

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOYUMAK SİSTEMLERİNDE MİKROBİYOTANIN ZAMANA BAĞLI  
DEĞİŞİMİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Atakan Pipilos

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Emre Keskin

Ocak

2024

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ad Soyad: Atakan PİPİLOS

İmzası:

## ONAY

Prof. Dr. Emre Keskin danışmanlığında Atakan Pipilos tarafından hazırlanan bu çalışma 08/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Efe SEZGİN

İmza:

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ

İmza:

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye: Prof. Dr. Emre KESKİN

İmza:

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Biyoyumak Sistemlerinde Mikrobiyotanın Zamana Bağlı Değişiminin Metagenomik  
Analizi

Atakan Pipilos

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Emre Keskin

Biyoyumak teknolojisi su ürünleri yetiştiriciliğinde yetiştiriciliği yapılan canlının besin ihtiyaçlarını karşılama, patojenite etmenlerine karşı direncini artırma, canlının ekonomik değerini (boy, ağırlık vb.) artırma ve atık suların geri kazanılması gibi değerli katkıları ile son yıllarda kullanımı giderek artan bir teknoloji olarak yetiştiricilikte yerini almaktadır. Belirli bir çevrede toplanan mikroorganizma (bakteri, arke, virüs ve mantar) topluluğunun sahip olduğu genetik materyal olarak tanımlanan mikrobiyom terimi biyoyumak teknolojilerinin temelini oluşturmaktadır. Yüksek verimli dizileme tekniklerini içeren çevresel DNA metabarkodlama gibi modern moleküler teknikler kültüre edilemeyen türlerin de dahil edildiği, mikrobiyal çeşitliliğe daha kapsamlı bir bakış açısı fırsatı sağlayarak biyoyumak sistemlerine farklı (karbon ve azot kaynaklarının kullanımı, karbon:azot oranını, sıcaklık ve hava alımı parametrelerinin değişimi, probiyotik ve prebiyotik katkısı vb.) faktörlerin eklenmesi veya değiştirilmesi sonucu elde edilecek mikrobiyal taksonomik profillerin incelenmesini olanaklı kılmaktadır. Bu çalışmada dört periyottan oluşan 21 günlük örnekleme sürecinde konaktan bağımsız kapalı devre bir biyoyumak sisteminin farklı katkıları sonucu içerdiği mikrobiyom profilinin değişimi taksonomik olarak eDNA metabarkodlama ve yeni nesil dizileme metotları kullanılarak takip edilmiştir.

2024, 142 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Mikrobiyom, Çevresel DNA (eDNA), Metagenomiks, Biyoyumak teknolojisi

## **ABSTRACT**

Msc Thesis

Metagenomic Analysis of Time-Dependent Change of Microbiota in Biofloc Systems

Atakan Pipilos

Ankara University, Biotechnology Institute

Prof. Emre Keskin

Biofloc technology has taken its place in aquaculture as a technology whose use has been increasing in recent years, with its valuable contributions such as meeting the nutritional needs of the organisms raised in aquaculture, increasing its resistance to pathogenic factors, increasing the economic value of the organism (height, weight, etc.) and recycling wastewater. The term microbiome, defined as the genetic material of a community of microorganisms (bacteria, archaea, viruses and fungi) collected in a certain environment, forms the basis of biofloc technologies. Modern molecular techniques such as environmental DNA metabarcoding, which include high-throughput sequencing techniques, provide the opportunity for a more comprehensive perspective on microbial diversity, including non-culturable species, and provide the opportunity for a more comprehensive perspective on biofloc systems (use of carbon and nitrogen sources, carbon:nitrogen ratio, change of temperature and air intake parameters, etc.). It makes it possible to examine the microbial taxonomic profiles that will be obtained as a result of adding or changing factors (probiotic and prebiotic contribution, etc.). In this study, during a 21-day sampling period consisting of four periods, the change in the microbiome profile of a closed-circuit biofloc system independent of living things as a result of different contributions was followed taxonomically using eDNA metabarcoding and next-generation sequencing methods.

2024, 142 pages

**Keywords:** Microbiome, Environmental DNA (eDNA), Metagenomics, Biofloc Technology

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yolculuğum boyunca bir rehber ve akıl hocası olarak yanımda olan, beni manevi, maddi ve akademik anlamda destekleyen kıymetli danışmanım Prof. Dr. Emre Keskin'e,

Her anımda desteklerini hissettiğim, güçlü bir ekibin parçası olmaktan gurur duyduğum Evrimsel Genetik Laboratuvarı (eGL) ekibine,

Tez çalışmamın her aşamasında bana ilham ve cesaret veren değerli hocam Prof. Dr. Ercüment Genç'e,

TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile beni destekleyen TÜBİTAK'a,

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. BİYOYUMAK TEKNOLOJİSİ .....	3
2.2. DNA BARKODLAMA .....	5
2.3. ÇEVRESEL DNA (EDNA) .....	6
2.4. ÇEVRESEL DNA (EDNA) METABARKODLAMA.....	7
2.5. MİKROBİYOM .....	8
<b>3. GEREKÇE VE AMAC</b> .....	<b>10</b>
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>12</b>
4.1. MATERYAL .....	12
4.1.1. ARAŞTIRMA YERİ .....	12
4.1.2. BAKTERİ KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERLERİ.....	14
4.1.2.1. Katı Besiyeri .....	14

4.1.2.2. Sıvı Besiyeri.....	14
4.1.3. BİYOYUMAK OLUŞUMUNDA KULLANILAN KARBON VE AZOT KAYNAKLARI .....	15
4.1.4. BİYOYUMAK OLUŞUMUNDA KULLANILAN PROBİYOTİKLER .....	16
4.1.5. ÇEVRESEL DNA ÖRNEKLEMESİNDE KULLANILAN MATERYALLER .....	16
<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
4.2.1. BAKTERİ SUŞLARININ KÜLTÜRÜ.....	17
4.2.2. BİYOYUMAK OLUŞUMU VE SÜRDÜRÜLMESİ .....	18
4.2.3. ÇEVRESEL DNA (EDNA) İZOLASYONU .....	22
4.2.3.1. Steriveksten eDNA İzolasyonu.....	22
4.2.3.2. Katı Biyoyumaktan eDNA İzolasyonu .....	23
4.2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU .....	24
4.2.5. KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI .....	25
4.2.5.1. İndeksli Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	25
4.2.5.2. Kütüphane Oluşturma Aşaması .....	27
4.2.5.2.1. PZR Clean-Up Aşaması.....	28
4.2.5.2.2. İndeks PZR .....	29
4.2.5.2.3. İkinci PZR Clean-Up Aşaması .....	30
4.2.5.3. Kütüphane Validasyonu.....	32
4.2.5.4. Kütüphanenin Pool Edilmesi .....	32
4.2.6. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER .....	33
4.2.6.1. Verilerin Filtrelenmesi .....	33
4.2.6.2. Taksonomik Tanımlama .....	34

4.2.6.2.1. SILVAngs .....	34
4.2.6.2.2. Geneious BLAST.....	35
<b><u>5. ARASTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>36</b>
<b>5.1. BİYOYUMAK OLUŞUMU.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI .....</b>	<b>36</b>
5.2.1. SPEKTROFOTOMETRE SONUÇLARI.....	36
5.2.2. DNA İZOLASYON SONUÇLARI .....	38
5.2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI.....	38
5.2.4. İNDEKSLİ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI.....	40
5.2.5. KÜTÜPHANE AŞAMASI SONUÇLARI.....	41
5.2.5.1. Qubit Ölçümü Sonuçları .....	41
5.2.5.2. Bioanalyzer Sonuçları.....	43
5.2.6. YENİ NESİL DİZİLEME SONUÇLARI.....	44
5.2.7. TÜR DÜZEYİNDE TAKSONOMİK PROFİLLEME SONUÇLARI.....	48
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b>80</b>
<b>6.1. TARTIŞMA .....</b>	<b>80</b>
6.1.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI .....	80
6.1.1.1. Filum Düzeyinde Taksonomik Profil .....	80
6.1.1.2. Tür Düzeyinde Taksonomik Profil .....	84
6.1.1.2.1. Çalışma Başlangıcı (t0) ve Çalışma Sonu (t3) Baskın Türlerin Profili .....	95
6.1.1.2.2. Vibrio Cinslerinin Dağılımı .....	103
<b>6.2. SONUÇ.....</b>	<b>105</b>

**KAYNAKLAR..... 107**

**ÖZGEÇMİŞ.....HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**

**TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR..... 124**



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji laboratuvarı (Akçelik Lab).....	12
Şekil 4.2. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Yetiştiricilik Laboratuvarı .....	13
Şekil 4.3. Sterivex filtreleme aşaması .....	13
Şekil 4.4. Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi Genomik Servis Birimi.....	14
Şekil 4.5. <i>Bacillus cereus</i> ve <i>Bacillus Thurgiensis Israilensis</i> suşlarının inkübasyon sonrası katı agardaki görüntüsü .....	17
Şekil 4.6. <i>B.cereus</i> inkübasyon öncesi (A), <i>B. Thurgiensis Israilensis</i> inkübasyon öncesi (B), <i>B.cereus</i> inkübasyon sonrası (C), <i>B. Thurgiensis Israilensis</i> inkübasyon sonrası (D) sıvı besiyeri görüntüleri.....	18
Şekil 4.7. Biyoyumak deneme grupları kapalı biyoyumak sistemi, şekil üzerinde belirtilen kısaltmaların anlamları Çizelge 4.7.'de ifade edilmiştir.....	19
Şekil 4.8. Görsel materyal " Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System" protokol kitapçığından Türkçe'ye çevrilmiştir. ....	27
Şekil 4.9. Kütüphane pool aşaması formülasyonu .....	33
Şekil 4.10. SILVAngs amplicon veri girdi parametreleri .....	35
Şekil 5.1. 21. Günün sonunda biyoyumak örneklerinin imhoff hunisi ile yoğunluk ölçümü .....	36
Şekil 5.2. DNA izolatlarının %1'lik agaroz jel görüntüsü. KB: Kilo Baz, L:Ladder, N0,N1,N2 ve N3 4 zaman periyoduna ait arazi negatifleri .....	38
Şekil 5.3. 16sV3 primeri gradiyent PZR agaroz jel görüntüsü.....	39

Şekil 5.4. Örneklerin 16sV3 primeri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 5.5. Örneklerin indeksli 16sV3 primeri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü .....	41
Şekil 5.6. Amplikon kütüphanelerinin Bioanalyzer elektroforez görüntüleri .....	43
Şekil 5.7. Amplikon kütüphanelerinin Bioanalyzer FU çizelgeleri.....	44
Şekil 5.8 Amplikon Dizilerinin Dizi Sayısını İfade Eden FastQC Grafiği .....	46
Şekil 5.9 Amplikon Dizilerinin Okuma Başı Kalite Skorunun Ortalamasını İfade Eden FastQC Grafiği .....	47
Şekil 6.1. Probiyotik katkısı yapılmamış (K) biyoyumak zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi .....	80
Şekil 6.2. <i>Bacillus cereus</i> katkısı yapılmış (BC) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi.....	81
Şekil 6.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> katkısı yapılmış (BT) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi .....	82
Şekil 6.4. Probiomax katkısı yapılmış (P) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi.....	82
Şekil 6.5. OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi.....	83
Şekil 6.6. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t0) .....	85
Şekil 6.7. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t1) .....	85
Şekil 6.8. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t2) .....	86
Şekil 6.9. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t3) .....	86
Şekil 6.10. <i>Bacillus cereus</i> Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t0) .....	87

Şekil 6.11. <i>Bacillus cereus</i> Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t1) .....	87
Şekil 6.12. <i>Bacillus cereus</i> Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t2) .....	88
Şekil 6.13. <i>Bacillus cereus</i> Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t3) .....	88
Şekil 6.14. <i>Bacillus thuringiensis</i> Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t0) .....	89
Şekil 6.15. <i>Bacillus thuringiensis</i> Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t1) .....	89
Şekil 6.16. <i>Bacillus thuringiensis</i> Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t2) .....	90
Şekil 6.17. <i>Bacillus thuringiensis</i> Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t3) .....	90
Şekil 6.18. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t0).....	91
Şekil 6.19. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t1).....	91
Şekil 6.20. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t2).....	92
Şekil 6.21. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t3).....	92
Şekil 6.22. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t0) .....	93
Şekil 6.23. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t1) .....	94
Şekil 6.24. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t2) .....	94
Şekil 6.25. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t3) .....	95
Şekil 6.26. Biyoyumak deneme gruplarında t0 zamanında en çok temsil edilen üç tür.....	96
Şekil 6.27. Probiyotik katkısı yapılmayan kontrol (K) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür. ....	97
Şekil 6.28. <i>Bacillus cereus</i> katkısı yapılmış (BC) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür.....	98
Şekil 6.29. <i>Bacillus thuringiensis</i> katkısı yapılmış (BT) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür .....	99

Şekil 6.30. Probiomax katkısı yapılmış (P) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür .....	99
Şekil 6.31. OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür .....	100
Şekil 6.32. Vibrio türlerinin biyoyumak deneme gruplarında t0 ve t3 zamanlarındaki yüzdelik temsili .....	103
Şekil 6.33. <i>V. proteolyticus</i> (t0-P,t3-P) ve <i>V. alginolyticus</i> (t0-A,t3-A) türlerinin biyoyumak deneme gruplarında t0 ve t3 zamanlarındaki temsili.....	104



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Katı besiyeri içeriği .....	14
Çizelge 4.2. Sıvı besiyeri içeriği.....	15
Çizelge 4.3. Biyoyumağın sürdürülmesi için gerekli K/A ve 1 kg yem için gerçekleşecek karbon eklemesine ilişkin hesaplama .....	15
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan ticari probiyotikler ve mikroorganizma içerikleri .....	16
Çizelge 4.5. Çevresel DNA örnekleme aşamasında kullanılan materyaller.....	16
Çizelge 4.6. Biyoyumak deneme grupları kısaltmaları ve gerçekleştirilen denemeler .....	19
Çizelge 4.7. Biyoyumak deneme gruplarından alınan örneklerden miktarları ve örnekleme tarihleri .....	20
Çizelge 4.8. 16sV3 primer bilgisi.....	24
Çizelge 4.9. 5x Firepol Master Mix Reaktif protokolü .....	24
Çizelge 4.10. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü .....	25
Çizelge 4.11. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü .....	25
Çizelge 4.12. 16sV3 indeksli primer bilgisi .....	26
Çizelge 4.13. 5x Firepol Master Mix reaktif protokolü.....	26
Çizelge 4.14. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü.....	27
Çizelge 4.15. Nextera ikili XT indekslerinin örnekler ile eşleştirilmesi .....	29
Çizelge 4.16. Nextera ikili XT indeks PZR profili.....	29
Çizelge 4.17. Nextera ikili XT indeksleri PZR döngü profili .....	30
Çizelge 5.1. DNA izolatlarının nanospektrofotometre ölçüm sonuçları .....	37

Çizelge 5.2. Amplikon kütüphanelerinin Qubit ölçüm sonuçları .....	42
Çizelge 5.3. Dizilerin ham ve çeşitli filtreler sonrası okuma sayıları.....	45
Çizelge 5.4. K biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili .....	48
Çizelge 5.5. BC biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili.....	53
Çizelge 5.6. BT biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili.....	61
Çizelge 5.7. . P biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili.....	67
Çizelge 5.8. O biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili .....	73



## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
Bp	Baz çifti
dk	Dakika
dNTP	Dinükleotittrifosfat
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
UV	Ultraviyole
BFT	Biofloc Technology (Biyoyumak Teknolojisi)
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

## 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği Dünya’da büyüme hızı en yüksek olan gıda endüstrilerinden biri olmaktadır. Son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliği aktiviteleri üretimi arttırmak için kültür sırasında çeşitli katkı maddeleri ve destekleyicilerin kullanımı artmıştır. Hormonlar, vitaminler, antibiyotikler ve probiyotikler kullanımı artan bu maddeler arasında bulunmaktadır. Kolloid bir çözeltide çeşitli bakteri, mikroalg, mantar ve organik materyaller içeren topaklanmış parçacıkların formasyonu olarak ifade edilen biyoyumak teknolojisi su ürünleri yetiştiriciliğinde yetiştiriciliği yapılan canlının besin ihtiyaçlarını karşılama, patojenite etmenlerine karşı direncini artırma, canlının ekonomik değerini (boy, ağırlık vb.) artırma ve atık suların geri kazanılması gibi değerli katkıları ile son yıllarda kullanımı giderek artan bir teknoloji olarak yetiştiricilikte yerini almaktadır.

Belirli bir çevrede toplanan mikroorganizma (bakteri, arke, virüs ve mantar) topluluğunun sahip olduğu genetik materyal olarak tanımlanan mikrobiyom terimi (1) biyoyumak teknolojilerinin temelini oluşturmaktadır. Bir biyoyumak sisteminin içerdiği mikrobiyom profili uzun yollar boyunca bakteriyel çeşitlilik çalışmaları bakteri çeşitliliğinin yalnızca %1 – 15’ini tespit edebilen kültüre bağımlı çalışmalar ile sınırlandırılmıştır. Yüksek verimli dizileme tekniklerini içeren çevresel DNA metabarkodlama gibi modern moleküler teknikler kültüre edilemeyen türlerin de dahil edildiği, mikrobiyal çeşitliliğe daha kapsamlı bir bakış açısı fırsatı sağlayarak biyoyumak sistemlerine farklı (karbon ve azot kaynaklarının kullanımı, karbon:azot oranını, sıcaklık ve hava alımı parametrelerinin değişimi, probiyotik ve prebiyotik katkısı vb.) faktörlerin eklenmesi veya değiştirilmesi sonucu elde edilecek mikrobiyal taksonomik profillerin incelenmesini olanaklı kılmaktadır.

