarval Dönem	5
2.2.2 Postlarval Dönem	6
2.3 Probiotik	7
2.3.1 Probiotik Bakteri Seçimi	8
2.3.2 Probiotiklerin Etki Mekanizması	8
2.3.3 Probiotik Olarak Kullanılan Türler.....	9
2.4 Enzimler.....	10
2.4.1 Enzimin Tanımı	10

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2 Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri.....	11
2.4.3 Enzimleri Aktivitesini Etkileyen Faktörler	12
2.4.4 Sindirim Enzimleri	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1 Larval Üretim	16
3.2 Deneme Düzeni ve Ölçümler	18
3.3 Enzim Analizleri	22
3.3.1 Alkalın Proteaz Analizleri.....	22
3.3.2 Asit Proteaz Analizleri	23
3.4 İstatistik	24
4. BULGULAR.....	25
4.1 Büyüme Parametreleri.....	25
4.2 Enzim Aktiviteleri.....	26
4.2.1 Alkalın Proteaz Aktivitesi	26
4.2.2 Asit Proteaz Aktivitesi	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	29
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çipura balığının genel görünüşü	3
2.2 Çipura balığının dağılım alanları.....	4
2.3 Enzimlerin genel çalışma prensibi.....	10
2.4 Enzim-substrat mekanizması.....	11
3.1 Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş. Ören Kuluçkahane Tesisi	14
3.2 Larval üretimde kullanılan deneme tankları.....	14
3.3 Çipura larvasında ağız açılımı	15
3.4 Denemede kullanılan canlı yemler	16
3.5 Bactosafe inkübasyon süreci	18
3.6 Bactosafe'in mikroskopik görüntüsü.....	18
3.7 Bactosafe ile beslenmemiş – Bactosafe ile beslenmiş rotifer.....	19
3.8 Çipura larvasından sindirim tüpünün çıkarılışı	21
3.9 Çipura larvasının izole edilmiş sindirim tüpü	21
4.1 Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen total ağırlık değişimleri	25
4.2 Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen alkalın proteaz aktivitesindeki değişimler.....	26
4.3 Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen asit proteaz aktivitesindeki değişimler	27

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 <i>Bacillus sp.</i> Uygulanmayan çipura larvasında mide ve bağırsakta protein yapıların dağılımı	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Balıklarda kullanılan bazı probiotik bakteriler	9
2.2 Mide ve pankreastan proenzim halinde sentezlenen başlıca proteolitik enzimler	13
3.1 Denemede kullanılan mikropartikül yemin besin madde içeriği.....	17
3.2 Çipura larva üretim protokolü	20
5.1 Akuakültürde balıklarda ve kabuklularda kullanılan probiotikler	34

1. GİRİŞ

Deniz balıkları kültüründe son yıllarda artan çevresel duyarlılık başta olmak üzere her geçen gün yeni akuatik patojen mikroorganizmaların identifikasyonu zorlaşmaktadır. Üretilen ürünlerin en erken zamanda pazar boyuna ulaştırılması gerekliliği, kültür koşullarında ve besin maddelerinde yaşanan sorunlar bilim insanlarını ve üreticileri biyoteknolojinin gelişime bağlı olarak yeni arayışlara yönlendirmiştir. Bu aşamada, sıralanan bu darboğazların aşılmasında son yıllarda özellikle probiotikler önemli bir çözüm oluşturmuştur. Akuakültürde larval aşamadan pazarlama aşamasına kadar her alanda probiotik kullanımı söz konusu olmuş ve son yıllarda bu alandaki çalışmalar önemli ivme kazanmıştır.

Balığın florasında bulunan mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki grupta incelenir. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup denge halinde olup, faydalı mikroorganizmalar baskın florayı oluşturmaktadır. Gastrointestinal sistemde bulunan ve faydalı olarak nitelendirilen bu bakterilerin, yemlerin sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, bağırsak florasını düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan mikroorganizmalar “*Probiotik*” olarak tanımlanmaktadır (Gatesoupe et al., 1999).

Günümüzde başta kültürü yapılan iç su ve deniz balıkları türleri olmak üzere kabuklu ve karides türlerinde hastalıkların sağaltım sürecinde antibiyotiklere bir alternatif olarak probiotiklerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Ayrıca, ortam parametrelerinin optimizasyonunda dengeleyici, yem etkinliğinin ve buna bağlı olarak sindirilebilirlik ve sindirim enzimleri aktivitesinin artırılmasında tetikleyici bir destek ürünü olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte akuakültürde yaygın olarak kullanılan başlıca bakteriler *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Enterococcus sp.* genusunda yoğunlaşmıştır. Ayrıca son yıllarda, *Bacillus subtilis* türü probiant balık hastalıklarının tedavisinde oral olarak bakterioterapi olarak kullanılmaktadır (Gatesoupe et al., 1999).

Probiotiklerin çalışma mekanizmasına bakıldığında;

- ✓ Probiotik bakteriler zararlı bakterileri dışlar ve ya bu zararlı bakterilerin oluşumunu önleyici madde salgırlar, bağışıklığı artırır.
- ✓ Probiotik bakteriler zararlı bakterilerin çoğalabildikleri ortam koşullarını ve özellikle pH'ı dengeleyerek zararlı patojenlerin oluşumunu engellerler.

- ✓ Kùltürü yapılan canlıların beslenmesini geliştirmek için yapılan vitamin sentezinde görev alırlar.
- ✓ Kùltürü yapılan canlıların sindirimlerini kolaylaştırmak için enzim salgırlarlar.
- ✓ Probiotik bakteriler toksik veya organik materyalleri doğrudan ayrıştıarak su kalitesini artırırklar (Gatesoupe et al., 1999).

Bu çalışmada, ùlkemizde kùltürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) balığının larval dönem boyunca *Bacillus sp.* grubu probiotik bakterilerin, larvanın gastrointestinal sisteminde kolonize olup alkali bir ortam sağlayarak patojen bakterilerin üremesinin engellenmesi ve larvanın büyüme parametreleri ile sindirim enzimleri aktivitesi açısından etkileri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Çipura Balığının Biyolojik Özellikleri

Çipura balığının sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

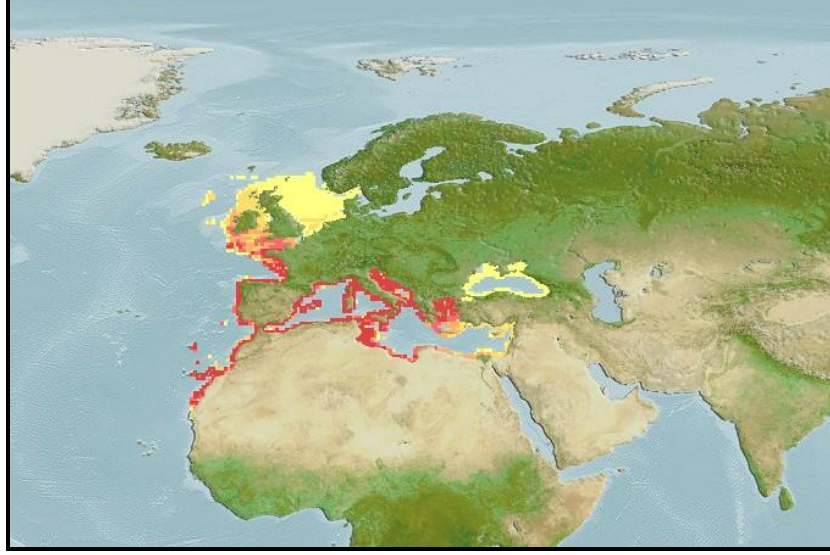
Regnum	: Animale
Subregnum	: Metezoa
Phylum	: Chordata
Subphlum	: Vertabrata
Superclassis	: Gnathostamata
Classis	: Osteichyes
Ordo	: Perciformes
Subordo	: Percoidei
Familya	: Sparidae
Genus	: Sparus
Species	: <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)

Yabancı dillerdeki adlandırması ise gilthead seabream (İng.), daurade royale (Fra.) ve Meerbrasse (Alm.) şeklindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çipura balığının genel görünüşü (Fishbase, 2012)

Tüm Akdeniz'den İngiltere kıyılarından başlayarak bütün Akdeniz bölgesinde dağılım gösterir. Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yayılım gösteren çipura deniz fenogramlarının bulunduğu kumlu-çamurlu ve çamurlu ortamlarda yaşamını sürdürür. Bunun yanı sıra nehir ağzlarına ve lagüner bölgelere de girer (Saka ve Fırat, 2009) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Çipura balığının dağılım alanları (Fishbase, 2012)

Protandrik hermafroditizm özelliği gösteren çipuralar, 8. aylarında ovaryum oluşumlarıyla birlikte dişi özellik gösterirler. 12. aylarında üremenin ilk sezonunda tüm bireyler erkek fonksiyondadır. Gonadın ventralinde olgun testiküller belirir. Gonadın dişi kısmında ise hiçbir gelişme gözlenmez. 23-24. aylardaki balıkların ikinci periyodunda ise bireylerde erkeklikten dişiliğe bir geçiş söz konusudur. Bu dönemde gonadlarda belirgin bir olgunlaşma gözlenmektedir. Bu cinsiyet değişimi ani olmamakla birlikte özellikle 3. yaştaki bireyler intersex özelliğindedir. Çipuraların üreme periyodu ülkemizde Ekim-Aralık ayları arasında olup en iyi gelişim 22-25 °C aralığında gözlenmektedir. Yaşayabilecekleri sıcaklık aralığı 6-32 °C ve tuzluluk aralığı ise ‰ 5-40 olarak belirlenmiştir. pH değeri ise 6.5-9.0 arasında değişmektedir (Saka ve Fırat, 2009).

Sırt yüksekliği fazla olup lateralden yassılaşımiş, simetrik bir yapıya sahiptir. Baş iri, burun küt ve ağız terminal konumlu olup düzdür. Alt çenede dişler önde 4 adet kanin, arkada 4 sıra molar, üst çenede önde 4 adet kanin, arkada ise 3 sıra molar şeklindedir. Üst dudak, alt dudağa oranla daha kalın olup gözün başladığı noktanın paralelinde biter. Gözler orta derecede gelişmiştir. Göz çukuru önündeki mesafe, göz çapından en az iki kat daha uzundur. Operkulum ve prooperkulum pullarla kaplıdır. Yanal çizgi hafif eğimli olarak operkulumdan kaudal yüzgece kadar kesintisiz olarak devam eder. Yanal çizgi üzerinde 73-85 adet pul bulunur. Dorsal yüzgeç anal yüzgeçten daha uzundur. Pektoral yüzgeç anüse kadar uzanır. Kaudal yüzgeç homoserk yapıdadır. Bu tür için yüzgeç formülü DXI/13-14, AIII/11-12, PI/5, AV/5 şeklindedir. Renk dorsalde gri-esmer, ventralde gümüşüdür. Pektoral yüzgecin dorsalinde ve operkulumun üzerinde kırmızı-menekşe renkli bir leke karakteristiktir. Maksimum boyları 70 cm ye kadar ulaşan çipuraların ortalama uzunlukları 25-40 cm arasındadır. 0-3 yaş arası çipuralarda yapılan bir çalışmada, bu türün karnivor bir form olduğu ve özellikle ergin bireylerinin Crustacea ve Mollusca familyasına ait türlerle beslendiği bildirilmiştir (Alpbaz, 1990).

2.2 Çipura Larva Yetiştiriciliği

2.2.1 Prelarval Dönem

Çipura prelarvaları, yumurtadan çıktıklarında yaklaşık 2.6-2.8 mm boyundadırlar. Vitellus kesesi çapları ise 0.9-1 mm'dir. Vitellus kesesinin posteriorunda 0.2-0.22 mm çapında bir yağ damlası bulunur. Ağız ve anüs kapalıdır. Baş vücuda oranla küçük, gözler büyük ve pigmentsizdir. Pigmentasyon sarı ve siyah olup pigmentler başta birkaç tane, post-anal ve medio-ventralde bir sıra olarak bulur. Vitellus kesesi baş kısmının altında, su geçirmez bir zar ile sıkışmıştır. Yüzgeçlerden yalnızca pektoral yüzgeç bir taslak halinde önceleri yatay sonra dikey konumlu olarak 3. günde oluşur. Tek yüzgeçlerin yerine başın üstünde başlayan ve tüm vücudun medio-dorsali boyunca uzanıp, kuyruk ucundan medio-ventrale dönüp, vitellus kesesine kadar uzanan primordial yüzgeç bulunur. Bu yüzgeç larvanın yüzeyini genişletip su üstünde kalmasını ve O₂ ihtiyacını karşılar. Denge organı olan otositler gözlerin arkasında olup, burun delikleri tam gelişmemiştir (Fırat ve Saka, 2009).

Sindirim sistemi düzensiz olmakla beraber, sindirim sistemi düz bir boru şeklindedir. Pankreas ve karaciğer oluşmuş fakat salgı bezleri ve lipid rezervleri mevcut değildir. Ağız açılmadan önce vitellus kesesinin çoğu absorbe edilir. Prelarvalarda boydaki toplam artış ile vitellusun azalması çok yakından ilişkili olup sıcaklığın etkisi altındadır. Çabuk tüketilen vitellus, boyda ani artış yaratmasına rağmen larva için iyi değildir. Düşük sıcaklıkta vitellus absorpsiyonunda boy geç uzamakla birlikte toplam boy artışı daha fazla olmaktadır. Bu dönemde larvanın hareketinin az olması enerji tüketimini düşürür ve harcanan enerji larvanın organel gelişiminde kullanılır. Çok düşük sıcaklıklarda larva vücudunda deformasyon görülür (Fırat ve Saka, 2009).

2.2.2 Postlarval Dönem

Larvanın ağız-anüsünün açılması ve gözlerde pigmentasyonun meydana gelmesi ile postlarval evre başlar. Hava kesesi oluşumu 4. günden itibaren gözlenebilir. Kesenin normal gelişiminin ilk safhası larva 5 günlük ve 4 mm boyda iken meydana gelir. Eğer şişme gerçekleşmezse kese ilkel görünümünü korur ama fonksiyonel olmaz. İkinci gelişim safhası 13-15. günlerde yaklaşık 7-8 mm boyda meydana gelir. Larva 5-6 mm boya ulaştığında preoperküler dikenler görülür. 7-8 mm boy uzunluğuna erişildiğinde önce kaudal, sonra dorsal ve anal olmak üzere tek yüzgeçler oluşur. 133 mm boyda yüzgeçler son şeklini alır. Bu dönemde melenoforlar tüm vücutta yatay siyah bantlar oluşturacak şekilde toplanır(Fırat ve Saka, 2009).

Çipura larva yetiştiriciliği çalışmalarında kullanılan su sıcaklık aralığı 18-22 °C arasında değişim gösterir. Su sıcaklığı ilk 15 günlük dönem içerisinde 18-20 °C arasındadır. Sıcaklık 15. günden itibaren arttırılarak 22 °C'ye getirilir ve larval dönem sonuna kadar bu sıcaklık değeri korunur (Fırat ve Saka, 2009).

2.3 Probiotik

Probiotik kelimesinin kökeni eski Yunanca'dan gelmekte olup "önce yaşam" anlamına gelmektedir.

Probiotikler 1920'de Parker tarafından üretilmiştir ve ticari anlamda yem katkısı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Parker, 1974). Fuller(1989)'in tanımına göre probiotikler,

yararlı olarak etki göstererek intestinal dengeyi geliştiren mikroorganizmalardır (Fuller, 1989). Oysaki diğer araştırmacılar bu tanımı geliştirmişlerdir. Örneğin; probiotik, konak canlının mikrobiyal dengesini geliştirerek canlının etki gösteren canlı mikrobiyal katkı olarak tanımlanmıştır (Gram et al., 1999). Kısaca, probiotiklerin anlaşılmasında çeşitli varyasyonlar mevcuttur. Gözlemlere bağlı olarak bu mikroorganizmaları sedimentin, suyun ve canlının bakteriyel kompozisyonunu düzeltebilir.

Akuakültür sistemlerinde sağlıklı bir mikrobiyal çevre için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Probiotiklerin kullanımı potansiyel patojenlerin kontrolü için bir çeşit yöntemdir.

Büyük çaplı üretimlerde stresli koşullarda üretilen akuatik canlılar için hastalık problemleri ve kirlilik sık sık ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu durumlar ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bunun önüne geçmek için hastalık kontrolü antibiyotiklerle sağlanmaktadır. Fakat antibiyotik kullanımı bakterilerin direncini arttırır ve çok güçlü bir seleksiyona yol açar (Balcazar, 2006). Bu sebepler doğrultusunda probiotiklere yönelim artmıştır.

2.3.1 Probiotik Bakteri Seçimi

Akuakültürde kullanılacak ticari probiotiklerin geliştirilmesi multidisipliner deneyler ve temel araştırma süreci gerektirir. Probiotik çalışmalarında birçok başarısızlık uygun olmayan mikroorganizmaların seleksiyonundan kaynaklanmaktadır. Esas anlaşılması gereken probiotik faaliyetlerinin mekanizması ve potansiyel probiotiklerin seleksiyon kriterlerinin belirlenmesidir.

Probiotik bakteriler, uygulanacak canlı için patojen olmamalı, üretim koşullarına uygun olmalı ve akuatik canlı vücudunun hangi bölgesinde aktif hale geçeceği bilinmelidir. Probiotikler, yeşil su tekniği ile yetiştirilen larvalar için kullanıldığında probiotiklerin alg ile etkileşim içine gireceği göz önünde bulundurulmalıdır (Balcazar et al, 2006).

Probiotiklerin, konağın gastrointestinal sisteminde baştan sona kadar aktarılırken hayatta kalması ölçülmelidir (Vine et al., 2004). Probiotik suşları intestinal epitelyum hücrelerine tutunur olmalıdır, çünkü patojen kolonizasyonuna bu şekilde engel olur. Ayrıca,

ticari probiotikler normal şartlar altında varlığını sürdürebilmeli ve endüstriyel proseslere uygun olarak geliştirilmelidir.

2.3.2 Probiotiklerin Etki Mekanizması

Probiotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda temel özellikler araştırılmıştır. Bunlar;

1. Patojen bakteriler ile probiotik bakteriler arasındaki antogonistik etkileşim,
2. Probiotik bakterilerin gastrointestinal sistemde kolonizasyon potansiyeli,
3. Bazı probiotik bakteri türlerinin konakçıda hastalıklara neden olan patojen bakterilere karşı dayanıklılığını artırdığı, araştırılmış ve bildirilmiştir (Gatesoupe, 1999).

Probiotik olarak kullanılan mikroorganizmaların ilk işlevi gastrontestinal sistemde kolonize olmalarıdır. Bu nedenle probiotik bakterinin sindirim sistemi epiteline tutunabilmesi gerekmektedir (Fernandez et al., 2003).

Başarılı bir probiotikten faydalı etki sağlanması adına bazı spesifik özelliklere sahip olması beklenir. Probiotik bakterilerin özelliklerinden biri patojenlere karşı antogonistik etkisidir. Antogonistik özellikler organik asitler, hidrojen peroksit veya sedefor gibi antimikrobiyal maddelerin üretilmesidir. Örneğin sindirim sisteminde *Lactobacillus*'lar, yerleşme bölgesi ve maddelerin kullanımı açısından diğer bakterilerle rekabet edebilir (Katırcıoğlu, 2001). 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. *Lactobacillus lactis* türleri tarafından üretilen nisin şimdiye kadar en iyi bilinen ve en çok araştırılan bakteriosindir. Bakteriyosinler, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* gibi bazı patojenleri inhibe edebilirler (Ringo and Gatesoupe, 1998).

2.3.3 Probiotik Olarak Kullanılan Türler

Akuakültürde, probiotiklerle yapılan araştırmalar sürmektedir ve halen çok daha fazla araştırma gerekmektedir. Atlantik somon balığı (*Salmo salar*), gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), sazan (*Cyprinus carpio*) (Wang ve Xu, 2006), beyaz Hint karidesi (*Fenneropenaus indicus*) (Ziaei-Nejad et al., 2006), beyaz karides (*Penaeus vannamei*) (Wang, 2007) ve rotifer (*Brachionus plicatilis*) kültürlerinde probiant olarak test edilen ana gruplar Vibrionaceae, Pseudomonad, laktik asit bakterileri, *Bacillus sp.* ve maya türleridir (Gomez et al., 2000).

Bakteri türleri	Balık türleri
<i>Bacillus toyoi</i> sporları	Çipura, rotifer
<i>Bacillus spp.</i> sporları	Çipura, rotifer
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Alabalık, rotifer
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Alabalık, Artemia
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Alabalık, Artemia
<i>Vibrio pelaguis</i>	Kalkan larvaları, rotifer

Çizelge 2.1. Balıklarda kullanılan bazı probiotik bakteriler

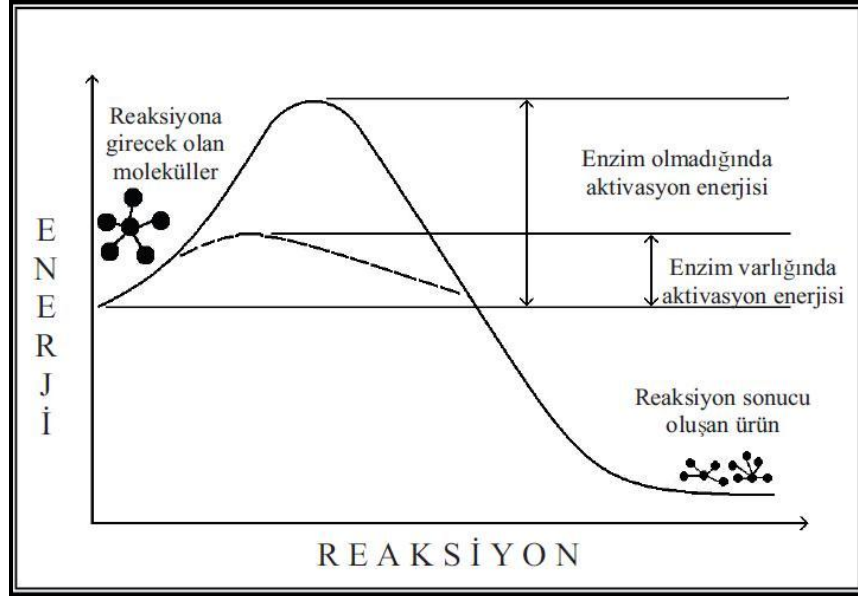
Akuakültür yemlerinde probiotiklerin kullanımı ile ilgili ilk denemelerde karasal hayvanlara yönelik üretilen ticari preparatlar kullanılmıştır. Toprakta izole edilen *Bacillus toyoi* sporları, *Edwardsiella spp.* ile enfekte olan Japon yılan balığının (*Anguilla japonica*) ölüm oranını azaltmıştır. Bu sporlar yemle kolayca karışabilmesine rağmen bunların balığın sindirim sistemindeki akıbeti bilinmemektedir. Aynı *Bacillus toyoi* türü, rotifer kültürü üzerine ilave edilmiş ve bu bakteri sporlarının rotifer tarafından filtre edilmesi sağlanmıştır. Bu rotiferler ile yemlenen alabalık larvalarında büyüme oranında artış tespit edilmiştir. *Vibrio spp.*'ye karşı *Bacillus* türlerinin antibakteriyel etki gösterdikleri belirtmiştir. Birçok basil antibiyotik üretir ve bu özellik sporlanma ile ilgilidir. Rotiferler sporlarla beslendiğinde Vibrionaceae grubundaki bakterilerde azalma olduğu belirtilmiştir (Gatesoupe, 1999).