Bir mikrobiyomu oluşturan canlılar arasında bakteriler için 16S rRNA (2), mantarlar için ribozomun dahili transkribe edilen boşluk (ITS) bölgesi (3) ve ökaryotlar için 18 rRNA (4), bölgesi evrensel barkod bölgesi elde edilen total DNA’da polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef alınarak çoğaltılır ve çoğaltılan bu bölge yeni nesil dizileme platformları kullanılarak yüksek verimde dizilenir. Yeni nesil dizileme platformundan çıktı olarak alınan dizi bilgileri biyoinformatik iş akışları ve içerdikleri filtreler ile işlenerek incelenen sistemde (biyoyumak teknolojisi) bulunan mikroorganizmaların taksonomik profilini çıkarır.

Konaktan bağımsız bir biyoyumak sisteminde farklı probiyotik katkıları ve farklı zamanlarda belirtilen iş akışı ile çıkarılacak mikrobiyom profilinin sisteme yapılan müdahaleler sonucu ve zamanın farklı periyotlarındaki görüntüsünün olası biyoyumak formülasyonlarına yön vereceği ön görülmektedir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. BİYOYUMAK TEKNOLOJİSİ

Gün geçtikçe artan insan nüfusunun gereksinimlerini karşılamak üzere besin üretimi için gerekli olan su ve karada bulunan doğal kaynakların kıtlığı ve tahribi gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmaktadır. 2030 ve 2050 FAO ve Dünya Bankası projeksiyonlarına göre 2050 sonrası dünya nüfusu tatlı su kaynakları bakımından taşıma kapasitesine ulaşacağından karada tarım yapmanın güçleşeceği ifade edilmektedir (FAO 2020). Su kaynaklarını korumak ve en az düzeyde kirletmek önümüzdeki yıllarda temel hedef olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda su ürünleri yetiştiriciliği birçok ülkede ideal besin üretim seçeneği olarak kabul görmektedir. Kara ve su kaynaklarının giderek azalması nedeniyle su ürünlerini yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliği üretim çevrelerinin geliştirilmesi, üretimin artması ve su ürünleri teknolojilerinin geliştirilmesine bağlıdır. Biyoyumak teknolojisi son yıllarda sürdürülebilir bir su ürünleri yetiştiriciliği sistemi olarak öne çıkmaktadır. Biyoyumak teknolojisi konsepti 1970'lerde tanımlanmasına rağmen bu alanda detaylı araştırma ve gelişimler ancak 1990'ların başında olumlu sonuçların elde edilmeye başlaması ile kabul görmeye de başlamıştır (5) (6).

Uluslararası tarım sözlüğüne göre biyoyumak teknolojisi (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı, North Bend, ABD) "Bakteri, alg veya protozoaların partikül haldeki organik maddeler ile bir matriks halinde kümelenmesi ve bu yapının su ürünlerinde su kalitesini geliştirmekte, atık yönetiminde ve hastalık önlemede kullanılması" olarak tanımlanmaktadır. Biyoyumak teknolojisi azot bakımından zengin atıkların çeşitli mikroorganizmalar (heterotrofik bakteriler) kullanılarak hem sistemdeki atık suyun geri kazandırılması hem de üretilen mikroorganizmaların su ürünlerinde yem olarak kullanılmasını hedeflemektedir (7).

Karides yetiştiriciliğinin küresel su ürünleri yetiştiriciliğine olan katkısı son on yılda kayda değer biçimde artmıştır. Yetiştiriciliği yapılan karidesler 2018 yılında %76,6 artarken sucul bitkiler dahil küresel anlamda su ürünlerinin %7,3'ünü oluşturmaktadırlar (FAO 2020). Bu artışta su kalitesini ve besin alımını iyileştiren biyoyumak teknolojilerinin katkısı olduğu düşünülmektedir. Yetiştiricilik tipine göre (iç veya dış) farklı biyoyumak sistemleri

geliştirilmiştir. Askıda geliştirme sistemleri, bağlı geliştirme sistemleri ve hareketli biyofilm reaktörü farklı biyoyumak teknolojisi tiplerine örnek olarak verilebilir.

Biyoyumak teknolojisi ile yapılan su ürünleri yetiştiriciliğinde verimi etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerden en önemlisi heterotrofik bakterilere besin kaynağı görevini üstelenen karbon kaynakları ve karbon/azot oranıdır. Klasik bir biyoyumak sistemi mikrobiyal üretimin sağlanmasında uygun karbon/azot dengesini sağlamak için dış bir karbon kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Biyoyumak sistemindeki heterotrofik bakteriler karbonu enerji kaynağı, azotu ise hücresel protein sentezi için kullanmaktadırlar. Amonyakın immobilizasyonu bakteriler tarafından alınan karbon miktarına ve bu karbonun hücresel kullanım verimine bağlıdır. Aşırı organik karbon takviyesi yüksek karbon/azot oranına yol açacağından çökelti katılarına, askıda katı madde ve su bulanıklığında artışa sebep olacaktır (8). Ayrıca yüksek karbon/azot oranı bir biyoyumak sistemindeki ototrofik mikrobiyal topluluğunun heterotrofik mikrobiyal biyokütle kaymasına ve su kalitesi ile biyoyumak içeriğinin değişmesine yol açabilmektedir (9).

Birçok çalışma biyoyumak temelli karides yetiştiriciliğinde farklı karbon kaynaklarının kullanımının performans, sağlık durumu ve su kalitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Biyoyumak teknolojilerinde kullanılan karbonhidrat kaynaklarındaki etki temel olarak karbon içeriğini ve degradasyon hızına bağlı olmaktadır. Genel itibarı ile basit şekerler (melas ve dekstroz) kompleks şekerlerden daha hızlı parçalanmaktadır böylece daha düşük azot konsantrasyonuna sebep olup büyüme oranında ve su kalitesinde artış sağlamaktadır (10). Önceki çalışmalarda azot konsantrasyonunu azaltıp su kalitesini ve mikrobiyal üretimini arttıran birçok karbon kaynağı test edilmiştir. Test edilen karbon kaynaklarının farklı etkileri de araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Örneğin Panigrahi et al. (2018) çalışmalarında; darı, melas ve un kullanımının buğday, pirinç ve mısır unu kullanımına kıyasla yetiştiriciliği yapılan türde daha iyi büyüme, hayatta kalma ve hastalık direnci oranlarına ulaştıklarını ifade etmişlerdir (11).

Biyoyumak sistemlerinde maksimum azot alımı, atık ayrıştırması ve biyoyumak oluşumu uygun karbon/azot oranında gerçekleşmektedir. Sudaki inorganik toksik azotun kontrolü ve mikrobiyal yumakların oluşumu için karbon/azot oranı biyoyumağa verilen yemler ile ayarlanabilmektedir (8). Bu noktada Xu ve Pan (2013), biyoyumak sistemlerinde en iyi

sonucu verecek karbon/azot oranına dair tartışmalı sonuçlar bulunsa da genel itibari ile yetiştiriciliği yapılan türdeki en iyi büyüme, hayatta kalma ve vibriosis patojenlerine karşı direncin 15/1 ve 20/1 karbon/azot oranlarında elde edildiği kaydetmişlerdir (12).

## 2.2. DNA BARKODLAMA

Hızlı ve kesin tür tanımlaması için standardize edilmiş DNA bölgelerinin bir etiket (barkod) olarak kullanılmasına DNA barkodlama ismi verilmektedir (13). Son 20 yılda kullanımı artmasına rağmen DNA barkodlama yeni bir uygulama yöntemi olarak değerlendirilmemektedir. Çünkü "DNA barkodları" terimi ilk defa 1993 yılında Arnot ve arkadaşları tarafından circumporozite geni ile *Plasmodium falciparum* izolatlarının ayırımı için açıklanan bir çalışmada kullanılmıştır (14). DNA barkodlamanın günümüzdeki kullanımını karşılayan asıl anlamı ve tanınırlığı ise 2003 yılında Consortium for the Barcode of Life (CBOL, Canlılığı Barkodlama Topluluğu) ile başlatılmıştır (13). Evrensel standartların oluşmasını teşvik etme ve DNA barkodlama çalışmalarını koordine etme amacı ile kurulan CBOL uluslararası bir girişim olarak tanınmaktadır. Geleneksel uygulamalarda taksonomik tanımlamanın morfolojik karakteristik özellikler üzerinden ilerlediği bilinmektedir. DNA barkodlama ise türlerin ayırımı için moleküler bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. DNA barkodlamanın temelini oluşturan mantık tek bir DNA segmentinin yaşayan taksonlardaki ayırımına dayanmaktadır. Örneklerin barkodlar aracılığı ile tanımlanması hedef türlerin morfolojik benzerlikler olmasına rağmen tür ayırımına izin verecek genetik farklılıklar içermesine dayanmaktadır.

DNA barkodları için beklenen özellikler Pecnikar (2013) tarafından aşağıda sunulduğu şekilde tanımlanmıştır.

- DNA fragmanı aynı türün farklı bireyleri arasında neredeyse aynı dizi özelliklerine sahip olmalı ama farklı türler arasındaki farklılıkları da içermelidir.
- Hedef bölge standart olmalı, aynı bölge farklı taksonomik gruplarda kullanılabilir.
- Hedef bölge korunmuş olmalı, bölge için standardize edilmiş primerler ile çoğaltılıp dizilenebilir.

Hayvanlarda en yaygın kullanılan DNA barkodu hayvan türleri arasında %98'den fazla ayrımı yapabilen bir mitokondriyal gen olan sitokrom oksidaz I (COI) iken (15) (16) bitkilerde RuBisCo büyük alt birim (rbcL) ve maturaz K (matK) olmak üzere iki farklı kloroplast genini içermektedir. Mantarlarda nükleer ribozomal RNA genleri olan ITS (internal transcribed spacer) bölgesi kullanılmaktadır (17). Bakterilerde ise yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki 16S rRNA gen bölgesi kullanımı tercih edilmektedir (18). DNA barkodlama yönteminden en çok faydalanan alan taksonomi olsa da yeni, hızlı ve daha basit moleküler genetik metotların DNA dizilemeyi daha ulaşılabilir kılması ile birlikte yöntemin biyoloji ve diğer çevre bilimlerinin çeşitli dallarındaki kullanımı her geçen gün artış göstermektedir. Halk sağlığı açısından tehlike arz eden patojenlerin tespiti ve tanımlanması (19), biyoçeşitliliğin tespiti ve korunması (20), tarım zararlılarının tanımlanması (21), nesli tehlikede türlerin tespiti ve korunması (22), su kalitesinin canlı temelli analizi (23) ve tıbbi kullanım açısından önemli bitkilerin tespiti (24) DNA barkodlama yönteminin kullanıldığı farklı dallardan bir kısmını oluşturmaktadır. DNA barkodlamanın son yıllarda yaygınlaşmasının temelinde, dizileme giderlerinin azalması ve DNA bazlı tür tanımlamanın daha geniş kitlelerce kullanılabilir olması yatmaktadır. Bu yöntem bilimsel, sosyal, ekonomik ve politik çevrelerde farklı alanlara entegre edilebilme yeteneği ile kabul görmektedir.

### **2.3. ÇEVRESEL DNA (EDNA)**

Çevresel DNA (eDNA) toprak, su, hava, sediment, dışkı gibi çevresel örneklerden izole edilen DNA'yı temsil etmektedir. Bu yöntem ile canlı bir organizmaya ihtiyaç olmadan o canlının çevrede bıraktığı kalıntılardan (mukus, tüy, kürk, dışkı, salya, kan, deri vb.) canlıya veya popülasyonlara ait DNA'lar elde edilebilmektedir. Çevresel bir örnekten genetik materyalin analizi ilk defa (çevresel DNA terminin de ilk ortaya çıkışı) mikrobiyoloji alanında gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar içerdiği mikrobiyal komüniteleri karakterize etmek amacı ile doğrudan deniz sedimentinden DNA izole ettiklerini bildirmişlerdir (25). Çevresel DNA ilk ortaya çıkışından günümüze dek giderek artan popüleritesi ile birçok farklı alanda kullanışlı bir yöntem olduğunu ispatlamıştır. Günümüzde eDNA adli tıp (26), çevresel kirlenme takibi, paleogenetik, (27) çevresel biyogüvenlik (28) gibi biyoloji ve çevre alanlarında kullanımı giderek artmaktadır.

Çevresel DNA çalışmalarında kullanılan moleküler iş akışları; genel hatlarıyla ilk önce DNA'yı çevresel bir örnekten elde etmeyi ve devamında bu eDNA'nın ekstraksiyonunu ve saflaştırılmasını kapsamaktadır. Bu iş akışında saflaştırılan eDNA'nın daha sonra hedefe özgün gen bölgeleri çoğaltılarak (barkodlama) o çevredeki biyoçeşitlilik ortaya çıkartılabilir. Genetik materyalin elde edilmesi çevresel örneğin tipine göre değişiklik gösterebilmektedir. Sucul sistemlerde serbest halde dolaşan DNA'yı elde etmek için çöktürme (29), santrifüjleme (30) ve filtrasyon (31) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde ağırlıklı olarak, sucul sistemlerde DNA eldesinde, filtrasyon yöntemi tercih edilmektedir. Filtrasyon yönteminin kullanıldığı çalışmalarda birçok filtre tipi ve çeşitli por boyutu (göz açıklığı) uygulanmaktadır. Küçük por çapına sahip filtreler daha fazla miktarda eDNA yakalarken (32) büyük por çapına sahip filtreler biyokütle miktarının belirlenmesinde (kantifikasyonunda) daha kesin sonuçlar verdiği ileri sürülmektedir (33). Çevresel DNA'nın filtrasyon ile elde edilmesinde selüloz nitrat, polietilen sülfon, cam mikrofiber, poliviniliden florür ve polikarbonat temelli filtreler kullanılmaktadır. Selüloz nitrat ve cam mikrofiber filtrelerin diğer filtre çeşitlerine kıyasla daha yüksek DNA verimi eldesi sağladığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (34) (35) (36). Filtrelerin içerdiği membran tipi dışında filtrelerin fiziksel yapıları da DNA yakalama verimliliğini etkilediği ileri sürülmektedir. Steril ve kapalı sistemli filtre sistemlerinden biri olan Steriveks-GP (Millipore, Almanya) kapsül filtrelerin diğer filtre yapılarından çok daha verimli DNA elde etme oranına sahip oldukları bilinmektedir (37). Steriveks filtreler kapalı sistemler olması sebebiyle çevresel örneklerde kontaminasyonu minimum seviyeye indirmekte ve ayrıca filtrasyon sonrası steriveks filtresi içerisine enjekte edilecek DNA koruyucu etanol veya longmire tamponu (2M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0, 5 M NaCl, %20'lik SDS) ile yakalanan DNA'nın daha uzun süre degrade (bozulma) olmadan saklanabileceği gösterilmiştir (37). eDNA eldesi iş akışında DNA filtrasyon ile elde edildikten sonra DNA koruyucu solüsyon içerisinde muhafaza edilerek sonraki izolasyon aşamalarına (DNA barkodlama ve metabarkodlama) geçmek için hazır hale getirilebilir.

#### **2.4. ÇEVRESEL DNA (EDNA) METABARKODLAMA**

DNA metabarkodlama bir ihtiyacın yeni bilimsel bir teknoloji tarafından karşılanması sonucu ortaya çıkmıştır. Geleneksel DNA barkodlama yöntemi ekolojistin tüm ihtiyaç ve beklentilerini karşılayamamaktaydı bir başka ifade ile DNA izolasyonu için uygun örneğin

varlığı her zaman söz konusu olamadığından ve bazı taksonomik gruplar için uygulama zaman alıcı, zor ve hatta imkansız olarak tanımlanmaktaydı. Ayrıca geleneksel DNA barkodlama belirli sürede ve belirli sayıdaki örneğin analizine izin vermektedir. Yukarıda açıklanan sebeplerden dolayı geleneksel DNA barkodlama için yüksek verimli dizileme temelli tür tanımlaması ideal ve etkili bir yöntem olarak kullanım alanı bulamamıştır (38). Ancak çevresel DNA metabarkodlama yöntemi bahsedilen sorunları gidermede etkin bir analiz haline gelmiştir. Çünkü eDNA metabarkodlama farklı türleri hedefleyerek, daha çeşitli örnekleme olanakları sağlar ve taksonomik tanımlamaların çözünürlüğünü artırması yönünden geleneksel metotları tamamlamakta ve belli başlı sınırlamaları aşabilmektedir. Bu yöntem çevresel bir örnekten (toprak, su, dışkı vb.) izole edilecek ve genellikle degrades (bozulmuş) olan DNA'nın yüksek verimli dizileme yöntemleri ile tanımlanmasını olanaklı kılmaktadır.

eDNA metabarkodlamanın taksonomik tür tanımlamada daha iyi bir çözünürlük ve daha yüksek çeşitlilik sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Sucul sistemlerde gerçekleştirilen bir çalışmada (39) farklı ortamlardan eDNA metabarkodlama ile tespit edilen amfibi türlerinin sayısının standart yöntemler ile elde edilen tür sayısına eşit veya daha fazla olduğu görülmüştür. Bitkilerde ise hava örnekleme yolu ile elde edilen polenlerin eDNA metabarkodlama yöntemi ile analizi sonucu standart görsel metotlara kıyasla daha yüksek taksonomik çeşitliliğin gözlemlendiği rapor edilmiştir (40).