Lactobacillus'ların *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila* gibi balık patojenlerinin gelişmesini inhibe eden maddeler üretebildiği ve bundan dolayı balık sağlığı için çok önemli olduğu gösterilmiştir (Ashraf, 2000; Katırcıoğlu, 2001; Gomez et al., 2000).

2.4 Enzimler

2.4.1 Enzimin tanımı

Biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların, canlıya zarar vermeyecek şekilde uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki katalizörlere *enzim* adı verilir. Bilindiği gibi katalizör, kimyasal tepkimeye girerek tepkimeyi hızlandıran ve tepkime sonunda hiçbir değişikliğe uğramadan çıkan maddedir (Dinçkaya, 1997b). Yalnızca canlılar tarafından sentezlenen enzimler, canlı metabolizmasındaki binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenler. Solunum, büyüme, kas kısılması, sinirsel iletim, sindirim vs. gibi yaşamsal olayların temelini oluşturur.



Şekil 2.3. Enzimlerin genel çalışma prensibi (Gözükara, 1997)

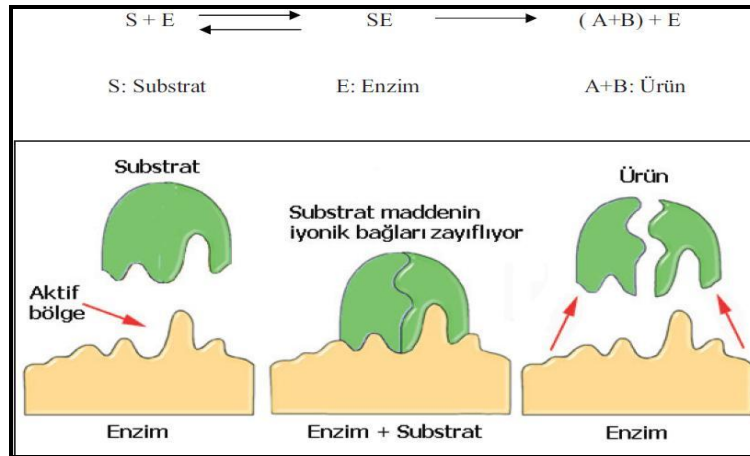
Canlı organizmalardaki yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için birçok metabolik reaksiyonun gerçekleşmesi gerekir. Bu kimyasal tepkimelerin çoğu hücre içinde oluşur. Tepkimeler sırasında açığa çıkacak yüksek ısı, proteinlerin yapısını bozacağından organizmaya da zarar verecektir. Hücredeki bu kimyasal tepkimelerin canlıya zarar vermeyecek koşullarda, düşük enerji kullanımı ile ve vücut ısısında gerçekleşebilmesi ancak enzimleri varlığı ile mümkündür. (Trevor Palmer, 1985; Gözükara, 1997). Enzimlerin genel çalışma prensibi, Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.

2.4.2 Enzimlerin Yapısı ve Özellikleri

Tüm enzimlerin proteinleri genler tarafından şifrelendiğinden aminoasit dizilimi kendine özgüdür. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gereksinim duydukları kompleks organik moleküllere *koenzim*, protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarının meydana getirdiği yan gruplarına ise *kofaktör* denilmektedir. Koenzimlerin yapısında genellikle vitaminler bulunmaktadır. Bu bağlamda vitaminler, metabolik olayların enzimler tarafından çok kolay ve hızlı biçimde gerçekleşebilmesi için organizmalar açısından oldukça önemli olan bileşiklerdir.

Enzimler bir ya da daha çok substratı etkilerken aktivite göstermek için bazen koenzime, bazen de kofaktöre gereksinim duymaktadır. Bir enzimin ürünü, diğer bir enzimin substratı olmakta ve bu karşılıklı etkileşimler hücre metabolizmasının düzenlenmesinde etkin rol oynamaktadır (Trevor Palmer, 1985; Karlson, 1992; Gözükara, 1997).

Enzimlerde anlaşılması gereken en önemli nokta enzim-substrat ilişkisidir. Enzimlerin etki ettiği maddelere *substrat* adı verilmektedir. Enzim-substrat ilişkisi o enzimin spesifitesini oluşturur ve E. Fisher tarafından anahtar-kilit mekanizması esas alınarak tanımlanmıştır. Yalnız belirli bir anahtarın kilide uyduğu gibi substrat da sadece belirli bir enzimin aktif merkezine uymaktadır. Enzim molekülünde aktif bölge adı verilen özel bir bölüm yani reaksiyon merkezi bulunur. Enzim, ilgili substratına geçici olarak bu aktif bölgeden bağlanır ve enzim-substrat kompleksi meydana gelir. Enzimler, substrata dış yüzeyinden etki eder ve bunun ardından substrat parçalanarak bir ya da iki ürüne dönüşür. Şekil 2.4'te, enzim-substrat mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Enzim-substrat mekanizması (Gözükara, 1997)

2.4.3 Enzimlerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimler, biyolojik sistemlerde genellikle çok küçük miktarda bulunur ve reaksiyona girer. Bu nedenle, enzim aktivitesi tanımlanırken protein miktarından çok biyolojik sistemde gösterdiği aktivite miktarından söz edilmektedir. Enzimatik reaksiyonlar her koşulda aynı verimlilikte gerçekleşmez. Özellikle enzimlerin protein yapılı olduğu düşünüldüğünde ortam parametrelerinin etkisi açıkça ortaya çıkmaktadır (Dinçkaya, 1997a).

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler beş madde ile açıklanabilir;

- ✓ Sıcaklık
- ✓ pH
- ✓ Enzim/Substrat Konsantrasyonu
- ✓ Zaman
- ✓ Diğer Kimyasal Maddeler ve Suyun Etkisi (Dinçkaya, 1997a).

2.4.4 Sindirim Enzimleri

Tüm organizmalarda yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için alınan kompleks yapıdaki besin maddelerinin monomerlerine ayrılması gerekir. Bu reaksiyonlarda en önemli rolü kuşkusuz sindirim enzimleri oynamaktadır. Substrat olarak besin maddesine tutunan enzimler, besini olağan üstü bir hızla kendini oluşturan en temel bileşenlerine parçalanmaktadır (Dinçkaya, 1997a).

Sindirim enzimleri genel olarak sınıflandırıldığında; karbonhidrat sindiriminden sorumlu olanlara *karbohidraz*, yağların sindiriminden sorumlu olanlara *lipaz* ve proteinlerin sindiriminden sorumlu olanlara *proteaz* adı verilmektedir (Dinçkaya,1997a).

Enzim aktivitesi; sindirim kanalı boyunca organlara ve aynı organ içinde bölgelere, günün saatine, mevsimine, balığın aç ya da tok oluşuna, yaşına ve aldığı yeme göre değişim gösterir. Sindirimin gerçekleşmesi, ortamda bulunan enzimin miktarından çok aktivitesine bağlıdır (Dinçkaya, 1997a).

Çok sayıda protein molekülü ile birlikte bazı enzimler inaktif şekilde ve bir enzimin öncül molekülü olarak sentezlenmektedir. Bunun ardından, bu protein molekülünde bulunan bir ya da daha çok peptid bağının koparılması sonucunda enzim aktif hale geçmektedir. Aktif protein molekülünün enzim olduğu koşulda, bu enzimin inaktif öncül şekline *proenzim* ya da proteolitik enzimlerde olduğu gibi enzimin inaktif öncül şekline *Zimojen Granülleri* denilmektedir (Travor Palmer, 1985; Gözükara, 1997; Sterchi and Stöcker, 1999).

Genellikle proteinleri parçalayan sindirim enzimleri, başlangıçta pankreas ve mideden bir proenzim şeklinde sentezlenmektedir. Bu proenzimler bir ya da daha çok peptid bağının koparılması ya da belli uzunlukta bir peptid kısmının asıl zincirden uzaklaştırılması ile aktif duruma gelirler. Çizelge 2.2’de, mide ve pankreastan sentezlenen başlıca proteolitik enzimler verilmiştir.

Çizelge 2.2. Mide ve pankreastan proenzim halinde sentezlenen başlıca proteolitik enzimler (Kollovski, 2001)

Proenzim	Aktif Enzim	Sentezlendiği Yer
Tripsinojen	Tripsin	Pankreas
Kimotripsinojen	Kimotripsin	Pankreas
Pepsinojen	Pepsin	Mide
Prokarboksipeptidaz	Karboksipeptidaz	Pankreas
Proelestaz	Elestaz	Pankreas

Mide ve bağırsaklarda aktivite gösteren sindirim enzimleri başlangıçta inaktif olarak sentezlenmektedir. Proteinleri parçalayan enzimleri sentezleyen hücreler, kendilerini korumak için bu enzimleri inaktif formda ve bir proenzim şeklinde sentezlemektedir. Aksi halde, bu enzimler sentezlendikleri hücrenin proteinlerini sindirir ve bunun sonucunda kendi kendini tahrip eder. Bu proenzimlerin aktivasyonu sadece sindirim kanalı içinde gerçekleşmektedir (Travor Palmer, 1985; Sterchi and Stöcker, 1999; Kolkovski, 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma, Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş.'ne bağlı Ören Kuluçkahane Tesislerinde yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş. Ören Kuluçkahane Tesisleri

3 tekrarlı yürütülen denemelerde 15 m³ hacimli silindirik polyeşter tanklar kullanılmıştır (Şekil3.2)



Şekil 3.2. Larval üretimde kullanılan deneme tankları

3.1 Larval Üretim

Yumurtalar dekalaj çalışması uygulanmış anaçlardan Nisan ayında, 17.0-17.5 °C'de herhangi bir hormonal müdahalede bulunulmadan alınmış ve inkübe edilmek üzere 3000 adet/ml olacak şekilde üretim tanklarına aktarılmıştır. Deneme süresince pH, nitrit, nitrat, amonyum, amonyak, çözülmüş oksijen bileşikleri, sıcaklık ve tuzluluk günlük olarak izlenmiştir.

Denemede, 15 m³ hacimli, çeperleri siyah, zemini gri renkte, silindir yapıdaki polyester tanklar kullanılmıştır. Su yüzeyinde biriken yağın giderilmesini sağlamak amacı ile hava süpürgeleri; ayrıca, sistemde kullanılan suyun saturasyonunu dengelemek için gaz atım kolonları kullanılmıştır.

Besin kesesi ve yağ damlasının tüketildiği prelarval dönemde karanlık uygulamasının yapılması ve 3. günde, ağız açılımının ardından, ışıklar açılmıştır (Şekil 3.3). Aydınlatmaya 30 lux şiddetinde ışık kullanılarak başlanmıştır. Endojen besin rezervlerinin tüketildiği prelarval dönemde larvalara herhangi bir besleme yapılmamış, eksojen beslemeye ağız açılımının gözleendiği anda başlanmıştır. Larva üretiminin, açık devre sistemde, yeşil su tekniği kullanılarak yapılmıştır. Alg türü olarak 25-50x10³ hücre/ml *Nannocloropsis sp.* kullanılmıştır. Denemede, alg kullanıldığı sürece 24 saat aydınlatma yapılmış, alg kullanımı sona erdikten sonra günde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık rejimi uygulanmıştır.



Şekil 3.3. Çipura larvasında ağız açılımı

Larvalarda ağız açılımı gözlelendikten sonra eksojen beslemeye rotifer (*Brachionus plicatilis*) ile başlanmıştır. Rotifer kültürünün beslenmesinde Selco Sparkle (INVE S.A.,

Ghent, Belgium) ürününün kullanılmıştır. Larval beslemeye 1. gün 0.60 g/10⁶ rotifer, 2. gün 0.40 g/10⁶ rotifer, 3. gün ise 0.30 g/10⁶ rotifer oranı ile yapılmıştır. Zenginleştirmede Selco Spresso (INVE S.A., Ghent, Belgium) ürünü kullanılmış ve larva için canlı yem yoğunluğu ortalama 10 adet/ml rotifer ile besleme yapılmıştır. Larvalara ilk 20 gün sadece rotifer ile besleme yapılması ve rotiferin ardından canlı yem olarak beslemeye *Artemia* nauplii ile devam edilmiştir. Daha sonrasında *Artemia* metanauplii ile beslemeye devam edilmiş ve *Artemia* metanauplii zenginleştirilmesinde INVE firmasına ait ticari Selco ürünleri kullanılmıştır. Denemede kullanılan canlı yemler şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Denemede kullanılan canlı yemler. A: *Rotifer*, B: *Artemia metanauplii*

Mide oluşumun ardından, *Artemia* metanauplii'nin azaltılmaya başlandığı günlerde, tanklara ilk kez mikropartikül yem girişi yapılmış ve denemede mikropartikül yem olarak 100-200 µm boyutundaki Bernaqua firmasının Caviar sınıfı yemleri kullanılmıştır. Çizelge 3.1' de, denemede kullanılan mikropartikül yemin besin madde içerikleri verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan mikropartikül yemin besin madde içeriği (Caviar Catalogue).

Besinsel Madde Kompozisyonu	Oran
Ham Protein	50%
Ham Yağ	15%
Ham Kül	20%
Ham Selüloz	2%
Nem	8%
Fosfor	1,5%
Total (n-3) HUFA	25 mg/g
DHA	12 mg/g
EPA	8 mg/g
Vitamin A	20000 IU/kg
Vitamin D ₃	4000 IU/kg
Vitamin C	1100 ppm
Vitamin E	400 ppm
Bakır	50 ppm
Astaxanthine	100 ppm
Total enerji	5080 Kcal/kg
Sindirilebilir enerji	4650 Kcal/kg

3.2 Deneme Düzeni ve Ölçümler

Üç tekrarlı sürdürülen denemelerde, probiotik ürün olarak Bernaqua™ firmasına ait ticari bir ürün olan Bactosafe® kullanılmıştır. Ürünün içeriğinde, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Pediococcus acidilactici* ve büyüme ortamı bulunmaktadır.

Uygulama, ürünün canlı yem ve larva ortam suyuna ilave edilmesi ile gerçekleşmiştir. Böylece 2 grup tank oluşturulmuştur. Bunlar;

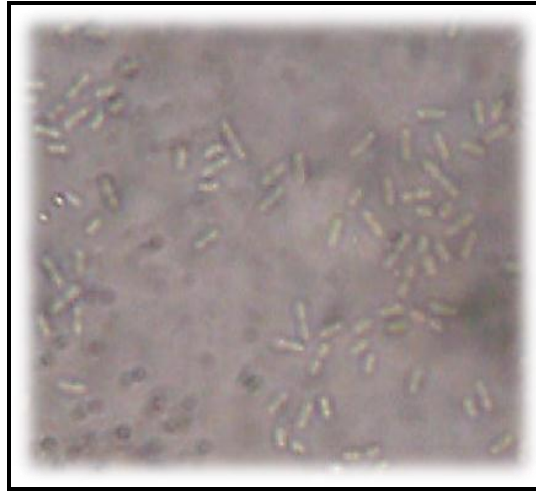
1. Larva üretim tanklarının suyuna ve canlı yemin (rotifer); hem kültür tanklarına, hem de zenginleştirme tanklarına probiotik ürün ilave edilerek,
2. Kontrol (Probiotiksiz)

Her grup için üç adet tank hazırlanmıştır. Bunlardan 1.'si A, 2.'si B olarak isimlendirilmiştir.

Bactosafe[®] 1 kg'lık alüminyum-PE kilitli poşetlerde granül formda paketlenmiş ve üretici bilgilendirmesinde canlı yem ortamına verilmeden önce inkübe edilmiştir (Şekil 3.5). Bu amaçla, ürün dezenfekte edilmiş deniz suyuna 10g/lt olacak şekilde 33°C sıcaklıkta, 6-12 saat süre ile belli periyotlarla kontrol edilerek orta derecede havalandırma ile inkübe edilmiştir. Bakteri sporlarının inkübe olup olmadığı belli aralıklarla yapılan pH kontrolleri ve mikroskopik gözlemlerle anlaşılmıştır (Şekil 3.6).

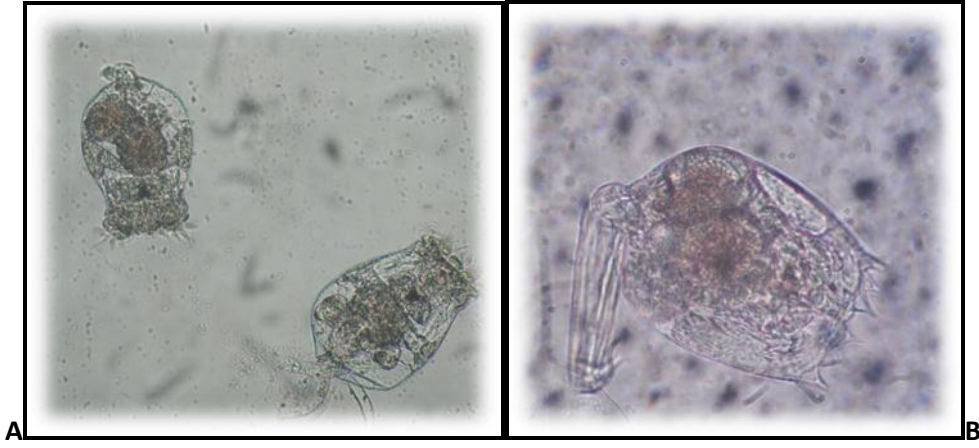


Şekil 3.5. Bacosafe[®]'in inkübasyon süreci



Şekil 3.6. Bactosafe[®]'in mikroskopik görüntüsü

Bactosafe[®] 10g/m³ olacak şekilde, rotifer kültür tank ortamına 0. günde ilave edilmiştir. Kullanılan üretimdeki her tanka aynı uygulama yapılmıştır. Bu kültürün devamı olan zenginleştirilmiş rotifer içinde aynı işlem uygulanmıştır (Şekil 3.7). Larval beslemenin başlamasıyla birlikte probiotik ilk 20 gün boyunca canlı yem ile larvaya aktarılmıştır. Böylece larvanın intestinal sistemine probiotik bakterilerin yerleşmesi daha kolay olacağı düşünülmüştür. Bununla birlikte, larva tank ortamına da probiotik ürün girişi yapılmıştır. Kontrol grubuna ise hiçbir probiotik uygulaması yapılmamış ve standart larva üretim protokolü uygulanmıştır (Çizelge 3.2).



Şekil 3.7. a) Bactosafe[®] ile beslenmemiş rotifer b) Bactosafe[®] ile beslenmiş rotifer

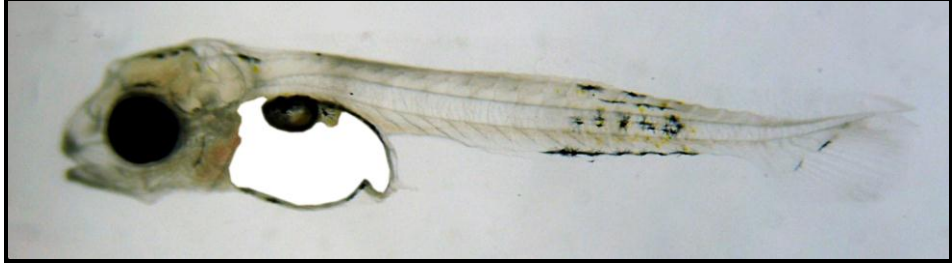
Büyüme parametreleri adı altında larvaların total boy, ağırlık, spesifik büyüme oranı ve yaşama oranına bakılmıştır. Larvalara ait total boy gelişimi, larvaların mikroskop altında milimetrik oküler yardımıyla ölçülmesiyle, ağırlık gelişimi ise hacimsel (volumetrik) metot yardımıyla tespit edilmiştir. Hacimsel method yönteminde, 50-100 adet larva tank ortamından alınarak hassas terazide tartılmış ve ortalama alınarak her bireyin ağırlığı hesaplanmıştır. Spesifik büyüme oranı, deneme başında ve sonunda ölçülen canlı larva ağırlıkları üzerinden belirtilen formül yardımıyla hesaplanmıştır ($SBO=100(\ln SVA-\ln İVA)/\Delta t$). Yaşama oranı deneme sonunda tanklarda kalan canlı larvanın sayılmasıyla bulunmuş ve % olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çipura larva üretim protokolü

Yaş (Gün)	Sıcaklık (C)	Tuzluluk (‰)	Debi (Saat)	Işık Yoğunluğu (Lüx)	Işık Süresi (Saat)	Alg Yoğunluğu (hücre/ml)	Rotifer (adet/ml)	Artemia (adet/ml)	Mikropartikül Yem
0	17.0-17.5	38	10	-	-	-	-		
1	17.0-17.5	38	10	-	-	-	-		
2	17.0-17.5	38	10	-	-	-	-		
3	17.0-17.5	38	10	30	24	25-50*10 ³	10		
4	17.5-18.0	38	5	30	24	25-50*10 ³	10		
5	17.5-18.0	38	5	30	24	25-50*10 ³	10		
6	17.5-18.0	38	5	50	24	25-50*10 ³	10		
7	17.5-18.0	38	5	50	24	25-50*10 ³	10		
8	17.5-18.0	38	5	50	24	25-50*10 ³	10		
9	17.5-18.0	38	5	50	24	25-50*10 ³	10		
10	17.5-18.0	38	5	50	24	25-50*10 ³	10		
11	17.5-18.0	38	5	70	24	25-50*10 ³	10		
12	17.5-18.0	38	5	70	24	25-50*10 ³	10		
13	17.5-18.0	38	5	70	24	25-50*10 ³	10		
14	17.5-18.0	38	5	150	24	25-50*10 ³	10		
15	17.5-18.0	38	5	150	24	25-50*10 ³	10		
16	18.0-19.0	38	5	150	24	25-50*10 ³	10		
17	18.0-19.0	38	5	300	24	25-50*10 ³	10		
18	18.0-19.0	38	5	300	24	25-50*10 ³	10		
19	18.0-19.0	38	5	300	24	25-50*10 ³	10		
20	18.0-19.0	38	10	300	16	25-50*10 ³	10		
21	18.0-19.0	38	10	Doğal	16			0.5(A0)+1(A1)	
22	19.0-20.0	38	10	Doğal	16			0.5(A0)+1(A1)	
23	19.0-20.0	38	10	Doğal	16			2 (A1)	
24	19.0-20.0	38	10	Doğal	16			2 (A1)	
25	19.0-20.0	38	20	Doğal	16			2 (A1)	
26	19.0-20.0	38	20	Doğal	16			2 (A1)	
27	19.0-20.0	38	20	Doğal	16			2 (A1)	
28	19.0-20.0	38	20	Doğal	16			1.5 (A1)	C.A. %2-10
29	19.0-20.0	38	20	Doğal	16			1.5 (A1)	C.A. %2-10
30	19.0-20.0	38	30	Doğal	16			1.5 (A1)	C.A. %2-10
31	20.0-21.0	38	30	Doğal	16			1.5 (A1)	C.A. %2-10
32	20.0-21.0	38	30	Doğal	16			1.5 (A1)	C.A. %5-10
33	20.0-21.0	38	30	Doğal	16			1 (A1)	C.A. %5-10
34	20.0-21.0	38	30	Doğal	16			1(A1)	C.A. %5-10
35	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			1 (A1)	C.A. %5-10
36	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			1(A1)	C.A. %5-10
37	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			1 (A1)	C.A. %8-10
38	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			1 (A1)	C.A. %8-10
39	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			1(A1)	C.A. %8-10
40	20.0-21.0	38	50-80	Doğal	16			0.5 (A1)	C.A. %8-10