## **2.5. MİKROBİYOM**

Belirli bir çevrede toplanan mikroorganizma (bakteri, arke, virüs ve mantar) topluluğu mikrobiyota, bu topluluğun sahip olduğu genetik materyal ise mikrobiyom olarak tanımlanmaktadır (1). Mikrobiyom çalışmaları, yeni nesil DNA dizileme teknolojilerinin tek seferde trilyonlarca DNA bazının elde edilmesine ve okunmasına olanak sağlaması sebebiyle son yıllarda giderek önem kazanmıştır. Bu sayede yüksek verimli dizileme teknolojilerinin kullanımı ile farklı kaynaklardan elde edilen mikrobiyal toplulukların dizi ve fonksiyon profilleri çıkarılabilmektedir.

Mikrobiyom topluluğunun çeşitliliğinin ve profilinin metabarkodlama yöntemi ile analiz edilmesinde mikroorganizmalara özgü korunmuş evrensel barkod bölgelerinin hedeflendiği bilinmektedir. Genel olarak kullanılan barkod bölgelere bakıldığında bakteriler için 16S

rRNA (2), mantarlar için ribozomun dahili transkribe edilen boşluk (ITS) bölgesi (3) ve ökaryotlar için 18 rRNA (4) bölgesi evrensel barkod bölgesi olarak kullanıldığı görülmektedir. Bu barkod bölgelerinin en önemli avantajı; popülasyonlardaki geniş dağılımı ve korunmuş bölgelerinde çok değişimli kısımlara sahip olmaları olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikleri barkod bölgeleri çoğaltmada evrensel primerlerin tasarlanabilmesine olanak sağlamaktadır. Genomun ayrı ayrı küçük DNA parçaları halinde dizilenip daha sonra oluşan bu dizileri (kontig) biyoinformatik analizler ile birleştirerek tüm genomun dizilenmesini olanaklı kılan shotgun dizilemeye düşük maliyetli bir alternatif yaklaşımdır.

Örneğin mikrobiyal topluluklar; sucul sistemlerde sistem verimi, besin döngüsü, su kalitesi ve hayvan sağlığı gibi önemli rollerde görev almaktadır (41) (42) (43). Sucul sistemlerde yapılan bu ve benzeri mikrobiyom çalışmalarında bakteri ve Arke (Arkeobakter) türlerinin taksonomik profilini çıkarmak amacıyla 16S rRNA dizileme analizleri gerçekleştirilmektedir. 16S rRNA bakteri ve arkelerin 70S ribozomunun küçük 30S alt ünitesinde kodlanmaktadır. Bu gen yaklaşık 1600 baz çifti olup oldukça korunmuş primer bağlanma bölgelerine sahip olup dokuz adet değişken bölge (V1-V9) içermektedir (44). Birçok çalışma mikrobiyom profillemesinde V3-V4, V5-V6, veya V4 çok değişkenli bölgeleri kullanmıştır (45). Greengenes (46), RDP (47), ve SILVA (48) gibi geniş kapsamlı rRNA veri bankalarına ulaşım ile türlerin yüksek çözünürlüklü tanımlanması kolaylaşmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde bu araçlar vasıtasıyla mikrobiyom profilleri incelenip kontrol grupları ile karşılaştırılarak antropojenik etki, stres, hastalık veya beslenme faktörlerinin mikrobiyal çeşitliliğe etkisi çalışılmaktadır (49) (50) (51) (52). Elde edilen veriler doğrultusunda su ürünleri yetiştiriciliğinde daha fonksiyonel verimli yemlerin formülasyonu ya da probiyotik ve prebiyotik uygulamaların geliştirilmesi mümkün olmaktadır.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Su ürünleri yetiştiriciliği Dünya’da büyüme hızı en yüksek olan gıda endüstrilerinden biri olmaktadır. Son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliği aktiviteleri üretimi arttırmak için kültür sırasında çeşitli katkı maddeleri ve destekleyicilerin kullanımı artmıştır. Hormonlar, vitaminler, antibiyotikler ve probiyotikler kullanımı artan bu maddeler arasında bulunmaktadır. Özellikle karideslerde hastalıkları azaltmak amacıyla çeşitli karides türlerinin kültürü biyoyumak teknolojisi sistemlerinde (BFT) yapılmaktadır. Biyoyumak terimi, kolloid bir çözeltideki topaklanmış parçacıkların formasyonu olarak ifade edilmektedir. Bu topaklanmış parçacıklar çeşitli bakteri, mikroalg, mantar ve organik materyaller içermektedir (53). Biyoyumak teknolojisi azot bakımından zengin atıkların çeşitli mikroorganizmalar (biyoyumak) kullanılarak hem sistemdeki atık suyun geri kazandırılması hem de üretilen mikroorganizmaların su ürünlerinde yem olarak kullanılmasını hedeflemektedir (54). Sistem içerisindeki heterotrofik bakteriler amonyağı azot kaynağı olarak almakta ve biyokütlelerine katmaktadır. Böylece elde edilen suda yetiştiricilik yapmak için amonyak seviyesi bakımından toksik seviyenin altına düşmektedir. Bu işlem heterotrofik bakteriler ile ototrofik nitrifikasyon bakterilerinin yaptığından daha hızlı gerçekleşmektedir.

Probiyotikler ‘belirli dozda verildiğinde konağın sağlığında olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalar’ olarak tanımlanmaktadır (FAO, 2001). Karides kültürünün yapıldığı sistemlere ticari probiyotiklerin eklenmesi (55) ve antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaya başlaması günümüzde yaygınlaşmıştır. Çeşitli çalışmalar karides ve balık yetiştiriciliğinde probiyotik kullanımının büyüme ve hayatta kalmayı arttırdığını, sindirim ve immün sistemi geliştirdiğini rapor etmiştir (56) (57) (58).

Uzun yıllar boyunca bakteriyel çeşitlilik çalışmaları bakteri çeşitliliğinin yalnızca %1 – 15’ini tespit edebilen kültüre bağımlı çalışmalar ile sınırlandırılmıştır (59). Yüksek verimli dizileme tekniklerini içeren çevresel DNA metabarkodlama gibi modern moleküler teknikler kültüre edilemeyen türlerin de dahil edildiği, mikrobiyal çeşitliliğe daha kapsamlı bir bakış açısı fırsatı sağlamıştır (60).

Bu çalışmanın amacı canlıdan bağımsız bir biyoyumak sistemine farklı ticari probiyotik ve probiyotik etki gösterdiği bilinen *Bacillus* türlerinin eklenmesi sonucu biyoyumak içerisindeki bakteri çeşitliliğinin zamana bağlı olarak nasıl değiştiğini eDNA metabarkodlama yöntemi ile tespit etmektir. Deney tasarımı üç tekrarlı 5 muameleden (iki adet ticari probiyotik: P ve O, iki adet *Bacillus* suşu: BC ve BT, ve kontrol: K) oluşmaktadır. K ile kodlanan kontrol sisteminde probiyotik içermeyen standart biyoyumak heterotrofik bakteriler bulunmaktadır. Biyoyumak sistemlerinin bakteri çeşitliliği başlangıçtan (t0) itibaren 21. güne (t3) dek birer haftalık periyotlar ile örnek alımı gerçekleştirilerek toplam 4 farklı zaman aralığındaki (t0, t1, t2 ve t3) değişim gözlemlenmiştir.

Biyoyumak sistemlerinde bakteriyel çeşitliliğin probiyotik katkısı dahilinde zamana bağlı değişimini takip etmek doğal yetiştiricilik çiftliklerinde ve biyoyumak sistemlerinde yetiştiricilik kapsamında farklı uygulamaların farklı zamanlardaki olası fonksiyonel kullanım alanlarını tahmin etmede ve bu sistemleri geliştirmede fayda sağlayacağı öne sürülmektedir.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. ARAŞTIRMA YERİ

Çalışmada kullanılan probiyotik bakteri suşlarının sağlanması, kültüre edilmesi ve inkübasyonu Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji laboratuvarında (Akçelik Lab) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji laboratuvarı (Akçelik Lab)

Biyoyumak sistemlerinin kurulumu, oluşturulması, zamana bağlı değişiminin gözlemlenmesi, örnekleme yapılması ve filtrasyonu Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Yetiştiricilik Laboratuvarı



Şekil 4.3. Steriveks filtreleme aşaması

Elde edilen örneklerin DNA izolasyonu, PZR aşamaları, yeni nesil kütüphane hazırlığı, yeni nesil dizilemesi ve biyoinformatik analizleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Evrimsel Genetik Laboratuvarı (eGL) ve Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. Agrigenomics Hub (AgriGx) Hayvan ve Bitki Genomik Araştırmaları İnovasyon Merkezi Genomik Servis Birimi

## 4.1.2. BAKTERİ KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

### 4.1.2.1. Katı Besiyeri

Bakterilere ait stokların aktivasyonunda Nutrient Agar (NA) besiyeri kullanılmış olup, stok kültürler NA'a yayma yöntemi ile ekilerek 32 santigrat derece sıcaklıkta 16 saat süresince inkübe edilerek aktive edilmişlerdir. Steril besiyeri içeriği Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Katı besiyeri içeriği

Kimyasal Adı	Miktar
Nutrient Agar (Merck)	5 g
Distile Su	100 ml

### 4.1.2.2. Sıvı Besiyeri

Nutrient Agar kullanılarak aktive edilen bakteri kültürleri inkübasyonu takiben Nutrient Broth'a aktarılmıştır. Sıvı besiyeri içeriği Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sıvı besiyeri içeriği

Kimyasal Adı	Miktar
Nutrient Broth (Merck)	3 g
Distile Su	100 ml

#### 4.1.3. BİYUYUMAK OLUŞUMUNDA KULLANILAN KARBON VE AZOT KAYNAKLARI

Çalışmada kullanılacak biyoyumak sistemleri daha önce Türkiye deniz sularında 15:1 karbon:azot oranına sahip stok biyoyumak sisteminden aşılansarak oluşturulmuştur. Denemelerin gerçekleştirileceği biyoyumak sistemlerindeki heterotrof bakterilerin gelişimini desteklemek amacı ile şeker pancarı melası (Beta vulgaris) eklemesi yapılmıştır. Eklenen yemin karbon:azot oranı Çizelge 4.3.'te belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Biyoyumağın sürdürülmesi için gerekli K/A ve 1 kg yem için gerçekleştirilecek karbon eklemesine ilişkin hesaplama

KARBON (K)	AZOT (A)
$K = 1 \text{ kg yem} \times 0,905 \text{ (yemdeki kuru madde)} \times 0,8 \text{ (karides tarafından emilim \%20, atılan \%80)} / 2 \text{ (yemdeki karbon \%50 oranındadır)} = 0,362 \text{ kg} = 362 \text{ g}$	$A = 1 \text{ kg yem} \times 0,905 \text{ (yemdeki kuru madde)} \times 0,8 \text{ (karides tarafından emilim \%20, atılan \%80)} \times 0,3814 \text{ (ham protein oranı \%38,14)} / 6,25 \text{ (yemdeki azot yaklaşık \%16 oranındadır)} = 0,04418 \text{ kg} = 44,18 \text{ g}$
<b>YEM İÇERİSİNDEKİ KARBON/AZOT (K/A) ORANI</b>	
$K/A \text{ (1 kg yem için)} = 362/44,18 = 8,19$	
Biyoyumak oluşumunu temin etmek ve sürdürmek için <b>K/A oranı 15</b> olarak ayarlanmıştır.	
1kg yem için gerekli karbon miktarı ( <b>GKM</b> ): $GKM = Azot \times 15 = 44,18 \times 15 = 662,7 \text{ g}$	
1 kg yem için gerçekleştirilecek karbon eklemesi miktarı ( <b>GKEM</b> ) ise: $GKEM = GKM - Karbon = 662,7 - 362 = 300,7 \text{ g}$	
Karbon kaynağı olarak kullanılan melasın karbon içeriği yaklaşık %50 olduğu için GKEM ile elde edilen değer 2 ile çarpılmıştır.	
$GKEM \times 2 = 300,7 \times 2 = 601,4 \text{ g}$	
<b>SONUÇ:</b> 1 kg yem için <b>601,4 g Melas</b> (Karbon kaynağı) ilavesi yapılmıştır.	

Sonuç itibari ile biyoyumağın sürdürülebilmesi için gerekli karbon:azot oranının karşılayacak 1 kg yeme 601,4 gram melas eklemesi gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.4. BİYOYUMAK OLUŞUMUNDA KULLANILAN PROBİYOTİKLER

Biyoyumak oluşumunda Probiomax ve OLVIT Probiotics marka ticari probiyotikler kullanılmıştır. Probiyotiklerin içerikleri Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan ticari probiyotikler ve mikroorganizma içerikleri

Probiyotik	İçerik
Probiomax ( $1 \times 10^8$ CFU/ml)	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
OLVIT Probiotics ( $1 \times 10^8$ CFU/ml)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>

#### 4.1.5. ÇEVRESEL DNA ÖRNEKLEMESİNDE KULLANILAN MATERYALLER

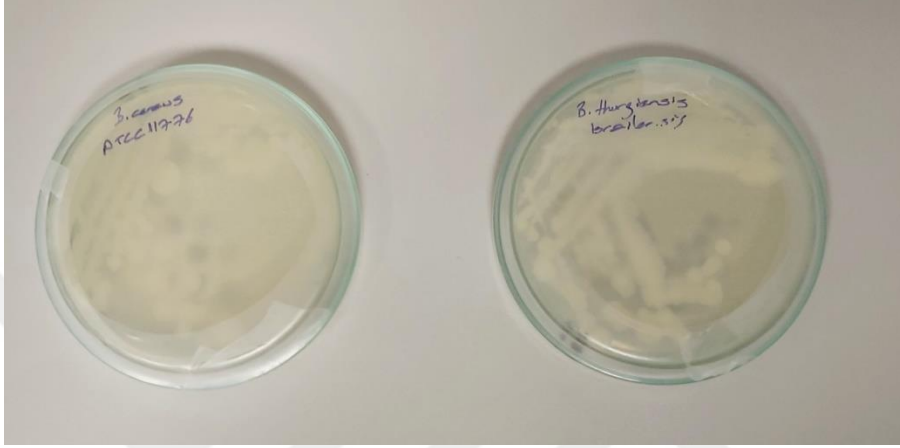
Çizelge 4.5. Çevresel DNA örnekleme aşamasında kullanılan materyaller

Materyal		
Sterivex filtre (0.22 $\mu$ m por çaplı)	Luer lock şırınga (60 ml)	Kilitli Poşet
Sterivex giriş-çıkış kapakları	Beher	Strafor kutu
Pipet kontrolörü	%70 Etanol	Serolojik pipet
Distile Su	Asetat Kalem	Alüminyum folyo
Parafilm	Nitril Eldiven	Kuru buz

## 4.2. YÖNTEM

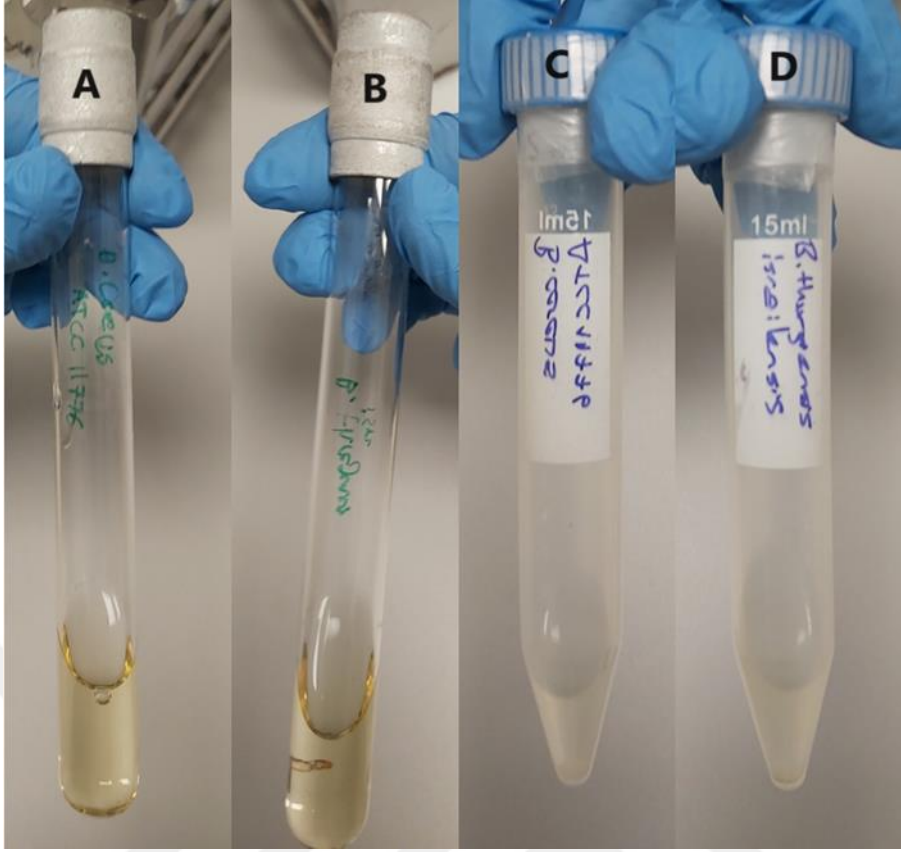
### 4.2.1. BAKTERİ SUŞLARININ KÜLTÜRÜ

*Bacillus cereus* ve *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* suşları Akçelik Lab'ın (-80)°C stok kültüründen %5'lik nutrient agar (NA) besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Katı agara ekimi yapılan suşlar 30°C'de 16 saat inkübe edilerek büyümeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.5. *Bacillus cereus* ve *Bacillus Thurgiensis Israilensis* suşlarının inkübasyon sonrası katı agardaki görüntüsü