Üretilen çipura larvalarının proteaz grubu sindirim enzim aktivitelerini izleyebilmek için yumurta çıkışından sonra 0, 7, 14, 21, 28, 35 ve 40. günlerde her 5 günde bir 50-250 adet (larva büyüklüğü ve ağırlığına bağlı olarak) larva örnekleme yapılmıştır. Larvaların sabah ilk yem girişi yapılmadan önce ve genellikle aynı derinlikten alınmıştır.

Aynı şekilde, denemeler boyunca düzenli olarak her tanktan 30-100 adet larva (larva yaşı ve gelişimine bağlı olarak) alınarak sindirim tüpü mikroskop altında izole edilerek homojenize edilmiş ve pH 7,5 değerinde Tris-HCl tampon eklenerek analizler yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Sindirim tüpünün izole edilmiş şekli şematik olarak Şekil 3.8 ve 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Çipura larvasının sindirim tüpünün çıkarılışı



Şekil 3.9. Çipura larvasının izole edilmiş sindirim tüpü

3.3 Enzim Analizleri

Her enzim, kendine özgü spesifik aktivite tayin yöntemleri ile tespit edilmiş ve spektrofotometre (Jenway 6300-Visible Spectrophotometer) cihazı yardımı ile enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

3.3.1 Alkalın Proteaz : Alkalın proteaz aktivitesi, Alarcòn et al. (1998) tarafından tanımlanan casein substrat analizi ile belirlenmiştir. Aktivite, 37 °C de ve pH 8.0 derecesinde belirtilen koşullar altında, spektrofotometre cihazının 366 nm dalga boyundaki değeri ölçülerek hesaplanmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- ✓ 50 mM Tris HCl tampon çözeltisi
- ✓ % 0.5'lik casein substratı

Prosedür:

- ✓ Alınan örnekler 50 Mm Tris HCl çözeltisi ile homojenize edilir.
- ✓ Elde edilen homojenata 37 °C'de 60 dakika süre ile inkübe edilir.
- ✓ Reaksiyon %20'lik 0.5 ml trichloroacetic acid (TCA) eklenerek durdurulur. Tekrar karıştırılır.
- ✓ Tüpler 10 dakika bekletilir.
- ✓ Süzüntünün spektrofotometre cihazında 366 nm dalga boyundaki değeri ölçülür.

3.3.2 Asit Proteaz : Asit proteaz aktivitesi, Anson (1938) tarafından tanımlanan hemoglobinin substrat analizi ile belirlenmiştir. Aktivite 37 °C'de ve pH 2.0 derecesinde belirtilen koşullar altında, spektrofotometre cihazının 280 nm dalga boyundaki değeri ölçülerek hesaplanmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- ✓ 0.1 M glisin HCl tampon çözeltisi
- ✓ %0.5'lik hemoglobin

Prosedür:

- ✓ Alınan örnekler 0.1 M glisin HCl çözeltisi ile homojenize edilir.
- ✓ Elde edilen homojenata 37°C de 60 dakika süre ile inkübe edilir.
- ✓ Reaksiyon %20'lik 0.5 ml trichloroacetic acid (TCA) eklenerek durdurulur.
- ✓ Tüpler 10 dakika bekletilir ve karışım filtreden geçirilir.
- ✓ Süzütünün spektrofotometre cihazında 280 nm dalga boyundaki değeri ölçülür.

3.3.3 Protein : Her enzimin özgül spesifik aktivitesini sayısal olarak tanımlamak üzere spektrofotometre cihazından okunan göreceli değerlerin, homojenatta bulunan protein değeri ile oranlanması düşünülmüştür. Bu bağlamda, Bradford tarafından 1976 yılında yapılan çalışmada kullanılan Bradford yöntemi ile elde edilen protein miktarı, spektrofotometre cihazından okunan değer ile oranlanarak her enzimin kendine özgü spesifik aktivitesi mU/mg protein⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Bradford yönteminde substrat olarak sığır serum albumini kullanılmıştır.

Kullanılan Reaktifler:

- ✓ 100 mg Coomassie Blue G-250
- ✓ 50 ml %95 ethanol
- ✓ 100 ml %85 (w/v) Fosforik asit

Prosedür:

- ✓ Sırasıyla 0, 2, 4, 6, 10, 15 ve 20 µl BSA (1 MG/ML) substratı küvetlere konulur.
- ✓ 100 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml %95 ethanol içinde 100 ml %85 (w/v) fosforik asit eklenerek Bradford solüsyonu hazırlanır.
- ✓ 20 µl ölçümü yapılacak örnekten konulur, üzerine 40 µl Bradford solüsyonu ilave edilir ve 200 µl'ye kadar su eklenir.
- ✓ Spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyundaki değer ölçülür ve Lambert&Mill yasası gereğince oranlama yapılarak spesifik enzim aktivitesi tespit edilir.

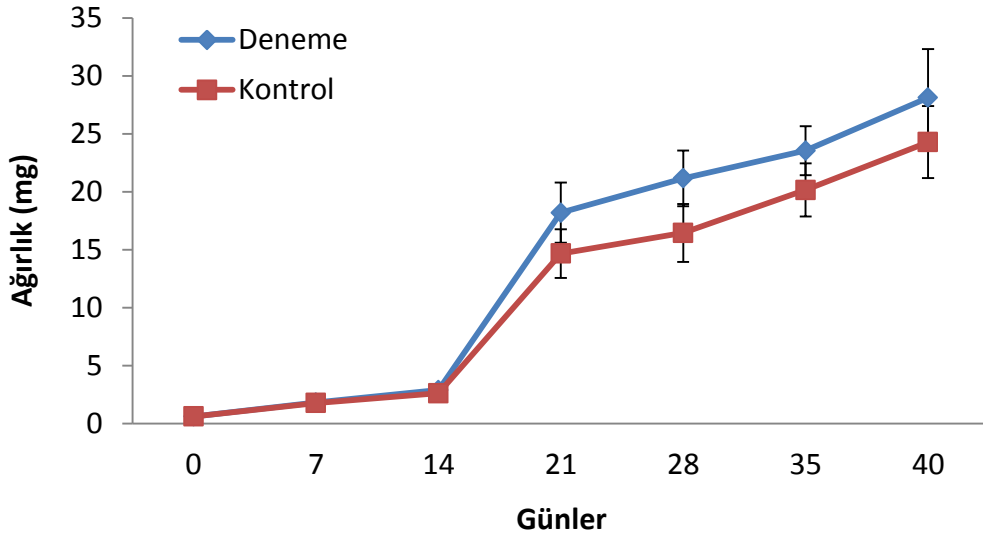
3.4 İstatistik

Denemeler 3 kez tekrar edilmiş ve veriler ortalamasının standart sapması ($\bar{X} \pm sd$) olarak gösterilmiştir. Varyanslar arasındaki homojenite Levene testi ile test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) ardından Turkey testi ile tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Yaşama oranları arasındaki farklılık ise Fischer'in Ki kare testi ile saptanmıştır. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 15.0 ve Microsoft Excel 2007 yazılımlarından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Büyüme Parametreleri

Larvaların büyüme parametreleri incelendiğinde; denemenin sona erdiği 40. günde total boy A grubunda $21,12 \pm 1.8$ mm, ağırlık $28,12 \pm 2.3$ mg, spesifik büyüme oranı $7,8$ %/gün ve yaşama oranı da $16,7$ olarak tespit edilmiştir. B grubunda ise 40. günde total boy $17,03 \pm 1.2$ mm, ağırlık $24,28 \pm 2.7$ mg, spesifik büyüme oranı $7,1$ %/gün ve yaşama oranı da $8,2$ olarak tespit edilmiştir. Büyüme parametreleri açısından A grubu ile B grubu arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Larvalarda gözlenen total ağırlık gelişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen total ağırlık değişimleri

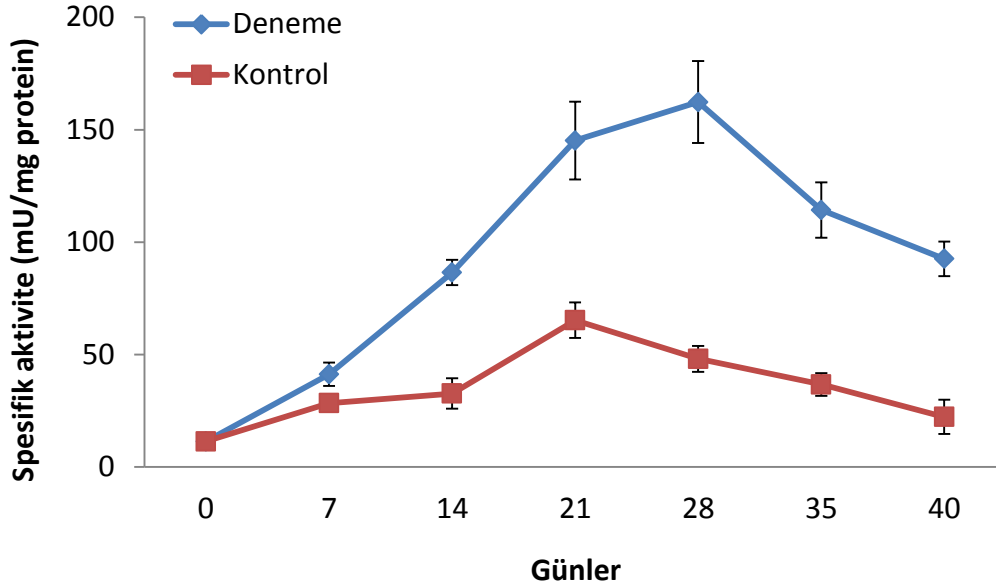
Çipura larvaları, total ağırlık açısından ilk 14 günlük süreçte yavaş seyreden bir artış göstermiştir. Bu günden sonra, denemenin sona erdiği 40. güne kadar daha hızlı bir total ağırlık gelişimi izlenmiştir.

Larvalarda izlenen total boy gelişimi ise 15. günden sonra hızlı bir artış eğilimine girmiştir. Bu hızlı artış grafiğinin, deneme sonuna kadar aynı hızda seyrettiği tespit edilmiştir.