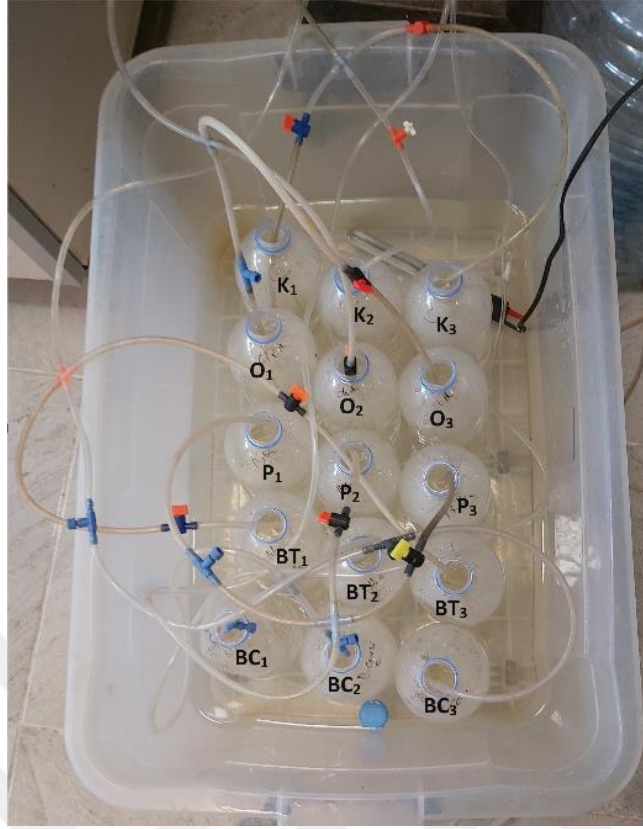
Katı besiyerinde kültüre edilen suşlar biyoyumak sistemlerine eklenebilmesi için katı besiyerinden nutrient broth (NB) aktarılmıştır. Bakterilerin sıvı besiyerindeki gelişimi için 30 °C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. *B.cereus* inkübasyon öncesi (A), *B. Thurgiensis Israilensis* inkübasyon öncesi (B), *B.cereus* inkübasyon sonrası (C), *B. Thurgiensis Israilensis* inkübasyon sonrası (D) sıvı besiyeri görüntüleri

#### 4.2.2. BİYOYUMAK OLUŞUMU VE SÜRDÜRÜLMESİ

4 farklı grup ve 1 kontrol grubundan oluşan 3 tekerrürlü deneme düzeneğinde; toplam 15 adet reaktör (1,5 litre) kapalı devre biyoyumak sistemindeki (karides yetiştiriciliği ortamında) üretilmiş biyoyumaktan %10 oranında aşlanarak (900 ml yapay deniz suyu + 100 ml stok biyoyumak) yapay steril deniz suyu kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 4.7. Biyoyumak deneme grupları kapalı biyoyumak sistemi, şekil üzerinde belirtilen kısaltmaların anlamları Çizelge 4.7.'de ifade edilmiştir

Oluşturulan biyoyumak sistemlerinden BC ve BT isimli gruplara sıvı kültürde kültüre edilen bakteri suşlarından ve P ve O isimli gruplara ticari probiyotiklerden  $1 \times 10^8$  CFU/ml konsantrasyonda ekleme yapılmıştır. Kontrol seti olan K isimli biyoyumak grubuna ise herhangi bir bakteri veya probiyotik eklemesi yapılmamıştır.

Çizelge 4.6. Biyoyumak deneme grupları kısaltmaları ve gerçekleştirilen denemeler

Deneme Grupları	Mikroorganizma İçeriği
BC	<i>B.cereus</i>
BT	<i>B. Thurgiensis Israilensis</i>
P	Probiomax
O	OLVİT Probiotics
K	Biyoyumak Kontrol

Kapalı devre biyoyumak sistemlerindeki çözünmüş oksijen değerini yükseltmek için hava motoru (Resun marka LP-60 model) ile havalandırma gerçekleştirilmiştir.

Bakteri ve ticari probiyotik eklenmesinden yaklaşık 1 saat sonra ilk örnekleme olan t0 örnekleme gerçekleştirilmiştir. Her grubun 3 tekrüründen 30 ml sıvı Eppendorf Easypet cihazı ve 10ml'lik serolojik pipet kullanılarak örnek alınmıştır. Bu örnekler steril bir beherde 90 ml olacak şekilde homojenize halde karıştırılmıştır. Örnekler 0.22 µm por çaplı Steriveks filtrelerden luer lock şırınga vasıtasıyla geçirilmiştir. Steriveks filtrelerin giriş ve çıkışları kapakla kapatılıp parafilm ile sarılmıştır ve kuru buz içerisinde aynı gün içerisinde (-20) °C 'ye kaldırılmıştır.

Yedi gün ara ile t0 (0.gün), t1 (7.gün) ve t2 (14.gün) örnekleme aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. 21. gün örnekleme olan t3'te biyoyumak oluşumu tamamlandığı ve katı partikül formunda artış olması sebebiyle Steriveks filtreden geçirilememiş ve steril kaplarda katı örnek olarak örnekleme yapılmıştır.

Biyoyumak sistemi örnekleme Çizelge 4.7.'de belirtilen tarihlerde ve miktarlarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.7. Biyoyumak deneme gruplarından alınan örneklerden miktarları ve örnekleme tarihleri

Zaman	Gruplar	Filtre Hacim	Edilen	Örnek Kodu	Örnekleme Tarihi
-	Stok Biyoyumak	90 ml	0		12.10.2022
t0	BC <sub>1</sub> - BC <sub>2</sub> - BC <sub>3</sub>	90 ml	1		12.10.2022
t0	BT <sub>1</sub> - BT <sub>2</sub> - BT <sub>3</sub>	90 ml	2		12.10.2022
t0	P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> - P <sub>3</sub>	90 ml	3		12.10.2022
t0	O <sub>1</sub> - O <sub>2</sub> - O <sub>3</sub>	90 ml	4		12.10.2022
t0	K <sub>1</sub> - K <sub>2</sub> - K <sub>3</sub>	90 ml	5		12.10.2022

Çizelge 4.7.(devam)

t0	Arazi Negatifi	90 ml	t0-N	12.10.2022
t1	BC <sub>1</sub> - BC <sub>2</sub> - BC <sub>3</sub>	90 ml	6	19.10.2022
t1	BT <sub>1</sub> - BT <sub>2</sub> - BT <sub>3</sub>	90 ml	7	19.10.2022
t1	P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> - P <sub>3</sub>	90 ml	8	19.10.2022
t1	O <sub>1</sub> - O <sub>2</sub> - O <sub>3</sub>	90 ml	9	19.10.2022
t1	K <sub>1</sub> - K <sub>2</sub> - K <sub>3</sub>	90 ml	10	19.10.2022
t1	Arazi Negatifi	90 ml	t1-N	19.10.2022
t2	BC <sub>1</sub> - BC <sub>2</sub> - BC <sub>3</sub>	90 ml	11	26.10.2022
t2	BT <sub>1</sub> - BT <sub>2</sub> - BT <sub>3</sub>	90 ml	12	26.10.2022
t2	P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> - P <sub>3</sub>	90 ml	13	26.10.2022
t2	O <sub>1</sub> - O <sub>2</sub> - O <sub>3</sub>	90 ml	14	26.10.2022
t2	K <sub>1</sub> - K <sub>2</sub> - K <sub>3</sub>	90 ml	15	26.10.2022
t2	Arazi Negatifi	90 ml	t2-N	26.10.2022
t3	BC <sub>1</sub> - BC <sub>2</sub> - BC <sub>3</sub>	Katı örnek	16	2.11.2022
t3	BT <sub>1</sub> - BT <sub>2</sub> - BT <sub>3</sub>	Katı örnek	17	2.11.2022
t3	P <sub>1</sub> - P <sub>2</sub> - P <sub>3</sub>	Katı örnek	18	2.11.2022
t3	O <sub>1</sub> - O <sub>2</sub> - O <sub>3</sub>	Katı örnek	19	2.11.2022
t3	K <sub>1</sub> - K <sub>2</sub> - K <sub>3</sub>	Katı örnek	20	2.11.2022
t3	Arazi Negatifi	90 ml	t3-N	2.11.2022

Biyoyumak oluşum miktarı 21.günün (t3) sonunda imhoff hunisi kullanılarak hacimsel olarak ölçülmüştür.

### 4.2.3. ÇEVRESEL DNA (EDNA) İZOLASYONU

#### 4.2.3.1. Steriveksten eDNA İzolasyonu

Steriveks örneklerinden eDNA izolasyonu Spens ve arkadaşları (37) tarafından optimize edilen filtre kesme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Filtre kesme yöntemi ile elde edilen filtreler GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland) kullanılarak üreticinin Fragment Tissue (Parçalanmış Doku) protokolü takip edilerek izole edilmiştir.

Steriveks Filtreden izolasyon;

1. (-20) °C'den oda sıcaklığına getirilen Sterivex örnekleri giriş kısmından açılarak filtre dışarı çıkarılmıştır. Filtre kağıdı steril bistüri ile küçük parçalar halinde kesilerek 2ml'lik dayanıklı tüplere aktarılır.
2. Dayanıklı tüp içerisindeki filtrelerin üzerine 6 adet seramik boncuk ve 350 µl ultra saf su eklenir.
3. Bertin-Precellys Evolotion cihazında 4500 rpm'de 1 dakika boyunca homojenizasyon gerçekleştirilir.
4. Dayanıklı tüp içerisindeki filtrelerin üzerine 350 µl BT Liziz Tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklenir.
5. Örnekler 3 saat boyunca 56°C'de inkübe edilir ve her 15 dakikada bir alt-üst yapılarak karıştırılır.
6. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 350 µl Sol BT Tamponu eklenir ve tüpler alt-üst yapılarak karıştırılır.
7. Örnekler 70 °C'de 10 dakika inkübe edilir.
8. Örneklerin üzerine 350 µl soğuk %100 etanol eklenir.
9. Örnekler alt-üst yapılarak karıştırılır.
10. 12.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj yapılır.
11. 600 µl süpernatant izolasyon öncesi 40 µl T tamponu ile aktifleştirilmiş DNA bağlanma kolonuna aktarılır.

12. 11.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılır.
13. Kolon çıkarılır ve kolondan geçen sıvı atılır, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
14. Örnekten geriye kalan süpernatant DNA bağlanma kolonuna aktarılır.
15. 11.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılır.
16. Kolon çıkarılır ve kolondan geçen sıvı atılır, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
17. 500 µl yıkama tamponu BTX1 aktive edilmiş DNA bağlanma kolonuna aktarılır.
18. 11.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılır.
19. Kolon çıkarılır ve kolondan geçen sıvı atılır, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
20. 500 µl yıkama tamponu BTX2 aktive edilmiş DNA bağlanma kolonuna aktarılır.
21. 11.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj yapılır.
22. Kolon çıkarılır ve kolondan geçen sıvı atılır, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
23. DNA bağlanma kolonunu yeni bir toplama tüpüne (2 ml) aktarılır.
24. Önceden ısıtılmış 50 µl Elüsyon tamponu DNA bağlanma kolonunun tam ortasına gelecek şekilde eklenir.
25. DNA bağlanma kolonu oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
26. 11.000 G'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılır.
27. DNA bağlanma kolonundan geçen ve genomik DNA'yı içeren elüsyon tamponu 200 µl'lik PZR tüplerine aktarılır.
28. DNA örnekleri (-20)°C'de muhafaza edilir

İzole edilen DNA örneklerinin DNA konsantrasyonları ve saflık kaliteleri BMG Lab Spectrostar Nanospektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

#### **4.2.3.2. Katı Biyoyumaktan eDNA İzolasyonu**

(-20)°C'de muhafaza edilen katı biyoyumak örneklerinden eDNA izolasyonu GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland) kullanılarak üreticinin Fragment Tissue (Parçalanmış Doku) protokolü takip edilerek izole edilmiştir.

Biyoyumak örnekleri içerisindeki suyun uzaklaştırılması için biyoyumak örnekleri için 2 dakika 8.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sıvı üst faz kısmı atıldıktan sonra katı olan pelet kısmından 10 mg örnek alınarak izolasyona devam edilmiştir.

4.2.3.1. başlıkta belirtilen protokol 2.adımından itibaren aynı şekilde katı örneklere de uygulanmıştır.

İzole edilen DNA örneklerinin DNA konsantrasyonları ve saflık kaliteleri BMG Lab Spectrostar Nanospektrofotometre spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

#### 4.2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak uygun enzim, primer bağlanma (annealing) sıcaklığı ve döngü sayısı için optimizasyon reaksiyonları gerçekleştirilip ardından örneklerin polimeraz zincir reaksiyonu optimize edilmiş reaksiyon profiline göre gerçekleştirilmiştir. PZR aşamasında bakteri ve arkeler için evrensel 16S rRNA (Çizelge 4.8) primeri kullanılmıştır. PZR ile çoğaltılan barkod bölgeleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 120 voltta 40 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme sisteminde bant yoğunluğu ve gen bölgesinin boyutu pozitif örnek baz alınarak tayin edilmiştir.

Çizelge 4.8. 16sV3 primer bilgisi

Primer	Primer Dizisi	Hedef Organizma	Gen Bölgesi	Referans
16sV3F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	Bakteri	16sV3	(61)
16sV3R	ACCGCGGCTGCTGGCAC	Bakteri	16sV3	(61)

5x Firepol Master Mix reaktif protokolü çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. 5x Firepol Master Mix Reaktif protokolü

Reaktif	Miktar
5x Firepol Master Mix	2 µl
İleri Primer	0.2 µl
Geri Primer	0.2 µl
DNA	0.5 µl
Ultra Saf Su	7.3 µl

5x Firepol Master Mix döngü protokolü (Gradyent) çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü

95°C	15 dk	
95°C	15 sn	X30 döngü
50-65°C	45 sn	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	
8°C	∞	

5x Firepol Master Mix döngü protokolü Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü

95°C	15 dk	
95°C	15 sn	X30 döngü
53°C	45 sn	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	
8°C	∞	

## 4.2.5. KÜTÜPHANE HAZIRLIĞI

### 4.2.5.1. İndeksli Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu aşamasında optimize edilen reaksiyon profili ile evrensel 16S rRNA primerlerinin indeksli formları ile PZR gerçekleştirilmiştir. İndeksler dizilemenin gerçekleştirileceği Illumina Iseq 100 yeni nesil dizileme platformuna uygun adaptör dizileri içermektedir. PZR ile çoğaltılan indeksli barkod bölgeleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 120

voltta 40 dakika yürütülmüş ve UV görüntüleme sisteminde bant yoğunluğu ve gen bölgesinin boyutu pozitif örnek baz alınarak tayin edilmiştir.

Çizelge 4.12. 16sV3 indeksli primer bilgisi

<b>Primer</b>	<b>Primer Dizisi</b>	<b>Hedef Organizma</b>	<b>Gen Bölgesi</b>
16sV3-F-index	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGT ATAAGAGACAGACTCCTACGG GAGGCAGCAGT	Bakteri	16sV3
16sV3-R-index	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG TATAAGAGACAGACCGCGGCT GCTGGCAC	Bakteri	16sV3

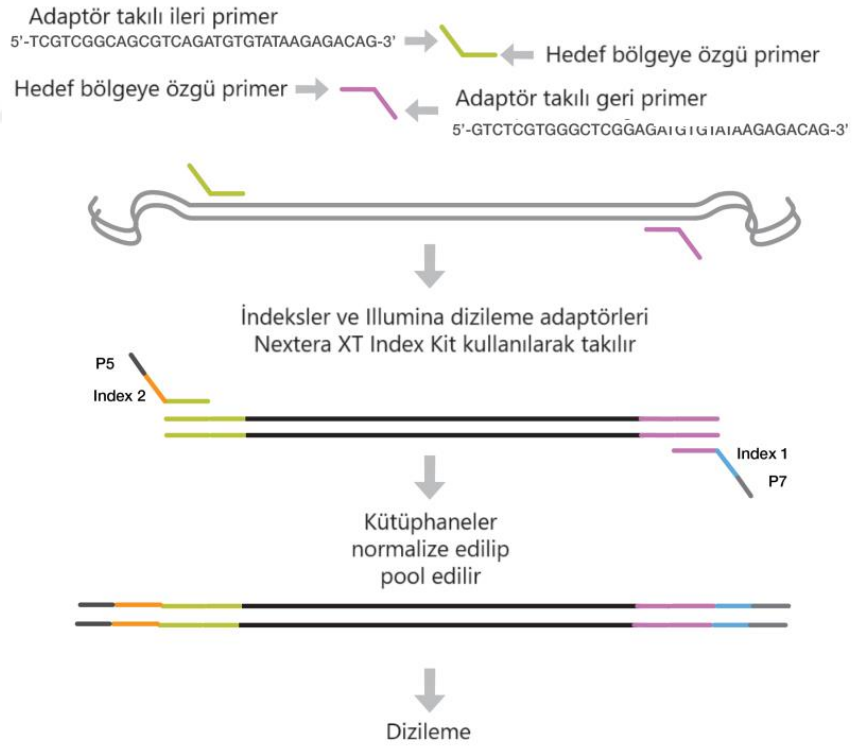
Çizelge 4.13. 5x Firepol Master Mix reaktif protokolü

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
5x Firepol Master Mix	2 µl
İleri İndex Primer	0.2 µl
Geri İndex Primer	0.2 µl
DNA	0.5 µl
Ultra Saf Su	7.3 µl

Çizelge 4.14. 5x Firepol Master Mix döngü protokolü

95°C	15 dk	X30 döngü
95°C	15 sn	
53°C	45 sn	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	
8°C	∞	

#### 4.2.5.2. Kütüphane Oluşturma Aşaması



Şekil 4.8. Görsel materyal "Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System" protokol kitapçığından Türkçe'ye çevrilmiştir.

#### 4.2.5.2.1. PZR Clean-Up Aşaması

Bu aşamada AMPure XP boncukları ile çoğaltılan 16s V3 amplikonları primer ve primer dimer kirliliklerinden arındırılmak amacı ile saflaştırılır.

1. Amplikonları içeren PZR plate'i 1,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
2. AMPure XP boncuklar kullanılmadan önce 30 saniye boyunca maksimum hızda vortekslenir.
3. PZR plate'indeki her örneğe 20'şer µl AMPure XP boncuklardan eklenir.
4. PZR plate'indeki örnekler nazikçe 10 kez 45 µl'ye ayarlanmış pipet ile pipetaj yapılarak karıştırılır.
5. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilir.
6. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standda yerleştirilir ve üst faz berrak olana dek en az 2 dakika boyunca beklenir.
7. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken pipet ile berrak olan üst faz çekilir ve uzaklaştırılır.
8. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncuklar yeni hazırlanmış %80 etanol karışımı ile aşağıdaki adımlar takip edilerek yıkanır:
  - a. 200µl yeni hazırlanmış %80'lik etanol her örnek üzerine eklenir.
  - b. Plate manyetik standta 30 saniye inkübe edilir.
  - c. Üst faz dikkatlice alınır ve uzaklaştırılır.
9. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncuk yeni hazırlanmış %80 etanol karışımı ile aşağıdaki adımlar takip edilerek yıkanır:
  - a. 200µl yeni hazırlanmış %80'lik etanol her örnek üzerine eklenir.
  - b. Plate manyetik standta 30 saniye inkübe edilir.
  - c. Üst faz dikkatlice alınır ve uzaklaştırılır.
  - d. Arta kalan etanolü uzaklaştırmak için 10 µl'lik bir pipet kullanılır.
10. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncukların hava yardımı ile kurumması için 10 dakika inkübe edilir.
11. Örnekleri içeren PZR plate'i manyetik standtan alınır. Her örneğin üzerine 52.5 µl 10 mM Tris pH 8.5 eklenir.
12. Örnekler nazikçe 10 kez pipetaj ile karıştırılır. Boncukların homojen olarak karıştığından emin olunur.

13. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edilir.
14. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standda yerleştirilir ve üst faz berrak olana dek en az 2 dakika boyunca beklenir.
15. Çok kanallı bir pipet seti 50 µl'ye ayarlanıp üst faz dikkatlice yeni bir PZR plate'ine aktarılır.

#### 4.2.5.2.2. İndeks PZR

Bu aşamada ikili indeksler ve Illumina dizileme adaptörleri Nextera XT Index Kit kullanılarak 16s amplikonlarına takılır.

1. Çok kanallı bir pipet seti kullanılarak her örnekten 5'er µl alınarak yeni bir PZR plate'ine aktarılır. Arta kalan 45 µl örnek diğer kullanımlar için saklanabilir.
2. Nextera ikili XT indeksleri Çizelge 4.15.'te gösterildiği gibi her örneğe benzersiz primer çifti gelecek şekilde hazırlanır:

Çizelge 4.15. Nextera ikili XT indekslerinin örnekler ile eşleştirilmesi

	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	N709	N710	N711	N712
S502	0	1-t0	2-t0	3-t0	4-t0	5-t0	1-t1	2-t1	3-t1	4-t1	5-t1	1-t2
S503	2-t2	3-t2	4-t2	5-t2	1-t3	2-t3	3-t3	4-t3	5-t3	-	-	-

3. Her örnek için Çizelge 4.16.'daki profili verilen enzim karışımı hazırlanır..

Çizelge 4.16. Nextera ikili XT indeks PZR profili

REAKTİF	HACİM
16s Amplikon	5 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
Su	10 µl

4. Hazırlanan karışım nazikçe 10 kez pipetaj yapılarak karıştırılır.
5. Karışımı içeren plate Microseal 'A' ile kapatılır.
6. Plate 1,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılır.
7. Çizelge 4.16.'da verilen PZR profili takip edilerek reaksiyon gerçekleştirilir:

Çizelge 4.17. Nextera ikili XT indeksleri PZR döngü profili

95°C	3 Dakika	
95°C	30 Saniye	
55°C	30 Saniye	X8 Döngü
72°C	30 Saniye	
72°C	5 Dakika	

#### 4.2.5.2.3. İkinci PZR Clean-Up Aşaması

Bu aşamada oluşturulan kütüphane kalite kontrol adımından önce AMPure XP boncuklar ile temizlenir.

1. İndeksli amplikonları içeren PZR plate'i 280 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
2. AMPure XP boncuklar kullanılmadan önce 30 saniye boyunca maksimum hızda vortekslenir.
3. PZR plate'indeki her örneğe 56 µl AMPure XP boncuklardan eklenir.
4. PZR plate'indeki örnekler nazikçe 10 kez 100 µl'ye ayarlanmış pipet ile pipetaj yapılarak karıştırılır.
5. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilir.

6. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standda yerleştirilir ve üst faz berrak olana dek en az 2 dakika boyunca beklenir.
7. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken pipet ile berrak olan üst faz çekilir ve uzaklaştırılır.
8. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncuklar yeni hazırlanmış %80 etanol karışımı ile aşağıdaki adımlar takip edilerek yıkanır:
  - d. 200ul yeni hazırlanmış %80'lik etanol her örnek üzerine eklenir.
  - e. Plate manyetik standta 30 saniye inkübe edilir.
  - f. Üst faz dikkatlice alınır ve uzaklaştırılır.
9. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncuklar yeni hazırlanmış %80 etanol karışımı ile aşağıdaki adımlar takip edilerek yıkanır:
  - e. 200ul yeni hazırlanmış %80'lik etanol her örnek üzerine eklenir.
  - f. Plate manyetik standta 30 saniye inkübe edilir.
  - g. Üst faz dikkatlice alınır ve uzaklaştırılır.
  - h. Arta kalan etanolü uzaklaştırmak için 10ul'lik bir pipet kullanılır.
10. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standta iken boncukların hava yardımı ile kuruması için 10 dakika inkübe edilir.
11. Örnekleri içeren PZR plate'i manyetik standtan alınır. Her örneğin üzerine 27.5 µl 10 mM Tris pH 8.5 eklenir.
12. Örnekler nazikçe 10 kez pipetaj ile karıştırılır. Boncukların homojen olarak karıştığından emin olunur.
13. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edilir.
14. Örnekleri içeren PZR plate manyetik standda yerleştirilir ve üst faz berrak olana dek en az 2 dakika boyunca beklenir.

15. Çok kanallı bir pipet seti 25 µl'ye ayarlanıp üst faz dikkatlice yeni bir PZR plate'ine aktarılır.

#### **4.2.5.3. Kütüphane Validasyonu**

Elde edilen kütüphanelerin kalite kontrolü için kütüphanelerden 1 µl alınarak aşağıdaki protokol takip edilerek Bioanalyzer DNA 1000 çipi aracılığıyla ürün boyu kontrol edilmiştir:

1. Bioanalyzer sistemleri için üretilen DNA 1000 kiti işlemden 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkarılır.
2. Hazırlama istasyonuna yeni bir çip yerleştirilir.
3. Çipin siyah G işaretli kuyusuna 9 µl kit tarafından sağlanan jel-boya karışımı pipet yardımı ile yüklenir.
4. Hazırlama istasyonu kapatılır.
5. Hazırlama istasyonunun klipsi kapanana dek 1ml'lik pistonu basılır.
6. Klipsi açmadan önce 60 saniye beklenir.
7. 5 saniye beklenir ve piston yavaşça 1 ml pozisyonuna getirilir.
8. Çip hazırlama istasyonu açılır ve çipin beyaz G işaretli kuyularına 9 µl kit tarafından sağlanan jel-boya karışımı pipet yardımı ile yüklenir.
9. Kit tarafından sağlanan marker tüm örnek ve ladder kuyularına 5 µl olacak şekilde yüklenir.
10. Kit tarafından sağlanan ladder, ladder işareti bulunan kuyuya 1 µl olacak şekilde yüklenir.
11. Çip üzerindeki 12 adet örnek kuyusuna kütüphane örneklerinden 1 µl olacak şekilde yüklenir. Örnek yüklenmeyen boş kuyulara 1 µl saf su yüklenir.
12. Çip yatay olarak aadaptöre yerleştirilir ve 2400 rpm'de 1 dakika boyunca vortekslenir.
13. Çip zaman kaybetmeden 2100 Bioanalyzer cihazına yerleştirilir ve işlem başlatılır.

#### **4.2.5.4. Kütüphanenin Pool Edilmesi**

Elde edilen amplikon kütüphaneleri Qubit 3.0 Fluorometer cihazı kullanılarak mikrolitredeki nanogram miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanan florometrik kantifikasyon yöntemi kullanılmıştır.

Nanomolardaki (nM) DNA konsantrasyonu 2100 Bioanalyzer cihazı ile belirlenen DNA amplicon boyutu baz alınarak hesaplanmıştır. Hesaplama Şekil 4.9.'da ifade edilen formülasyon kullanılmıştır.

$$\frac{\text{ng/}\mu\text{l'deki konsantrasyon}}{(\text{660 g/mol}) \times \text{ortalama kütüphane boyutu}} \times 10^6 = \text{nM'daki Konsantrasyon}$$

Örneğin:

$$\frac{15 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(\text{660 g/mol} \times 370)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Şekil 4.9. Kütüphane pool aşaması formülasyonu

Süspansiyon tamponu (RSB) kullanılarak kütüphanelerin son halleri formülde elde edilen nM hesabına göre seyreltilir. Her bir kütüphaneden 5 µl alınarak homojen bir şekilde tek tüpte karıştırılır.

## 4.2.6. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

### 4.2.6.1. Verilerin Filtrelenmesi

Biyoinformatik analizler Linux/Unix arayüzlü işletim sisteminin terminali aracılığıyla OBITools iş akışı (62) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Illumina Iseq 100 cihazından alınan “.fastq” formatındaki ileri ve geri okumalı dizilerin kalite kontrolü FASTQC programı ile gerçekleştirilmiştir. 16sV3F ve 16sV3R primer çifti ile çoğaltılan ileri ve geri dizilerin analizi için oluşturulan iş akışı;

1. “illumina-paired-end” komutu ile kalitesi 30 ve üzeri olan okumalar ayrılır ve ayrılan bu okumaların ileri ve geri okumaları birleştirilir.
2. “Obigrep” komutu ile ilk aşamada birleştirilemeyen okumalar filtrelenir.
3. “Tagcleaner” komutu ile dizilerin uçlarındaki ileri ve geri primer dizileri çıkarılır.
4. “Obiuniq” komutu ile tekrar eden aynı okumalar tek bir okuma haline getirilir.
5. “Obiannotate” komutu ile okumaların başlık kısmındaki istatistiksel bilgiler silinir ve okumaların yalnızca okuma sayıları alınır.

6. “Obigrep” komutu ile uzunluğu 100 baz ve üzeri olan ve okuma sayısı en 5 olan okumalar filtrelendir.
7. “Obiclean” komutu ile gürültü okumalar temizlenmiştir.

Komut bazlı çeşitli filtrelerden geçirilen okumalar en son temizlenmiş bir halde “.fastq” formatında elde edilmiştir.

#### **4.2.6.2. Taksonomik Tanımlama**

##### **4.2.6.2.1. SILVAngs**

SILVAngs, yüksek verimli dizileme (yeni nesil dizileme) yaklaşımı ile elde edilen ribozomal RNA geni (rDNA) ampikon okumalarının veri analizi için geliştirilmiş çevrimiçi bir veri analizi hizmeti sağlayıcısıdır. Sahip olduğu dizi veritabanlarını referans olarak kullanarak elde edilen verileri taksonomik olarak tanımlar. rDNA okumalarını tanımlar ve tablolar, grafikler, dizi dosyaları gibi çıktılara çevirir. SILVAngs’in verileri işlediği iş akışı şu şekilde sıralanabilir:

- Hizalama
- Kalite Kontrolü
- Benzer dizilerin tanımlanması
- Operasyonel taksonomik birimlerin (OTU) bir eşik değeri baz alınarak tanımlanması
- Operasyonel taksonomik birimlerin (OTU) veya okumaların sınıflandırılması

4.2.6.1. başlıkta belirtilen komutlar vasıtasıyla çeşitli filtreler ile temizlenen veriler son halinde “.fastq” formatında elde edilen veriler Şekil 4.10’da gösterilen parametreler seçilerek SILVAngs sistemine yüklenmiştir.

<b>Project Name *</b>	<input type="text" value="Biyoyumak_Tez"/>
	Optimally a short and concise name for easy identification should be used.
<b>Sequence Type *</b>	<input type="text" value="16S/18S, SSU"/>
	The rRNA subunit type that is used for this project.
<b>Sequencing Technology *</b>	<input type="text" value="Illumina (MiSeq/HiSeq)"/>
	The sequence technology that was used to obtain the sequences that are used in this project.
<b>Expected Sequence Quantity *</b>	<input type="text" value="2000"/>
	An estimated value of how many sequences will be used for this project.
<b>Expected Read Length *</b>	<input type="text" value="450"/>
	An estimated read length value for the sequence data that will be used for this project.
<b>Project Description</b>	<input type="text" value="Biyoyumak Sistemlerinde Mikrobiyotanın Zamana Bağlı Değişiminin Metagenomik Analizi"/>

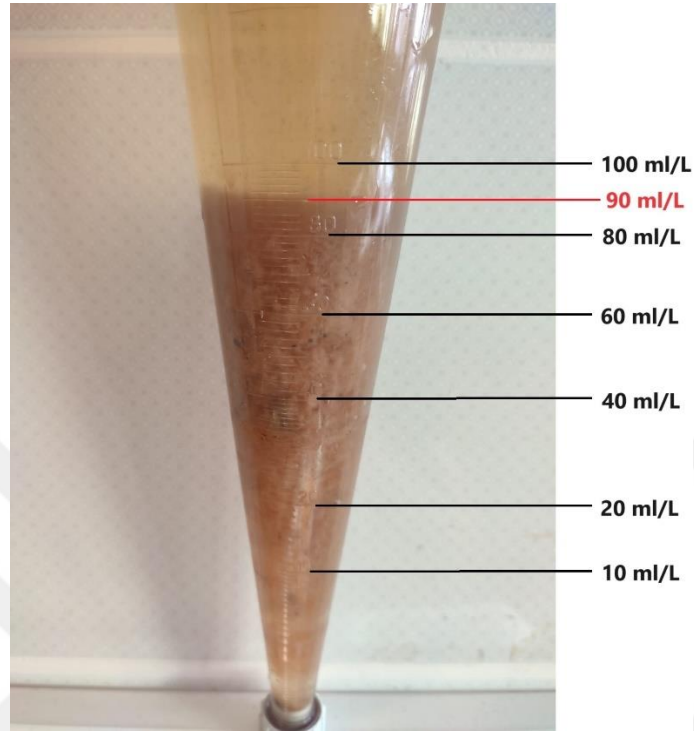
Şekil 4.10. SILVAngs ampikon veri girdi parametreleri

#### 4.2.6.2.2. Geneious BLAST

Geneious BLAST, verilen diziyi Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'de bulunan çeşitli çevrimiçi veri bankalarının içerdiği diziler ile karşılaştırarak tür düzeyinde taksonomik profillemeyi olanaklı kılmaktadır. Tür düzeyinde taksonomik tanımlama için 4.2.6.1. başlıkta belirtilen komutlar vasıtasıyla çeşitli filtreler ile temizlenen veriler son halinde “.fastq” formatında elde edilen veriler Geneious BLAST sisteminde veri tabanı ‘16s ribozomal RNA’, maksimum E-değeri 0.05 ve yanlış eşleşme sayısı 1-2 olarak ayarlandıktan sonra ‘Megablast’ programı uygulanmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. BİYOYUMAK OLUŞUMU



Şekil 5.1. 21. günün sonunda biyoyumak örneklerinin imhoff hunisi ile yoğunluk ölçümü

Biyoyumak örneklerinin yoğunluğu imhoff hunisi kullanarak 21. Günün sonunda süzülüp ölçülmüş ve 90 ml/L yoğunluğa sahip olduğu görülmüştür. Literatüre göre su ürünleri yetiştiriciliğinde verimli sonuçların alınabilmesi için biyoyumak yoğunluğunun 10 ile 40 ml/L aralığında olması önerilmektedir (63). Denemelerde protein oranı %38 olan yem kullanılmasının ve karbon:azot oranı 15 olarak ayarlanmasının oluşan biyoyumak yoğunluğunda başarılı sonuç verdiği böylece görülmüştür.