4.2 Enzim Aktiviteleri

4.2.1 Alkalın Proteaz

Larval dönemde, daha çok alkali ortamlarda (pH 8,0-9,0) sindirim aktivitesine katılan proteaz grubu enzimlere (tripsin, kimotripsin, elastaz, peptidaz) ait spesifik aktivite, ilk 3 hafta düzenli bir artış izlemiştir. En yüksek alkaline proteaz aktivitesi A grubunda $145,2 \pm 13,2$ mU/mg protein⁻¹ ölçülmüştür. Alkalın proteaz aktivitesi açısından A grubu ile B grubu arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Deneme süresince larvalarda gözlenen alkalın proteaz aktivitesindeki değişimler, Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

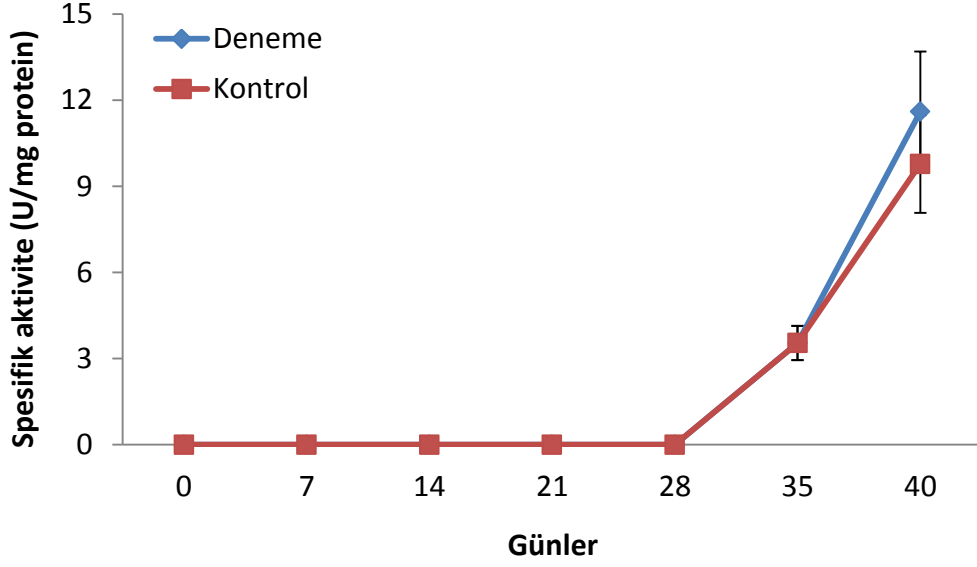


Şekil 4.2. Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen alkalın proteaz aktivitesindeki değişimler

4.2.2 Asit Proteaz

Larval dönemde özellikle fonksiyonel mide oluşumu ve gastrik bezlerin salgı işlevine başlamasıyla birlikte asidik ortamda (pH 1,0-2,0) sindirim aktivitesine katılan proteaz grubu enzimlere (pepsin, pepsin-like) ait spesifik aktivitede 35. güne kadar herhangi bir tespit yapılamamıştır. Mikropartikül toz yem girişinin ardından 35. günde ilk kez aktivite izlenmiş ve 40. güne kadar değişim devam etmiştir. Denemeler sonunda A grubu ile B grubu arasında asit proteaz enzim aktivitesi açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Şekil

4.3'te, deneme süresince larvalarda gözlenen asit proteaz aktivitesindeki değişimler tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 Deneme süresince çipura larvalarında gözlenen asit proteaz aktivitesindeki değişimler

Deneme süresince probiyotik uygulanan ve uygulanmayan çipura larvaları arasındaki görsel farklar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. uygulanan 15 günlük çipura larvasında mide ve bağırsakta protein yapılarının dağılımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akuakültürde üretimin artması patojen çeşitliliğini arttırmakta ve bakteriyel direnç gelişimini de içine alan pek çok ekolojik etkiye yol açmaktadır. Bu olumsuz etkiler, üretim periyodu boyunca yapılan uygulamaların (gelişi güzel kemoteropatik madde kullanımı vb.) bir sonucu olarak görülmektedir. Akuakültürde probiotik kullanımı, bu olumsuz etkilerin azaltılması için yeni bir yaklaşım olarak yer almaktadır. Ayrıca probiotik bakterilerin etki mekanizması göz önünde bulundurulduğunda üretimi yapılan canlıların yaşama oranının artırılması, büyüme parametreleri ve enzim aktiviteleri üzerine olumlu etkileri olduğu araştırmalarda tespit edilmiştir (Gatesoupe, 1999).

Bu çalışmada, *Bacillus sp.* türü bakteriler probiotik olarak canlı yem kültürüne ve tank ortamına eklenmiş ve sonuçta bağırsakta faaliyet gösteren sindirim enzimleri aktivitesi açısından deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Bazı araştırmacılar, mikroorganizmaların sucul canlıların sindirim işleminde yardımcı olduğunu bildirmektedir (Gatesoupe, 1999). Balıklarda *Bacteroides* ve *Clostridium sp.*'nin, konakçının beslenmesini özellikle vitaminler ve yağ asitleri sağlama yoluyla destekledikleri rapor edilmiştir. Bazı mikroorganizmalar, *Agrobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Microbacterium sp.* ve *Staphylococcus sp.*, *Salvelinus alpinus*'larda besinsel işlemleri destekleyebilmektedir (Ringo et al., 1995). Ayrıca bazı bakteriler ekstraselüler enzimler (proteaz, lipaz vb.) ve hatta gerekli büyüme faktörleri üreterek Bivalve'lerin sindirim işlemine yardımcı olurlar. Benzer bulgular ergin karideslerin mikrobiyal florası içinde bildirilmiştir. Mikrobiota, yemlerde ek kaynak olarak görev alabilir ve sindirim kanalındaki mikrobiyal aktivite, vitamin ve esansiyel aminoasit kaynağı olabilir (Balcazar et al., 2006).

Bairagi et al.. (2002), 9 adet tatlı su balığının bağırsaklarından izole ettikleri seçilmiş bakteriyel suşların sindirim enzimleri ürettiklerini ve böylece yemden yararlanmayı ve sindirimi kolaylaştırdıklarını saptamışlardır. Ramirez and Dixon (2003), 3 balık türünden izole ettikleri anaerobik bağırsak bakterilerinin enzimatik özelliklerini ortaya koymuşlar ve potansiyel olarak probiotik rol oynayabileceklerini ifade etmişlerdir. Bairagi et al. (2004) *Labeo rohita*'ların yemlerine *B.subtilis* ve *B.circulans*'ın ilavesi gelişim, yem dönüşüm oranı, protein etkinlik oranı gibi faktörleri etkileyerek performansın arttığını bildirmişlerdir.

Bakteriler bu gelişimi, selülozu ve nişastayı hidrolize edebilen hücre dışı selülotik ve amilolitik enzim üreterek sağlamaktadırlar (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Süzer vd., 2008, çipura (*Sparus aurata*) larvalarıyla yaptıkları çalışmada *Lactobacillus sp.* sporları içeren ticari bir probiyotik ürün (Biotexin-LC (sıvı form), Protexin (spor form)) kullanmış ve *Lactobacillus sp.* uygulanan gruplarda büyüme parametreleri ve enzim aktivitesi açısından kontrol grubuna göre önemli farklılıkların tespit edildiğini bildirmişlerdir ($p < 0.05$).

Bu çalışmada da; deney tanklarında kontrol tanklarına oranla enzim aktivitelerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Alkalın proteaz aktivitesine bakıldığında deneme grubunda kontrol grubuna oranla oldukça büyük farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bunun sebebi olarak, kullanılan *Bacillus sp.* türü probiyotiklerin salgılamış oldukları enzimlerin etkisi olduğu düşünülmektedir.

Gatesoupe (1994), laktik asit bakterileri ile zenginleştirdiği rotiferleri kalkan balığı larvalarının beslenmesinde kullanımı ile ortalama ağırlığın ve hayatta kalma oranlarının önemli ölçüde arttığını ve patojenik *Vibrio sp.* türlerine karşı önemli bir koruma sağladığını bildirmektedir.

Bacillus sp. türlerinin karışımını içeren ticari probiyotiklerin yetiştiricilik suyuna eklenmesinin kanal yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) üretimi ve larvalarda hayatta kalma oranını artırdığı bildirilmektedir (Queiroz and Boyd, 1998). Probiyotiklerin yemden yararlanma parametrelerini olumlu şekilde etkilemesi bazı araştırmacıların dikkatini son yıllarda probiyotiklerin sindirim aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemeye yöneltmiştir (Gatesoupe, 1999).

Dulluç (2010) çalışmalarında tilapia (*O.niloticus*) ve aynalı sazan (*C.arpio*) yavrularının yemlerine Bactocell® (*Pediococcus acidilactici*) ticari ürününün büyüme ve yem değerlendirmesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Deneme sonunda probiyotik ilavesinin tilapia ve aynalı sazan yavrularının büyümesi üzerine etki etmediği belirlenmiştir.

Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*), karides (*Fenneropenaeus indicus*) larvaları ile yapılan çalışmalarda üretim suyuna ve canlı yem (rotifer ve artemia) ile verilen probiyotikler başta larval gelişim ve yaşama oranı olmak üzere sindirim enzimleri aktivitesini ve büyüme parametrelerini önemli derecede artırdığı bildirilmiştir (Süzer vd., 2008; Zaiaei-Nejad et al., 2006).

Bu çalışma da ise, probiotik ürün hem canlı yem olarak kullanılan rotifer kültürüne hem de tank ortamına ilave edilmiştir. Kullanılan probiotik bakterilerin etkili bir şekilde çalıştığı tespit edilmiştir. Yaşama oranının bu derece farklılık göstermesi probiotik bakterilerin patojenlere karşı antogonistik etki göstermiş olduğunu, alkalın proteaz enzim aktivitesinin yüksek oluşu ise probiotik bakterilerinde enzim salgıladıklarını düşündürmüştür.

Probiotiklerin su kalitesi üzerine etkisini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Bir grup yararlı mikroorganizmanın (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodoseudomonas*, *Acinetobacter*) sudaki organik yükün mineralizasyonuna yardımcı olarak, su kalitesi ve patojen mikroorganizmaların kontrolü için yararlı olabilecekleri ifade edilmektedir (Shariff et al., 2001; Irinato and Austin, 2002). Su kalitesinin düzeltilmesinde özellikle *Bacillus sp.* türleri kullanılmaktadır. Gr (+) bakteriler organik maddeyi CO₂'de, Gr (-) bakterilerden daha iyi dönüştürürler. Üretim döngüsü sırasında yüksek seviyedeki Gr (+) bakteriler çözünmüş ve partiküler organik karbonu minimize edebilirler. *Bacillus sp.* türleri yetiştiriciliğin yapıldığı su ortamındaki patojenlerin sayısını azaltarak ve sudaki mikrobiyal popülasyonun kompozisyonunu etkileyerek su kalitesini iyileştirmektedir. Bu nedenle *Bacillus sp.* türlerinin sucul ortamdaki potansiyel patojenlere karşı antogonistik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Irinato ve Austin, 2002). *Bacillus sp.*'nin kullanımının su kalitesini iyileştirmesiyle *Penaeus monodon* juvenillerinin sağlık durumlarını, büyüme ve yaşama oranlarını arttırdığı ve patojenik *Vibrio sp.* türlerini azalttığı bildirilmiştir (Balcazar et al., 2006).

Bu çalışmada da, su kalitesi kriterleri; pH 7,5-8,5, amonyak 0-0,5 ppm, oksijen 5-6 ppm olarak gözlenmiş olup, bakteriyel yükün *Bacillus sp.* kullanılan deneme gruplarında daha az olduğu tespit edilmiştir.