### 5.2. MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

#### 5.2.1. SPEKTROFOTOMETRE SONUÇLARI

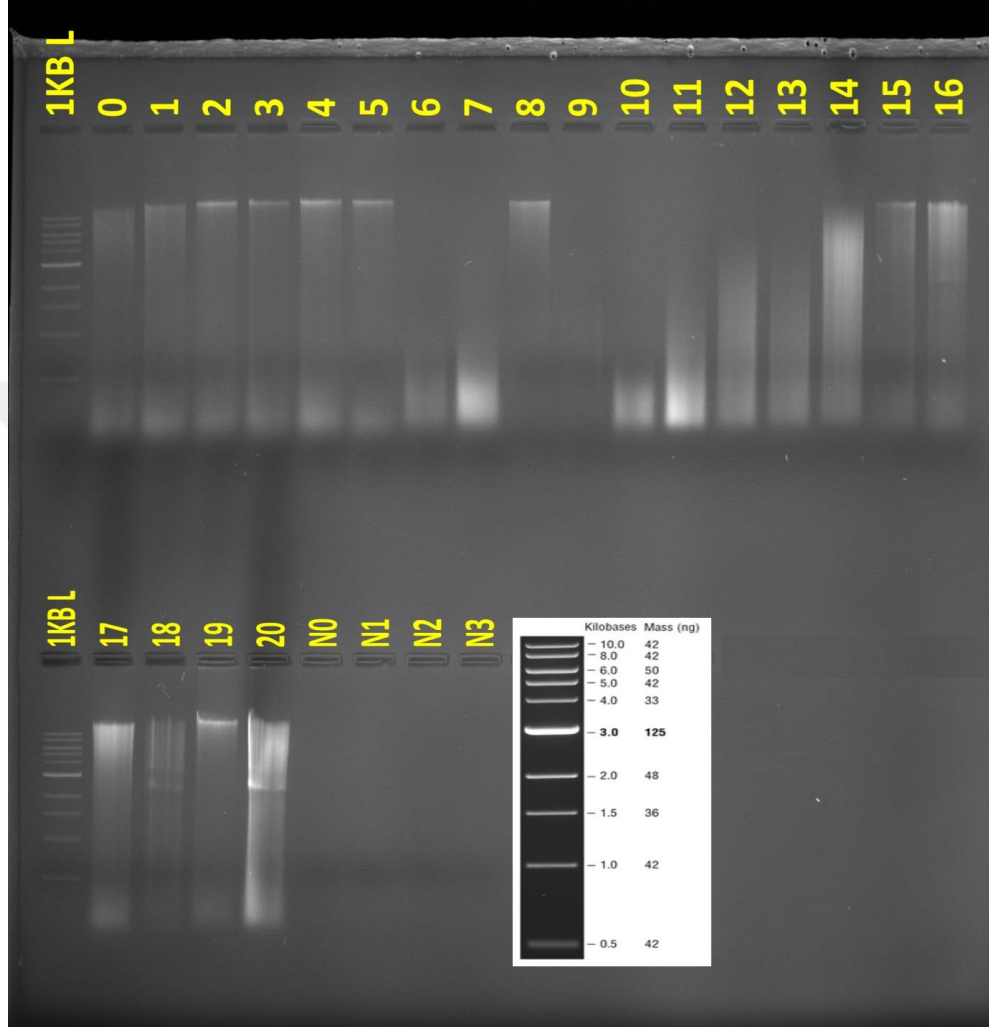
DNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin nanospektrofotometre ölçümü SPECTROstar Nano Microplate Reader cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.1. DNA izolatlarının nanospektrofotometre ölçüm sonuçları

ÖRNEK	KONSANTRASYON (ng/ul)	A260/A280	A260/A230
0	140	2,12	1,9
1	105,53	1,94	1,93
2	93,05	2	1,92
3	75,86	1,65	1,92
4	123,83	2,61	1,92
5	50,39	2,38	2,03
6	51,82	1,71	1,89
7	201,81	2,19	1,84
8	38,18	1,44	1,86
9	12,48	0,67	1,69
10	75,02	1,69	1,79
11	151,7	1,88	1,76
12	94,05	1,97	1,75
13	119,47	1,91	1,78
14	186,17	1,94	1,75
15	75,24	2,2	1,83
16	124,59	1,68	1,75
17	216,81	1,86	1,77
18	58,23	1,41	1,75
19	124,4	1,67	1,74
20	306,15	2,11	1,79

## 5.2.2. DNA İZOLASYON SONUÇLARI

Örneklerden izole edilen total DNA'lar 1:1 oranında yükleme boyası ile boyandıktan sonra %1'lik agaroz jele yüklenip 120 voltta 50 dakika yürütülmüştür.

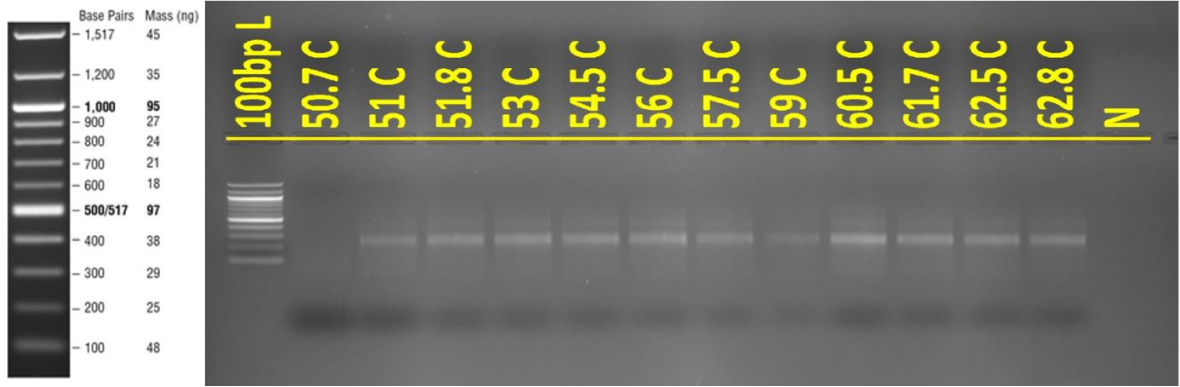


Şekil 5.2. DNA izolatlarının %1'lik agaroz jel görüntüsü. KB: Kilo Baz, L:Ladder, N0,N1,N2 ve N3 4 zaman periyoduna ait arazi negatifleri

## 5.2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI

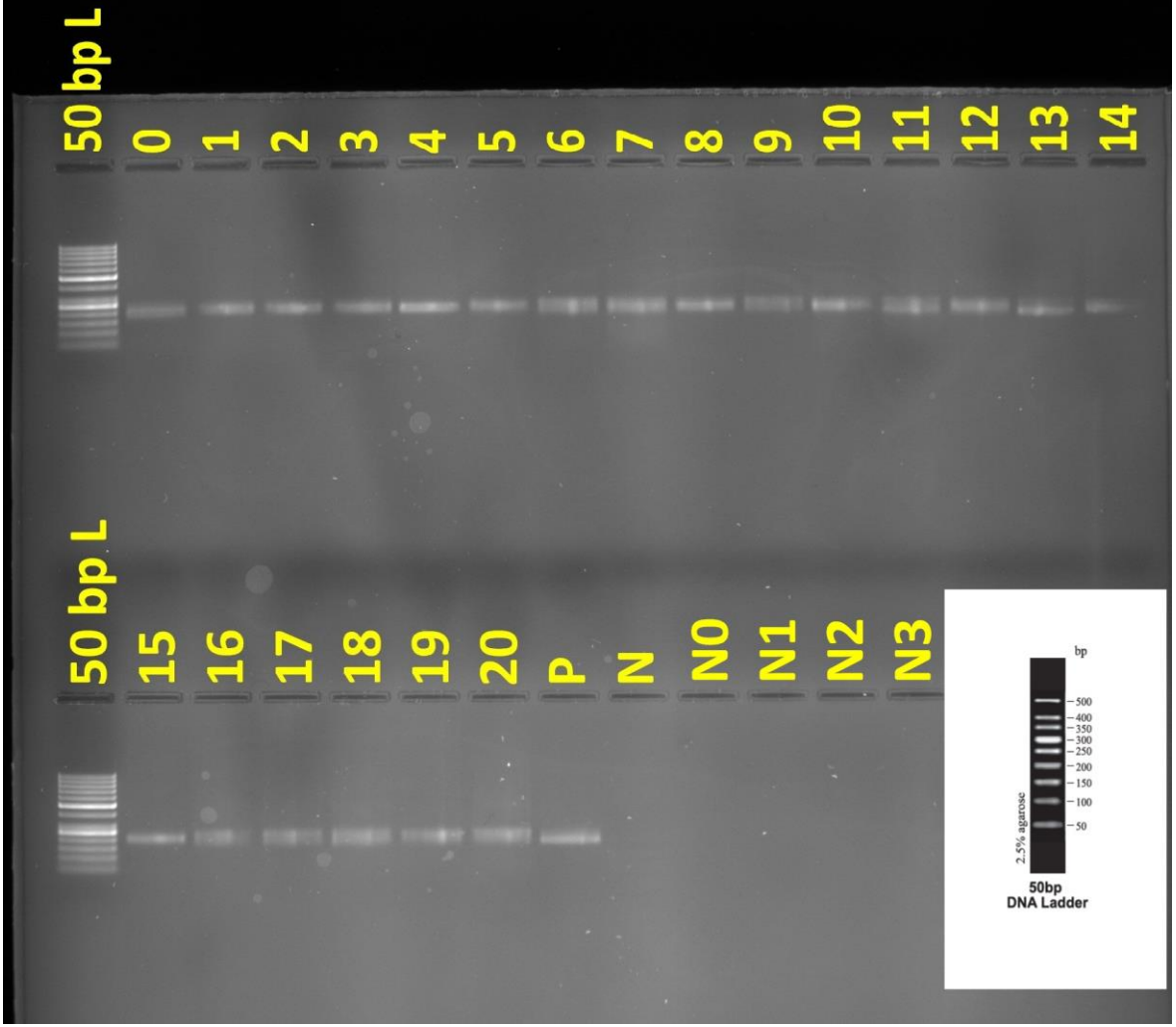
Rutin laboratuvar çalışmalarında ve literatürde 16sV3F – 16sV3R primer çifti 5x Firepol Master Mix enzimi ile 53°C'de çalıştığı bilinse de çevresel örneklerde çevreden kaynaklı inhibitör etkisi ve DNA'nın degrade olması gibi faktörlerin primer bağlanma sıcaklığını etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple 16sV3F – 16sV3R primer çifti ve 5x Firepol Master Mix enzimi ile 50 °C – 65 °C arası sıcaklık olacak şekilde DNA saflığı en düşük olan 9 numaralı örnek ile gradiyent PZR gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 120 voltta 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütülen jel Vilber Fusion Solo UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.



Şekil 5.3. 16sV3 primeri gradiyent PZR agaroz jel görüntüsü

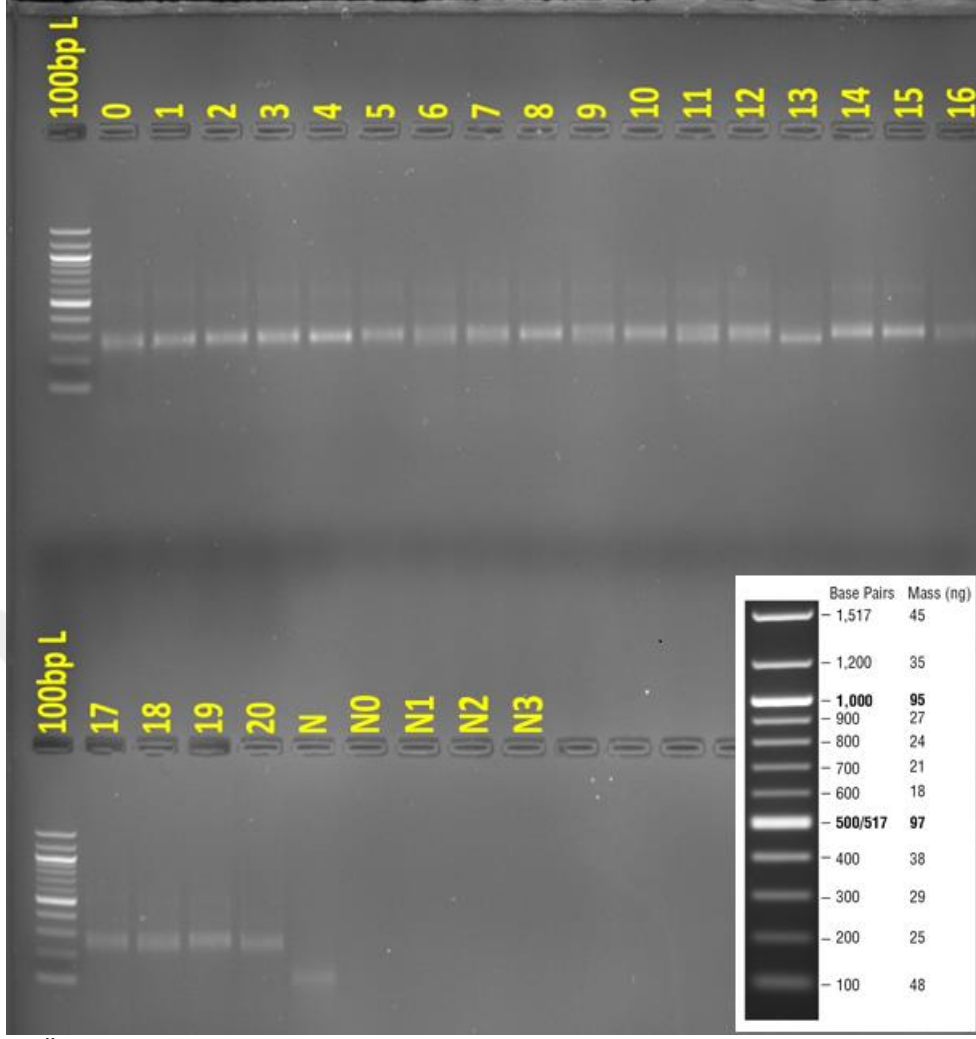
Gradyent PZR sonucu rutin çalışmalar ve literatürün de desteklediği üzere 53°C'de iyi sonuç alındığı tespit edilerek tüm örneklerin 53°C'de PZR'ının gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 5.4. Örneklerin 16sV3 primeri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü

#### 5.2.4. İNDEKSLİ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU SONUÇLARI

16sV3F – 16sV3R primer çifti ile elde edilen barkod bölgelerinin yüksek verimli dizileme platformunda dizilenebilmesi için primerlerin uçlarına Illumina adaptörleri eklenerek indeksli primerler oluşturuldu. İndeksli primer çifti ile 5x Firepol Master Mix enzimi kullanılarak 53°C’de PZR gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri %2’lik agaroz jelde 120 voltta 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütülen jel Vilber Fusion Solo UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.



Şekil 5.5. Örneklerin indeksli 16sV3 primeri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü

## 5.2.5. KÜTÜPHANE AŞAMASI SONUÇLARI

### 5.2.5.1. Qubit Ölçümü Sonuçları

Elde edilen amplicon kütüphaneleri Qubit 3.0 Fluorometer cihazı kullanılarak mikrolitredeki nanogram miktarları ölçülmüştür.

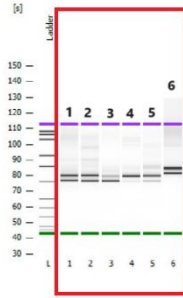
Çizelge 5.2. Amplikon kütüphanelerinin Qubit ölçüm sonuçları

Örnek İsmi	Konsantrasyon (ng/µl)
0	4,29
1	15,2
2	12,9
3	14,6
4	8,56
5	13,3
6	18,4
7	6,14
8	1,62
9	20,6
10	18
11	7,77
12	13,2
13	7,24
14	16,7
15	14,6
16	8,56
17	13,3
18	18,4
19	13,2
20	7,24

### 5.2.5.2. Bioanalizer Sonuları

Kütüphane oluşturma aşamasında Illumina Nextera DNA Prep Library Prep Kit kullanılmıştır. İndeksli PZR ürünlerinin saflaştırılması ‘AMPure XP Beads’ ile gerekleştirilip kitin indeksleri ile dizileme platformuna uygun adaptörler bağlanan kütüphanelerin kalite kontrolü ve ürün boyutu Agilent 2100 Bioanalizer cihazı ve Bioanalizer DNA 1000 ipi kullanılarak gerekleştirilmiştir.

#### Electrophoresis File Run Summary



#### Instrument Information:

Instrument Name: DEDAE02037 Firmware: C.01.069  
Serial#: DEDAE02037 Type: G2939B

#### Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalizer\2100 expert\assays\dsDNA\DNA 1000 Series II.xsy

Assay Class: DNA 1000

Version: 2.3

Assay Comments: DNA Analysis 25 -1000 bp

© Copyright 2003-2009 Agilent Technologies, Inc.

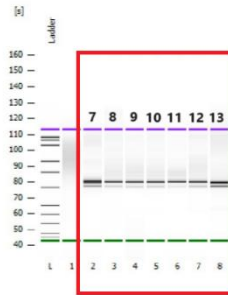
#### Chip Information:

Chip Lot #:

Reagent Kit Lot #:

Chip Comments:

#### Electrophoresis File Run Summary



#### Instrument Information:

Instrument Name: DEDAE02037 Firmware: C.01.069  
Serial#: DEDAE02037 Type: G2939B

#### Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalizer\2100 expert\assays\dsDNA\DNA 1000 Series II.xsy

Assay Class: DNA 1000

Version: 2.3

Assay Comments: DNA Analysis 25 -1000 bp

© Copyright 2003-2009 Agilent Technologies, Inc.