Patojenik bakterilerin neden olabileceği hastalıklar probiotik kullanımı ile önlenbilir veya azaltılabilir ki, bu balığı çok daha dayanıklı kılar. Probiotiklerin besin ve ya vitamin sağlayarak balıkta direkt olarak büyümeyi teşvik ettiği kabul edilir. Ayrıca deneysel olarak probiotiklerin balıklardaki büyüme performansını artırdığı gözlemlenmiştir (Skjermo, J.,1998). Ayrıca, probiotiklerin immun sistemi desteklemesi nedeniyle özellikle larval dönemde yüksek mortaliteye neden olan *Vibrio* (Planas et al., 2005; Rengpipat et al., 1998), *Carnobacterium sp.* (Robertson et al., 2000) gibi hastalıkların önlenmesinde ve mikrobiyal yükün izlenmesinde (Eddy and Jones, 2002) de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Sucul organizmaların spesifik olmayan bağışıklık sistemi probiotiklerle uyarılabilir. *Clastridium butyricum* bakterisinin gökkuşığı alabalığına verilmesi balığın *Vibriosis*'e karşı direncini yükseltmiştir. Bu yükseltme, lökositlerin fagositik aktivitesinin artmasıyla sağlanmıştır. Yapılan başka bir araştırmada *Bacillus sp.*'nin kullanılmasının *P.monodon*'da hem humoral bağışıklık savunmasını hem de hücrel aktivasyon yoluyla hastalıklardan korunmayı sağlamıştır. *Bacillus sp.* ve *Vibrio sp.* karışımı suşların kullanılması da beyaz karides yavrularının büyüme ve yaşama oranlarını etkilemiş, ayrıca beyaz benek sendromu virüsü ve *Vibrio harvei* patojenlerine karşı koruyucu etkileri bulunmuştur. Bu koruyucu etki, fagositozis ve antimikrobiyal etkinin artmasından kaynaklanmaktadır (Balcazar et al., 2006). Gullian ve diğ. (2004) bakteriyel ürünlerin (örneğin glukanlar ya da lipopolisakkaritler) bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerini test etmişler ve *Bacillus sp.* türünün bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi olduğunu belirlemişlerdir.

Akuakültürde kullanılan ilk probiotik uygulamaları daha çok patojen mikroorganizmalara karşı immun sistemin güçlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Özellikle *Vibrio sp.* ve *Aeromonas sp.* orijinli enfeksiyonların kültürü sıklıkla yapılan Atlantik salmon (*Salmo salar*) ve gökkuşığı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) izlenen mortalitelerin azaltılması amacıyla uygulandığı çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Robertson et al., 2000; Aubin et al., 2005; Panigrahi et al., 2005). Tatlı su türlerinde elde edilen bu başarıların ardından başta laktik asit bakterileri olmak üzere bazı mikroorganizmalar probiotik olarak yine hastalıklara karşı immun sistemin güçlendirilmesi ve direncin geliştirilmesi amacıyla kültürü yapılan deniz balıkları yetiştiriciliğinde de başarı ile kullanılmıştır (Eddy and Jones, 2002; Gatesoupe, 2002; Planas et al., 2005; Carnevali et al., 2006).

Probiotiklerin bu tip yararlarının tespitinin ardından farklı alanlarda farklı sorunların çözümlenmesinde de kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, Villamil et al. (2002) kalkan (*Scophthalmus maximus*) Aubin et al. (2005) gökkuşığı alabalığı larva üretim periyodu süresince sıklıkla izlenen iskelet deformasyonlarının önlenmesinde *Lactobacillus sp.* bakterilerinin olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir. Ayrıca, larva üretim prosesi içinde önemli bir yer tutan yumurtaların ve açılımı sonrası prelarvaların dezenfeksiyon başarımının artırılması amacıyla dezenfeksiyon ortamına probiotik eklenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Skjermo and Vadstein, 1998; Olafsen, 2001).

Probiotiklerin özellikle alınan besin maddelerinin değerlendirilmesinde, yemden yararlanmada ve sindiriminde önemli katkılar sağladığı bir çok akuatik organizmada yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Gatesoupe et al., 1999, 2002; Rollo et al, 2006).

Ülkemizde kültürü sıklıkla yapılan levrek larva yetiştiriciliğinde mayanın (*Saccoromyces cerevisia*) yemlere eklenmesiyle yemden yararlanma ve yem dönüşüm oranlarında önemli artışlar olduğu tespit edilmiştir (Tovar-Ramirez et al., 2002, 2004). Benzer şekilde, yemlere probiotik eklenmesi sonrasında yem değerlendirme parametrelerindeki önemli iyileşmeler tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Haroun et al., 2006), karides (*Litopenaeus vannamei* ve *Penaeus monodon*) (Rengpipat et al., 1998; Lin et al., 2004), abalon (*Haliotis midae*) (Macey and Coyne, 2005), tarak (*Argopecten purpuratus*) (Riquelme et al., 1997) kültürlerinde de elde edilmiştir.

Ziaei-Nejad et al. (2006) Hindistan karidesi (*Fenneropenaeus indicus*) ile yaptıkları çalışmada canlı yem kültürüne ve tank ortamına *Bacillus sp.* ait beş tür probiotik bakteri kullanmış ve en iyi larval gelişim ve sindirim enzimleri aktivitesindeki artış canlı yem kültürüne probiotik eklenen grupta tespit edilmiştir.

Wang et al. (2007) *Penaeus vannamei* türü karides larvalarına farklı oranlarda *Bacillus sp.* türü probiotik vermiş ve tüm deneme gruplarındaki larval gelişim ve sindirim enzimleri aktivitesini kontrol grubuna göre göreceli olarak yüksek bulmuştur.

Rengpipot et al. (1998) Kaplan karidesi (*Penaeus monodon*) ile yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* türü probiotik kullanılmış ve büyüme parametrelerinde kontrol grubuna göre önemli farklar tespit edilememiştir. Ancak, *Vibrio harveyi* patojenine karşı probiyotik uygulanan deneme grubu %100 yaşama oranına sahipken bu oran kontrol grubunda %26 olarak tespit edilmiştir.

Probiotiklerin kültürü yapılan deniz ya da tatlı su balıklarında ya da larvalarında sindirim enzimleri üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırmalar sınırlıdır.

Wang et al. (2006) sazan juvenilleri ile yaptıkları çalışmada ise, *Bacillus sp.* ve fotosentetik bakteri hücreleri ile oluşturulmuş probiotik preparatı yemlerle karıştırılarak balığa aktarılmıştır. Sonuç olarak amilaz, lipaz ve total proteaz enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli derecede farklar elde edilmiştir. Bunun yanı sıra büyüme performansının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Makridis et al. (2005) ipura larvalarında yaptığı bir çalışmada, rotifer ve artemia kültürlerinden izole edilen probiotik bakteriler direkt olarak ortam suyuna ilave edildiğinde yaşama oranının deneme grubunda %86, kontrol grubunda ise %39 olduğu tespit edilmiştir.

Yaygın olarak kullanılan diğer probiotikler spor üreten *Bacillus* sp. ve mayalardır. *Bacillus* sp.'lerin tutunma yetenekleri, bakteriyosin üretimi ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi kanıtlanmıştır (Kesarcodi-Watson et al., 2008). Kumar et al. (2006) in sazanı (*Labeo rohita*) zerinde *Bacillus subtilis* katkılı yem ile yapılan çalışmada deneme sonunda %87.50 yaşama oranı ve %35.5 ağırlık artışı kontrol grubuna göre göreceli olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca deneme grubu *Aeromonas hydrophila* patojeni ile mücadele ederken, kontrol grubunda bu patojen bakteriyi inhibe edebilmek için kimyasal maddeler kullanıldığı bildirilmiştir.

Kesarcodi-Watson et al. (2008) yaptığı bir çalışmada demir için rekabet deniz bakterilerinde önemli bir faktör olarak rapor edilmiştir. Demir bağlayan maddeler, sedeforlar, mikrobiyal gelişim için uygun demirin sağlanması izin verir. Probiotiklerin sedefor üretimi, sınırlı demir şartları altında patojen bakterileri demirden mahrum bırakır. Sınırlı demir şartlarında gelişen *Pseudomonas fluorescens*'in kültür spernatantının *Vibrio anguillarum*'un gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Wang and Xu (2006) sazan jvenilleri ile yaptıkları çalışmada yeme farklı oranlarda *Bacillus* sp. türü probiotik eklemiş ve bu yemle beslenen gruplarda kontrol grubuna göre larval gelişim, yem değerlendirme ve sindirim enzimleri aktivitesinde önemli farklılıklar elde edilmiştir.

Larvaya yararlı mikrobiyal karışım içeren sağlıklı bir ortam hazırlamak önemlidir. Bakım tanklarında bakterilerin elemine edilmesi veya kontrolü amacıyla antimikrobiyal maddelerin kullanımı büyük problemlere yol açabilmektedir. Örneğin *Vibrio alginolyticus* bir probiotik olarak kabul edilmekte ancak bu bakterinin diğer türleri karideslerde (*Penaeus vannamei*, *Penaeus monodon*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında vibriosise neden olmaktadır. Bu nedenle probiotik bakteri seçiminde, canlının kendi bünyesinden ya da bulunduğu ortamdan seçilen potansiyel probiotiklerin daha iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Tablo 5.1'de biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılacak probiotiklerin nereden elde edildikleri gösterilmiştir, bu şekilde potansiyel probiotiklerin de elde edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çizelge 5.1. Akuakültürde balıklarda ve kabuklularda kullanılan probiotikler (Balcazar et al., 2006)

BALIKLAR				
Bakteri türü	Bakterini kaynağı	Kullanıldığı tür	Uygulama metodu	Araştırmacı
<i>Streptococcus lactis</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Canlı yem	Kalkan larvaları (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Canlı yeme ilave	García de la Banda vd. (1992)
<i>Lactobacillus</i> sp. ve <i>Carnobacterium</i> sp.	Rotifer	Kalkan larvaları	Rotifere ilave	Gatesoupe (1994)
	(<i>B. plicatilis</i>)			
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Ticari karides kuluçkahanesi	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.)	Bakteriyel süspansiyonla banyo	Austin vd.(1995)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Atlantic salmon bağırsakları	Atlantic cod fry	Yeme ilave	Gildberg ve Mikkelsen (1998)
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. licheniformis</i>	Ticari ürün (Biostart)	Kanal yayın balıkları	Havuz suyuna ilave	Queiroz ve Boyd (1998)
<i>Vibrio pelagius</i>	Kalkan larvaları	Kalkan	Kültür suyuna ilave	Ringø ve Vadstein (1998)
G-probiotic	Ticari ürün	<i>Oreochromis niloticus</i>	Yeme ilave	Naik vd. (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dondurulmuş <i>Lates niloticus</i>	Gökkuşuğu alabalığı	Kültür suyuna ilave	Gram vd. (1999)
<i>Carnobacterium</i> sp.	Atlantic salmon bağırsakları	Atlantic salmon	Yeme ilave	Robertson vd. (2000)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Kültür koleksiyonu	Gökkuşuğu alabalığı	Yeme ilave	Nikoskelainen vd. (2001)
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> sp., <i>Micrococcus luteus</i>	Gökkuşuğu alabalığı sindirim sistemi	Gökkuşuğu alabalığı	Yeme ilave	Irianto ve Austin (2002)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Ticari ürün (Cernivet)	<i>Anguilla anguilla</i>	Yeme ilave	Chang and Liu (2002)
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	Kültür koleksiyonu	Gökkuşuğu alabalığı	Yeme ilave	Panigrahi vd. (2004)
<i>Roseobacter</i> sp. strain 27-4	Kalkan larvaları	Kalkan larvaları	Kültür suyuna ilave	Hjelm vd. (2004)
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Labeo rohita</i> bağırsakları	<i>L. rohita</i>	Yeme ilave	Ghosh vd. (2004)