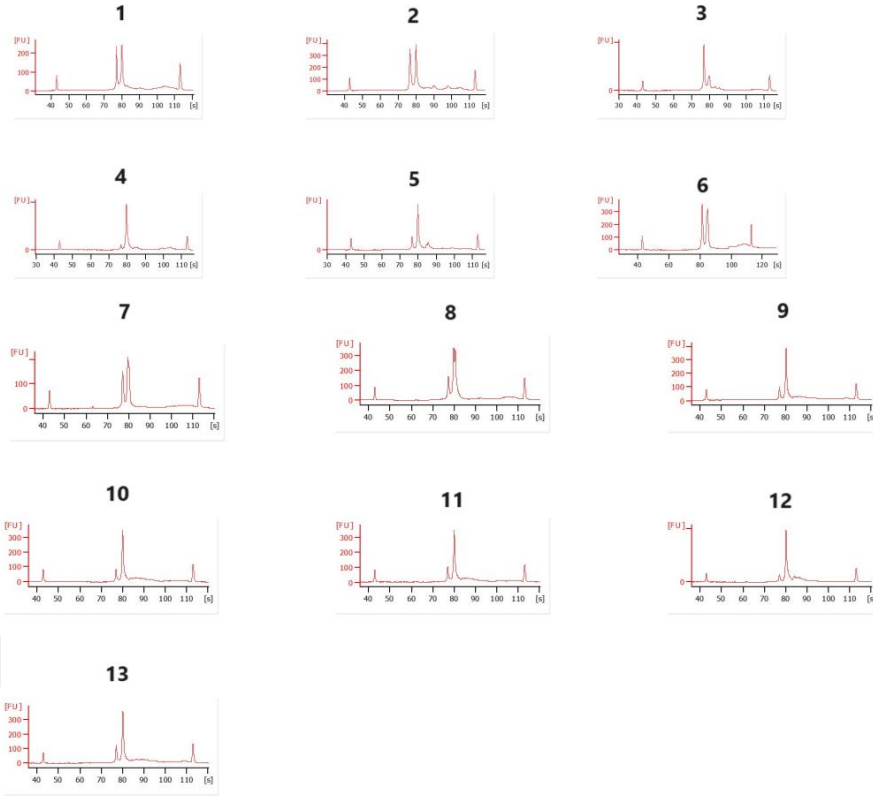
#### Chip Information:

Chip Lot #:

Reagent Kit Lot #:

Chip Comments:

şekil 5.6. Amplikon kütüphanelerinin Bioanalizer elektroforez görüntüleri



Şekil 5.7. Amplicon kütüphanelerinin Bioanalyzer FU çizelgeleri

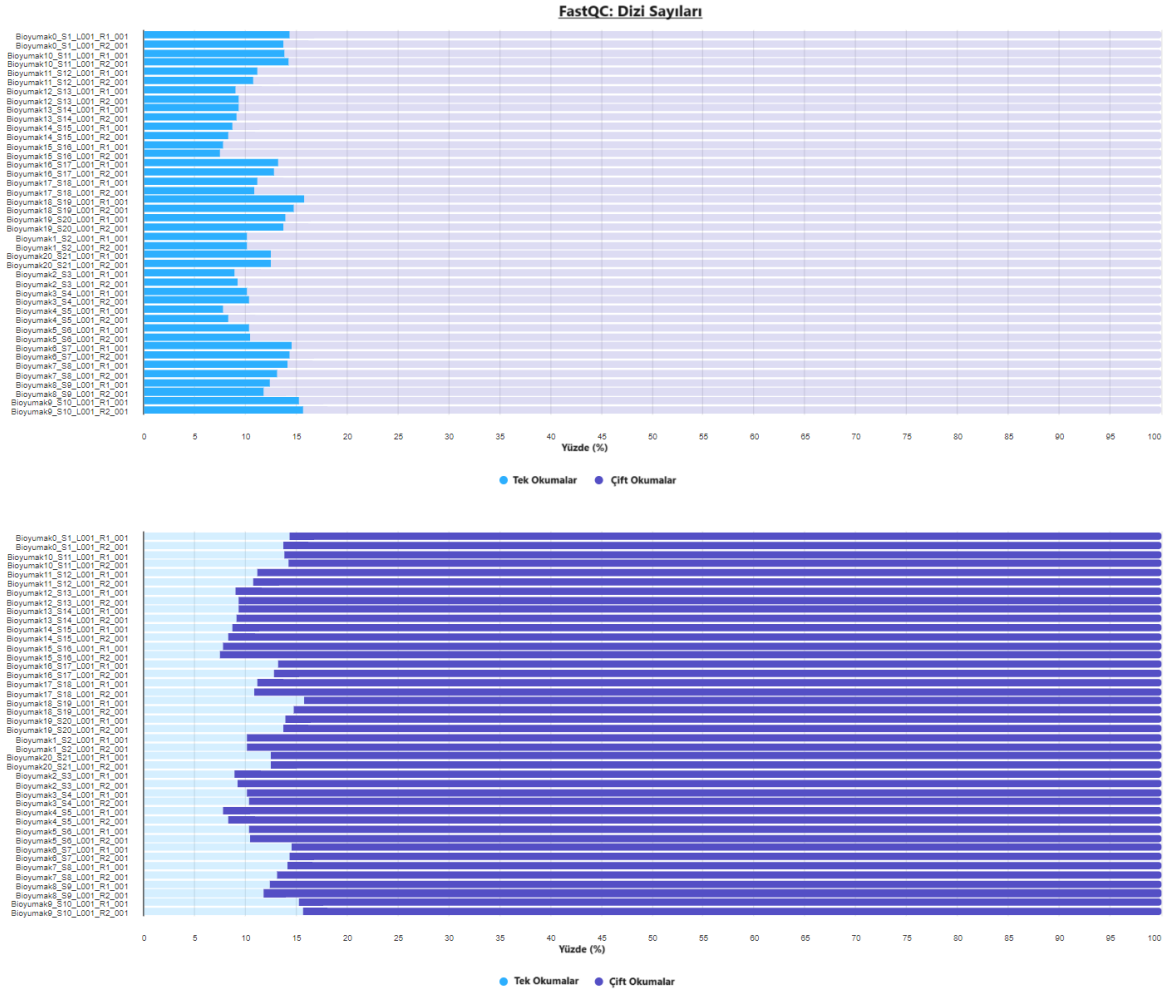
Kütüphanelerin Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ile yapılan kalite kontrolü sonucunda amplicon kütüphanelerinin bantlarının ideal uzunlukta (~370 bp) ve yoğunlukta oldukları görülmüştür.

### 5.2.6. YENİ NESİL DİZİLEME SONUÇLARI

Iseq 100 cihazından elde edilen ham veri (FastQ dosyası) ve Obitools iş akışı ile filtreleme sonucu elde edilen verilerin okuma sayılarındaki değişimler tabloda verilmiştir.

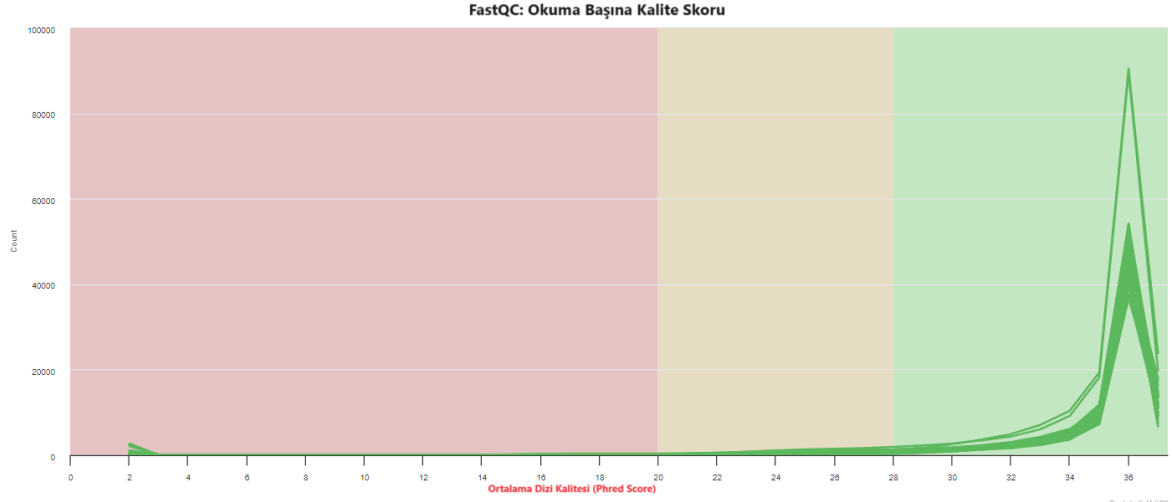
Çizelge 5.3. Dizilerin ham ve çeşitli filtreler sonrası okuma sayıları

Örnek İsmi	Ham veri	uniq	c2	c2.clean
1	70054	38596	4241	1739
2	86329	46446	5200	1774
3	88059	47909	5135	1179
4	78246	38594	4483	3008
5	78696	45013	4699	1539
6	99622	56148	5578	2291
7	87162	49373	5064	1995
8	84098	43895	4810	2543
9	90092	51574	4974	1827
10	93343	49887	4957	1891
11	95170	49841	4533	1645
12	98633	47447	4355	4866
13	77769	38014	5515	1862
14	78423	35848	5427	1565
15	84073	35641	4568	1416
16	86636	54377	5155	2192
17	166744	103436	9674	1394
18	82638	51651	4732	1810
19	96220	62739	5717	1152
20	90116	60329	5191	2862



Şekil 5.8 Amplikon Dizilerinin Dizi Sayısını İfade Eden FastQC Grafiği

Ham amplikon dizi sayılarına bakıldığında tek bir türü ifade eden tek okumaların bütün örneklerde yaklaşık %10-15 civarında olup en az iki farklı dizi tarafından ifade edilen çift okumaların ise ham amplikon dizi verisinde daha baskın olduğu görülmüştür.



Şekil 5.9 Amplikon Dizilerinin Okuma Başına Kalite Skorunun Ortalamasını İfade Eden FastQC Grafiği

Okuma başı kalite skorunu temsil eden FastQC sonuçlarına bakıldığında tüm amplikon örneklerinin FastQC sonuçlarının Q36'da yoğunluk gösterdiği görülmektedir. Yeni nesil dizilemede kalite kontrolü bir bazın yanlış temsil edilme olasılığının tahmini olarak açıklanabilir.  $q = -10 \times \log_{10}(p)$  formülü ile hesaplanan Q skorunda örneğin Q10 bir bazın yanlış temsil edilmesinin  $10^1$  'de 1 olasılığı olduğunu ifade ederken Q50 ise yanlış temsil edilme olasılığının  $10^5$  'de 1 olduğunu ifade eder.

Dizileme kalite skorunun genelde Q30 ve üzeri olması iyi bir okuma kalitesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmada dizilenen amplikon örneklerinde elde edilen ortalama kalite skorunun Q36 olması, yeni nesil dizileme aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

### 5.2.7. TÜR DÜZEYİNDE TAKSONOMİK PROFİLLEME SONUÇLARI

Çizelge 5.4. K biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili

<b>BAKTERİ TÜRÜ</b>	<b>ORAN</b>	<b>SOLUNUM</b>	<b>EKOLOJİ</b>	<b>REFERANS</b>	<b>ZAMAN</b>
Diğer	21,99				K -t0
<i>Catenovulum maritimum</i>	19,11	Aerobik	Sediment	(64)	
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	13,37	Aerobik	Sediment	(65)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	11,40	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Marinobacterium marisflavi</i>	5,09	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	3,61	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Polaribacter lacunae</i>	3,12	Aerobik	Deniz suyu	(69)	
<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	2,71	Aerobik	Deniz suyu	(70)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,30	Aerobik	Deniz suyu	(71)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,97	Aerobik	Deniz suyu	(72)	
<i>Vibrio xuii</i>	1,72	Aerobik	Karides yetiştiriciliği suyu	(73)	

Çizelge 5.4. (devam)

<i>Leisingera aquaemixtae</i>	1,72	Aerobik	Deniz suyu	(74)	
<i>Sinusalibacter lacisalsi</i>	1,56	Aerobik	Tuzlu göl, sediment	(75)	
<i>Alteromonas mediterranea</i>	1,48	Aerobik	Deniz suyu	(76)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,48	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Vibrio panuliri</i>	1,39	Anaerobik	Istakoz yumurtası	(77)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,15	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
<i>Alteromonas oceani</i>	1,07	Aerobik	Derin deniz sedimenti	(79)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	1,07	Aerobik	Deniz suyu	(80)	
<i>Phaeobacter italicus</i>	1,07	Aerobik	Deniz suyu	(81)	
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	0,82	Aerobik	Deniz suyu	(82)	
<i>Vibrio thalassae</i>	0,82	Aerobik	Deniz suyu	(83)	
Diğer	37,00				K - t1
<i>Vibrio hyugaensis</i>	13,06	Aerobik	Deniz suyu	(80)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	11,73	Anaerobik	Deniz suyu	(84)	
<i>Marivita roseacus</i>	9,67	Aerobik	Deniz suyu	(85)	

Çizelge 5.4. (devam)

<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>	7,62	Aerobik	Deniz suyu	(86)
<i>Thalassobius litoralis</i>	3,75	Aerobik	Deniz suyu	(87)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,78	Aerobik	Deniz suyu	(71)
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2,42	Aerobik	Deniz suyu	(68)
<i>Tritonibacter mobilis</i>	2,18	Aerobik	Deniz suyu	(88)
<i>Pararhizobium haloflavum</i>	1,69	Aerobik	Toprak	(89)
<i>Salipiger profundus</i>	1,57	Aerobik	Deniz suyu	(90)
<i>Pyruvatibacter mobilis</i>	1,45	Aerobik	Deniz suyu	(91)
<i>Pedomicrobium manganicum</i>	1,33	Aerobik	Toprak	(92)
<i>Mesorhizobium denitrificans</i>	1,33	Fakültatif	Atık su	(93)
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,21	Aerobik	Deniz suyu	(72)
<i>Cohaesibacter haloalkalitolerans</i>	1,21	Aerobik	Soda gölü	(94)

Çizelge 5.4. (devam)

<i>Catenococcus thiocyli</i>	21,30	Anaerobik	Deniz suyu	(84)	K - t2
<i>Vibrio hyugaensis</i>	19,39	Aerobik	Deniz suyu	(80)	
<i>Nioella nitratreducens</i>	17,60	Aerobik	Deniz suyu	(95)	
<i>Marteella lutilitoris</i>	15,94	Aerobik	Deniz suyu	(72)	
Diğer	15,56				
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	2,17	Aerobik	Deniz suyu	(96)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	1,91	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1,91	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Maricaulis virginensis</i>	1,66	Aerobik	Deniz suyu	(97)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,28	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,28	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
Diğer	44,16				K - t3
<i>Halomonas halophila</i>	10,14	Aerobik	Soda gölü	(98)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	7,06	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Catenococcus thiocyli</i>	4,11	Anaerobik	Deniz suyu	(84)	

Çizelge 5.4. (devam)

<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	3,98	Aerobik	Deniz suyu	(71)
<i>Salipiger profundus</i>	3,85	Aerobik	Deniz suyu	(90)
<i>Vibrio hyugaensis</i>	3,59	Aerobik	Deniz suyu	(80)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,82	Aerobik	Deniz suyu	(99)
<i>Thalassospira alkalitolerans</i>	2,70	Aerobik	Deniz suyu	(100)
<i>Limimanicola aestuariicola</i>	2,57	Aerobik	Deniz suyu	(75)
<i>Maricaulis virginensis</i>	2,57	Aerobik	Deniz suyu	(97)
<i>Henriciella pelagia</i>	2,18	Aerobik	Deniz suyu	(101)
<i>Martelevilla lutilitoris</i>	2,05	Aerobik	Deniz suyu	(72)
<i>Phaeovibrio sulfidophilus</i>	1,93	Aerobik	Sediment	(102)
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,67	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Pyruvatibacter mobilis</i>	1,67	Aerobik	Deniz suyu	(91)
<i>Henriciella algicola</i>	1,54	Aerobik	Deniz suyu	(101)
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,41	Aerobik	Deniz suyu	(78)

Çizelge 5.5. BC biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili

BAKTERİ TÜRÜ	ORA N	SOLUNU M	EKOLOJİ	REFERANS	ZAMA N
<i>Catenovulum maritimum</i>	27,95	Aerobik	Sediment	(64)	<b>BC - t0</b>
Diğer	21,25				
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	15,27	Aerobik	Sediment	(65)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	9,46	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Litorisediminiviven s gilvus</i>	3,04	Aerobik	Deniz suyu	(71)	
<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	2,86	Aerobik	Deniz suyu	(70)	
<i>Polaribacter lacunae</i>	2,41	Aerobik	Deniz suyu	(69)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2,23	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Marinobacterium marisflavi</i>	2,14	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,70	Aerobik	Deniz suyu	(72)	
<i>Leisingera aquaemixtae</i>	1,61	Aerobik	Deniz suyu	(74)	