KABUKLULAR				
Bakteri türü	Bakterini kaynağı	Kullanıldığı tür	Uygulama metodu	Araştırmacı
<i>Bacillus</i> sp. S11	<i>Penaeus monodon</i>	<i>P. monodon</i>	Yeme ilave	Rengpipat vd. (1998)
<i>Bacillus</i> sp.	Ticari ürün (DMS)	<i>P. monodon</i>	Kültür suyuna ilave	Moriarty (1998)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Tavuk sindirim sistemi	<i>P. monodon</i>	Yeme ilave	Phianphak vd. (1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i>	Ticari ürün	<i>Penaeus vannamei</i>	Yeme ilave	Scholz vd. (1999)
<i>Vibrio hepatarius</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	<i>P. vannamei</i>	<i>P. vannamei</i>	Yeme ilave	Balcázar (2003)
<i>Vibrio</i> P62, <i>Vibrio</i> P63, <i>Bacillus</i> P64	<i>P. vannamei</i>	<i>P. vannamei</i>	Kültür suyuna ilave	Gullian vd. (2004)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Vibrio fluvialis</i>	<i>P. monodon</i>	<i>P. monodon</i>	Kültür suyuna ilave	Alavandi vd. (2004)

Sonuç olarak, bu çalışmada ilk kez çipura larvalarında *Bacillus* sp. türü bakteriler probiotik olarak canlı yem kültürüne ve tank ortamına eklenmiştir. Sonuçta yaşama oranı ile bağırsakta faaliyet gösteren sindirim enzimleri aktivitesi açısından deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Ayrıca, canlı yemler aracılığıyla larvalara verilen probiotiklerin olduğu grupta diğer gruplara göre daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Çipura larvaları ile probiotik uygulamasının gerek gelişim ve büyüme parametreleri gerekse sindirim enzimleri aktivitesi üzerine etkilerinin kültürü sıklıkla yapılan diğer deniz balıkları türleri içinde tespit edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- **Alarcon, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. and Abellán, E.**, 1998, Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) and common dentex (*Dentex dentex*, L.), *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 257-267 pp.
- **Alpbaz, A.**, 1990. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları. No:13. E.Ü. Basımevi, Bornova-İzmir
- **Anson, M.L.**, 1938, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, Downloaded from [jpg. rupress.org](http://jgph.rupress.org)
- **Ashraf, A.** 2000, Probiotics in fish farming- Evaluation of a candidate bacterial mixture. Licentiate thesis, 19 p.
- **Aubin, J., Gatesoupe, J., Labbe, L., Lebrun, L.**, 2005, Trial of probiotics to prevent vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture research* **36**, 758-767
- **Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Effendi, I., Griffith, D.**, 1995, A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* **18**, 93–96.
- **Bairagi, A., Sakar Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K.**, 2002, Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts, *Aqua-culture International*, **10**, 109–121.
- **Bairagi, A., Sakar Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K.**, 2004, Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings, *Aquaculture Research*, **35**: 436–446.
- **Balcazar, J.L.**, 2003, Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. *Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Balcázar, J.L., Blas, I., Zarzuela, I.R., Cuning-ham, D., Vendrell, D. and Muzquiz, J.L.**, 2006, The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, **114**: 173-186.
- **Bradford M.M.**, 1976, A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- **Can, E.**, 2001, Probiotik Ürünlerin Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) Larvalarının Gelişimine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü, 76s.
- **Carnevali, O., Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A.**, 2006, Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* **258**, 430-438
- **Chang, C.I., Liu, W.Y.**, 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.* **25**, 311–315.
- **Chatain, B.**, 1986, La Vessie Natatoire Chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. 1.Aspects morhologiques du Development sur la Croissanca de la Larvae, *Aquaculture* **65**, 175-181 pp.
- **Çakmakçı, L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ.**, 2002, Probiyotikler ve etki mekanizmaları. *Gıda mühendisliği dergisi*, **12**; 15-19.
- **Dinçkaya, E.**, 1997a, Enzimatik Analizler. *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu 1997* (Editör Azmi Telefoncu), s:307-352.
- **Dinçkaya, E.**, 1997b, Enzimolojiye Genel Bakış. *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu 1997* (Editör Azmi Telefoncu), s:1-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Dulluç, A.**, 2010, Probiyotik ilaveli beslemenin Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) ve Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio* L. 1758) yavrularının büyüme ve yem değerlendirmesine etkileri. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Doktora Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*.173-186.
- **Eddy, S.D. and Jones, S.H.**, 2002, Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture* **211**, 9-28
- **Fernández, M.F., Boris, S. and Barbès, C.**, 2003, Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, *Journal of Applied Mikrobiology*, 94; 449-455
- **Fishbase.org** (Erişim tarihi: 27.05.2012)
- **Fuller, R.**, 1989, Probiotics in man and animals. *J.Apply Bacteriol* 66, 365-378
- **Gatesoupe, F.J.**, 1994, Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio, *Aquatic Living Resources*, **7**: 277–282.
- **Gatesoupe, F.J.**, 1999, The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- **Gatesoupe, F.J.**, 2002, Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212, 347–360.
- **Gomez-Gill, B., Roque, A. and Turnbull, J.F.**, 2000, The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms, *Aquaculture*, **191**: 259-270.
- **Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K.**, 2004. Growth and survival of rohu *Labeo rohita* (Hamilton) spawn fed diets fermented with intestinal bacterium, *Bacillus circulans*. *Acta Ichthyol. Piscat.* **34**, 155–165.
- **Gözükara, E.M.**, 1997, *Biyokimya* 2, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Gram, L., Melchiorson, J., Spangaard, B., Huber, I. and Nielsen, T.F.,** 1999, Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 968-973.
- **Gullian, M., Thompson, F. and Rodriguez, J.,** 2004, Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *P.vannemei*, *Aquaculture*, **233** (1-4): 1-14.
- **Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., Gram, L.,** 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 360–371.
- **Irianto, A. and Austin, B.,** 2002, Use of probiotics to control furunculosis in Rainbow trout, *On-corhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, **25**: 333–342.
- **Karlson, P.,** 1992, Biyokimya. Arkadaş Tıp Kitapları Seri No: 7, Çeviren: Prof. Dr. Azmi Telefoncu, İstanbul.
- **Katircioğlu, H.** 2001, Gökkuşacağı alabalığı ve aynalı sazandan izole edilen laktik asit bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- **Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.L.J. and Gibson, L.,** 2008, Probiotics in aqu-aculture: The need, principles and mechanism of action and screening processes, *Aquacul-ture*, **274**: 1-14.
- **Kolkovski, S.,** 2001, Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and application to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181-201.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Kumar, R., Mukherjee S.C., Prasad K.P. and Pal, A.K.,** 2006, Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian Major carp *Labeo rohita*(Ham.). *Aquaculture Research* **37**, 1215-1221
- **Makridis, P., Matins, S., Vercauteren, T., Driessche, V.K., Decamp, O. and Dinis, M.T.,** 2005, Evaluation of candidate probiotic strains for githead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an invivo approach. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 274-277
- **Moriarty, D.,** 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**, 351–358.
- **Naik, A.T.R., Murthy, H.S., Ramesha, T.J.,** 1999. Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish. Technol.* **36**, 63–66.
- **Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A.,** 2001. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2430–2435.
- **Olafsen, J.A.,** 2001, Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* **200**, 223-247
- **Queiroz, F. and Boyd, C.,** 1998, Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds, *Journal of the World Aquaculture Society*, **29**: 67–73.
- **Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kaboyashi, T., Satoh, S. and Sugita, H.,** 2005, The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **243**, 241-254
- **Parker,R.B.,** 1974, Probiotics; The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health* **29**, 4-8
- **Phianphak,W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P.,** 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Sci. Res. Chula Univ.* **24**, 42–51.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Planas, M., Lorenzo, M., Hjelm, M., Gram, L., Fiksdal, I.U., Berg, O. and Pintado, J.**, 2005, Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillaum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus*, L.) larvae. *Aquaculture* **255**, 323-333
- **Ramirez, R.F. and Dixon, B.A.**, 2003, Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethos-tigma*), *Aquaculture*, **227**: 417-426.
- **Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P.**, 1998, Effects of aprobio-tic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth, *Aquaculture*, **167**: 301-313.
- **Ringo, E., Strøm, E. and Tabacheck, J.**, 1995, In-testinal microflora of salmonids: a Review, *Aquaculture and Research*, **26**: 773-789.
- **Ringo, E. and Gatesoupe, F.J.**, 1998, Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* **160**, 177–203.
- **Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A. and Carnevali, O.**, 2006, Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerans. *Fish Physiol Biochem* **32**, 167-177
- **Robertson, P., ÓDowd, C., Burrells, C., Wil-liams, P. and Austin, B.**, 2000, Use of *Carno-bacterium* sp. as a probiotic for atlantic sal-mon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*On-corhynchus mykiss*, Walbaum), *Aquaculture*, **185**: 235-243.
- **Saka, Ş. ve Fırat, K.**, 2009, Çipura (*Sparus aurata* L., 1758) Balığının Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, http://www.tarim.gov.tr/uretim/Su_Urunleri,Cipura.html
- **Sakata, T.**, 1990, Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish, In R. Lesel [eds.], *Microbiology in Poecilotherms*, Elsevier, 171-176.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Ricque, D., Cruz-Suarez, L.E., Vargas- Albores, F., Latchford, J.**, 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture* **176**, 271–283.
- **Shariff, M., Yusoff, F.M., Devaraja, T.N. and Srinivasa Rao. P.S.**, 2001, The effectiveness of a commercial microbial product in poorly pre-pared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabri-cius), ponds, *Aquaculture and Research*, **32**: 181-187.
- **Skjermo, J. and Vatstein, O.**, 1998, Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *SINTEF Applied Chemistry, Center of Aquaculture, N-7037 Trondheim Biological Station, The Norwegian University of Science and Technology, N-7018 Trondheim, Norway*
- **Sterchi, E., E. and Stöcker, W.**, 1999, *Proteolytic Enzymes Tools and Target*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999.
- **Suzer, C., Çoban, D., Kamacı, O., Saka, Ş. ve Fırat, K.** 2008, *Lactobacillus spp.* Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities, *Aquaculture*, **280**: 140-145
- **Trevor Palmer, B.A.**, 1985, *Understanding Enzymes*, Second Edition. Ellis Horwood Limited, 1985.
- **Wang, Y.B. and Xu, Z.R.**, 2006, Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim. Feed Sci. Technol.* **127**, 283–292.
- **Wang, Y. B.**, 2007, Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **269**, 259-264.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- **Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A. and Novoa, B.**, 2002, Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*), *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9**: 1318-1323.
- **Vine, N.G.**, 2004, Towards the development of a protocol for the selection of probiotics in marine fish larviculture. *A thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy of Rhodes University*
- **Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R. and Shakouri, M.**, 2006, The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516–524.

ÖZGEÇMİŞ

T.C. vatandaşı olan Nihan ARIĞ, 08 Aralık 1985 tarihinde Adapazarı'nda doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Adapazarı'nda tamamladıktan sonra 2004 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'ni kazandı. 2008'de lisans eğitimini tamamlayan Arıĝ, Eylül 2009'da Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Arıĝ, 2008-2011 yılları arasında Kılıç Holding'e bağlı Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş.'de çalışmıştır.