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Vibrio gallicus</i>	1,43	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(103)	
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	1,43	Aerobik	Deniz suyu	(104)	
<i>Alteromonas mediterranea</i>	1,16	Aerobik	Deniz suyu	(76)	
<i>Alteromonas oceani</i>	1,16	Aerobik	Derin deniz sedimenti	(79)	
<i>Gluconobacter japonicus</i>	1,07	Aerobik	Deniz suyu	(105)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	1,07	Anaerobik	Deniz suyu	(84)	
<i>Vibrio xuii</i>	0,98	Aerobik	Karides yetiştiriciliği suyu	(73)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>	9,44	Aerobik	Deniz suyu	(86)	<b>BC - t1</b>
<i>Vibrio proteolyticus</i>	7,76	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	7,67	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Vibrio hyugaensis</i>	6,44	Aerobik	Deniz suyu	(75)
<i>Marivita geojedonensis</i>	5,03	Aerobik	Deniz suyu	(106)
<i>Litoreibacter ponti</i>	4,23	Aerobik	Deniz suyu	(78)
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	3,79	Aerobik	Deniz suyu	(104)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	3,17	Aerobik	Deniz suyu	(71)
<i>Marivita roseacus</i>	3,00	Aerobik	Deniz suyu	(85)
<i>Vibrio thalassae</i>	1,85	Aerobik	Deniz suyu	(83)
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,76	Aerobik	Deniz suyu	(72)
<i>Mesorhizobium composti</i>	1,59	Anaerobik	Kompost	(107)
<i>Marivivens donghaensis</i>	1,32	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Thalassobius litoralis</i>	1,23	Aerobik	Deniz suyu	(87)
<i>Pyruvatibacter mobilis</i>	1,06	Aerobik	Deniz suyu	(91)
<i>Tritonibacter mobilis</i>	0,97	Aerobik	Deniz suyu	(88)

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Pusillimonas ginsengisoli</i>	0,97	Aerobik	Toprak	(108)	
<i>Pedomicrobium manganicum</i>	0,97	Aerobik	Toprak	(92)	
<i>Mesorhizobium denitrificans</i>	0,88	Fakültatif	Atık su	(93)	
<i>Vibrio gallicus</i>	0,88	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(103)	
<i>Marteella lutitoris</i>	14,19	Aerobik	Deniz suyu	(67)	<b>BC - t2</b>
Diğer	14,19				
<i>Oleigrimonas citrea</i>	13,04	Aerobik	Deniz suyu	(109)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	10,73	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9,12	Anaerobik	Meyve/sebze üzerinde	(110)	
<i>Thalassospira australica</i>	7,00	Aerobik	Deniz suyu	(111)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	6,62	Aerobik	Deniz suyu	(68)	
<i>Salipiger profundus</i>	4,17	Aerobik	Deniz suyu	(90)	
<i>Thalassospira marina</i>	3,15	Aerobik	Deniz suyu	(112)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	2,25	Aerobik	Deniz suyu	(66)	

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Limimarinicola aestuariicola</i>	1,86	Aerobik	Deniz suyu	(113)
<i>Catenococcus thiocycli</i>	1,28	Anaerobik	Deniz suyu	(79)
<i>Halomonas halophila</i>	1,28	Aerobik	Soda gölü	(98)
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,09	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	1,09	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Tritonibacter mobilis</i>	1,09	Aerobik	Deniz suyu	(83)
<i>Vibrio hyugaensis</i>	1,03	Aerobik	Deniz suyu	(75)
<i>Vibrio gallicus</i>	0,90	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(98)
<i>Yangia pacifica</i>	0,83	Aerobik	Sediment	(114)
<i>Flavobacterium suaedae</i>	0,83	Aerobik	Bitki endofitik	(115)
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	0,77	Aerobik	Deniz suyu	(99)
<i>Shimia aquaeponi</i>	0,77	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Stappia stellulata</i>	0,77	Aerobik	Deniz suyu	(116)

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	0,64	Anaerobik	Deniz suyu	(117)	<b>BC - t3</b>
<i>Roseicyclus mahoneyensis</i>	0,64	Aerobik	Göl	(118)	
<i>Vibrio thalassae</i>	0,64	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
Diğer	30,95				
<i>Vibrio proteolyticus</i>	11,41	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	5,44	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Halomonas halophila</i>	5,05	Aerobik	Soda gölü	(93)	
<i>Terasakiella brassicae</i>	4,13	Aerobik	Atık su	(119)	
<i>Sunxiuqinia elliptica</i>	3,61	Aerobik	Deniz suyu	(120)	
<i>Terasakiella pusilla</i>	3,54	Anaerobik	Deniz suyu	(121)	
<i>Martelevella lutilitoris</i>	2,56	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Vibrio gallicus</i>	2,56	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(98)	
<i>Yangia pacifica</i>	2,10	Aerobik	Sediment	(109)	
<i>Vibrio thalassae</i>	1,77	Aerobik	Deniz suyu	(78)	

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,70	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Salipiger profundus</i>	1,70	Aerobik	Deniz suyu	(85)
<i>Flavimaricola marinus</i>	1,51	Anaerobik	Deniz suyu	(122)
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,51	Aerobik	Deniz suyu	(73)
<i>Henriciella pelagia</i>	1,44	Aerobik	Deniz suyu	(123)
<i>Maricaulis virginensis</i>	1,44	Aerobik	Deniz suyu	(97)
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,31	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Thalassospira australica</i>	1,31	Aerobik	Deniz suyu	(106)
<i>Muricauda ruestringensis</i>	1,25	Anaerobik	Deniz suyu	(124)
<i>Limimaricola aestuariicola</i>	1,11	Aerobik	Deniz suyu	(108)
<i>Muricauda taeensis</i>	1,11	Aerobik	Deniz suyu	(125)
<i>Cyclobacterium marinum</i>	1,11	Aerobik	Deniz suyu	(126)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1,05	Aerobik	Deniz suyu	(99)
<i>Thalassospira marina</i>	0,98	Aerobik	Deniz suyu	(107)

Çizelge 5.5. (devam)

<i>Feifantangia zhejiangensis</i>	0,98	Aerobik	Deniz suyu	(127)
<i>Carboxylicivirga linearis</i>	0,98	Anaerobik	Deniz suyu	(91)
<i>Muricauda zhangzhouensis</i>	0,79	Aerobik	Deniz suyu	(128)
<i>Carboxylicivirga taeanensis</i>	0,72	Aerobik	Deniz suyu	(86)
<i>Arenibacter algicola</i>	0,72	Aerobik	Deniz suyu	(129)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,72	Aerobik	Genel	(130)
<i>Catenococcus thiocycli</i>	0,72	Anaerobik	Deniz suyu	(79)
<i>Muricauda olearia</i>	0,72	Aerobik	Deniz suyu	(131)
<i>Paracoccus indicus</i>	0,66	Aerobik	Deniz suyu	(132)
<i>Flavobacterium suaedae</i>	0,66	Aerobik	Bitki endofitik	(110)
<i>Aestuariivivens insulae</i>	0,66	Aerobik	Deniz suyu	(133)

Çizelge 5.6. BT biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili

<b>BAKTERİ TÜRÜ</b>	<b>ORA N</b>	<b>SOLUNU M</b>	<b>EKOLOJİ</b>	<b>REFERANS</b>	<b>ZAMA N</b>
<i>Catenovulum maritimum</i>	25,54	Aerobik	Sediment	(64)	BT - t0
Diğer	20,54				
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	16,89	Aerobik	Sediment	(65)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	8,09	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	5,15	Aerobik	Deniz suyu	(70)	
<i>Marinobacterium marisflavi</i>	3,97	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Litorisediminiviven s gilvus</i>	2,54	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2,14	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,90	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i>	1,82	Aerobik	Deniz suyu	(134)	
<i>Polaribacter lacunae</i>	1,74	Aerobik	Deniz suyu	(69)	

Çizelge 5.6. (devam)

<i>Leisingera aquaemixtae</i>	1,59	Aerobik	Deniz suyu	(74)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,19	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Alteromonas mediterranea</i>	1,19	Aerobik	Deniz suyu	(76)	
<i>Sinusalibacter lacisalsi</i>	1,19	Aerobik	Tuzlu göl, sediment	(75)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	1,03	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	1,03	Aerobik	Deniz suyu	(99)	
<i>Vibrio xuii</i>	0,87	Aerobik	Karides yetiştiriciliği suyu	(73)	
<i>Alteromonas oceani</i>	0,79	Aerobik	Derin deniz sedimenti	(79)	
<i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	0,79	Aerobik	Deniz suyu	(135)	
Diğer	31,74				BT - t1
<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>	13,73	Aerobik	Deniz suyu	(86)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	10,20	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	

Çizelge 5.6. (devam)

<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	9,57	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	8,56	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Marivita roseacus</i>	3,90	Aerobik	Deniz suyu	(80)	
<i>Marivita geojedonensis</i>	3,53	Aerobik	Deniz suyu	(106)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	2,90	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Ruegeria sediminis</i>	2,39	Aerobik	Deniz suyu	(136)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2,39	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Aliishimia ponticola</i>	2,27	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Mesorhizobium denitrificans</i>	2,14	Fakültatif	Atık su	(88)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	2,02	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	1,76	Aerobik	Deniz suyu	(99)	
<i>Thalassobius litoralis</i>	1,64	Aerobik	Deniz suyu	(82)	
<i>Balneola vulgaris</i>	1,26	Aerobik	Deniz suyu	(137)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	24,66	Aerobik	Deniz suyu	(63)	BT - t2
Diğer	16,24				

Çizelge 5.6. (devam)

<i>Thalassospira australica</i>	14,80	Aerobik	Deniz suyu	(106)	
<i>Marteella lutitioris</i>	13,69	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Thalassospira marina</i>	6,55	Aerobik	Deniz suyu	(107)	
<i>Vibrio thalassae</i>	5,95	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	4,68	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	4,17	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Vibrio gallicus</i>	3,91	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(98)	
<i>Litoreaibacter ponti</i>	1,36	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Winogradskyella algicola</i>	1,19	Aerobik	Deniz suyu	(138)	
<i>Iodidimonas muriae</i>	1,02	Aerobik	Doğal gaz tesisi	(139)	
<i>Flavobacterium suaedae</i>	0,94	Aerobik	Bitki endofitik	(110)	
<i>Nioella nitratireducens</i>	0,85	Aerobik	Deniz suyu	(95)	
Diğer	42,98				BT - t3
<i>Vibrio proteolyticus</i>	6,69	Aerobik	Deniz suyu	(63)	

Çizelge 5.6. (devam)

<i>Feifantangia zhejiangensis</i>	5,92	Aerobik	Deniz suyu	(122)
<i>Halomonas halophila</i>	5,70	Aerobik	Soda gölü	(93)
<i>Thalassospira australica</i>	3,40	Aerobik	Deniz suyu	(106)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	3,29	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Vibrio hyugaensis</i>	3,18	Aerobik	Deniz suyu	(75)
<i>Thalassospira marina</i>	3,18	Aerobik	Deniz suyu	(107)
<i>Maricaulis virginensis</i>	3,07	Aerobik	Deniz suyu	(92)
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	2,63	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,63	Aerobik	Deniz suyu	(94)
<i>Sinirhodobacter hankyongi</i>	2,63	Aerobik	Çamur	(140)
<i>Terasakiella brassicae</i>	1,54	Aerobik	Atık su	(114)
<i>Yangia pacifica</i>	1,54	Aerobik	Sediment	(109)
<i>Paracoccus indicus</i>	1,54	Aerobik	Deniz suyu	(127)
<i>Salipiger profundus</i>	1,54	Aerobik	Deniz suyu	(85)

Çizelge 5.6. (devam)

<i>Aestuariivivens insulae</i>	1,43	Aerobik	Deniz suyu	(128)
<i>Muricauda ruestringensis</i>	1,32	Anaerobik	Deniz suyu	(119)
<i>Aliishimia ponticola</i>	1,21	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Henriciella pelagia</i>	1,21	Aerobik	Deniz suyu	(118)
<i>Limimanicola aestuariicola</i>	1,21	Aerobik	Deniz suyu	(108)
<i>Catenococcus thiocycli</i>	1,10	Anaerobik	Deniz suyu	(79)
<i>Cyclobacterium marinum</i>	1,10	Aerobik	Deniz suyu	(121)

Çizelge 5.7. . P biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili

BAKTERİ TÜRÜ	ORA N	SOLUNU M	EKOLOJİ	REFERAN S	ZAMA N
Diğer	33,98				<b>P - t0</b>
<i>Catenovulum maritimum</i>	31,33	Aerobik	Sediment	(59)	
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	14,94	Aerobik	Sediment	(129)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	7,47	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Marinobacterium marisflavi</i>	3,37	Aerobik	Deniz suyu	(62)	
<i>Polaribacter lacunae</i>	3,37	Aerobik	Deniz suyu	(64)	
<i>Litorisediminiviven s gilvus</i>	3,13	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	2,41	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
Diğer	32,31				<b>P - t1</b>
<i>Vibrio hyugaensis</i>	17,92	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	16,08	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	
<i>Terasakiella brassicae</i>	10,41	Aerobik	Atık su	(114)	

Çizelge 5.7. (devam)

<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>	6,58	Aerobik	Deniz suyu	(81)	
<i>Malaciobacter pacificus</i>	5,05	Anaerobik	Deniz suyu	(141)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,76	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Halodesulfovibrio oceani</i>	2,30	Anaerobik	Deniz suyu	(142)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1,99	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Delftia rhizosphaerae</i>	1,53	Aerobik	Cistus ladanifer rizosferi	(143)	
<i>Ilumatobacter fluminis</i>	1,53	Aerobik	Deniz kıyısı kumu	(144)	
<i>Marivita geojedonensis</i>	1,53	Aerobik	Deniz suyu	(101)	
<i>Martelevilla lutilitoris</i>	22,41	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	21,17	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
Diğer	16,47				
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	5,85	Aerobik	Deniz suyu	(99)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	4,78	Aerobik	Deniz suyu	(63)	

Çizelge 5.7. (devam)

<i>Catenococcus thiocyli</i>	4,25	Anaerobik	Deniz suyu	(79)
<i>Flavobacterium suaedae</i>	4,16	Aerobik	Bitki endofitik	(110)
<i>Vibrio hyugaensis</i>	2,92	Aerobik	Deniz suyu	(75)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,83	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Amylibacter lutimaris</i>	1,86	Aerobik	Deniz suyu	(145)
<i>Stappia stellulata</i>	1,86	Aerobik	Deniz suyu	(111)
<i>Shimia aquaeponi</i>	1,77	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Salipiger profundus</i>	1,68	Aerobik	Deniz suyu	(85)
<i>Limimaricola aestuariicola</i>	1,51	Aerobik	Deniz suyu	(108)
<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	1,06	Aerobik	Sediment	(115)
<i>Aliishimia ponticola</i>	0,97	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Oleigrimonas citrea</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(104)
<i>Vibrio gallicus</i>	0,89	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(98)

Çizelge 5.7. (devam)

<i>Monaibacterium marinum</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(146)	P - t3
<i>Shimia biformata</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(147)	
<i>Vibrio thalassae</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(78)	
Diğer	39,32				
<i>Litoreibacter ponti</i>	12,57	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	7,33	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Terasakiella brassicae</i>	5,96	Anaerobik	Deniz suyu	(116)	
<i>Sunxiuqinia elliptica</i>	3,71	Aerobik	Deniz suyu	(115)	
<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	3,22	Aerobik	Sediment	(115)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,01	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Halodesulfovibrio oceani</i>	1,77	Anaerobik	Deniz suyu	(138)	
<i>Carboxylicivirgataeanaensis</i>	1,69	Aerobik	Deniz suyu	(86)	
<i>Muricauda ruestringensis</i>	1,45	Anaerobik	Deniz suyu	(119)	
<i>Henriciella pelagia</i>	1,37	Aerobik	Deniz suyu	(118)	

Çizelge 5.7. (devam)

<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,29	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Marinifilum albidiflavum</i>	1,21	Anaerobik	Deniz suyu	(148)
<i>Roseicyclus mahoneyensis</i>	1,21	Aerobik	Göl	(113)
<i>Marteella lutilitoris</i>	1,05	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Henriciella algicola</i>	1,05	Aerobik	Deniz suyu	(101)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1,05	Aerobik	Deniz suyu	(94)
<i>Tritonibacter mobilis</i>	1,05	Aerobik	Deniz suyu	(83)
<i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i>	1,05	Anaerobik	Deniz suyu	(142)
<i>Aliishimia ponticola</i>	0,97	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Arenibacter algicola</i>	0,97	Aerobik	Deniz suyu	(124)
<i>Vibrio gallicus</i>	0,97	Anaerobik	<i>Haliotis tuberculata</i> bağırsağı	(103)
<i>Petrocella atlantisensis</i>	0,97	Anaerobik	Deniz suyu	(149)
<i>Malaciobacter pacificus</i>	0,89	Anaerobik	Deniz suyu	(99)

Çizelge 5.7. (devam)

<i>Salipiger profundus</i>	0,89	Aerobik	Deniz suyu	(85)
<i>Flavobacterium suaedae</i>	0,89	Aerobik	Bitki endofitik	(110)
<i>Cognatishimia maritima</i>	0,89	Aerobik	Sediment	(59)
<i>Defluviimonas aestuarii</i>	0,81	Aerobik	Deniz suyu	(150)
<i>Yangia pacifica</i>	0,81	Aerobik	Sediment	(109)
<i>Halomonas halophila</i>	0,81	Aerobik	Soda gölü	(93)
<i>Neptuniibacter caesariensis</i>	0,81	Aerobik	Deniz suyu	(90)

Çizelge 5.8. O biyoyumak denemesi sistemi tür düzeyinde taksonomik profili

BAKTERİ TÜRÜ	ORAN	SOLUNUM	EKOLOJİ	REFERANS	ZAMAN
<i>Catenovulum maritimum</i>	33,93	Aerobik	Sediment	(59)	O -t0
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	22,74	Aerobik	Sediment	(129)	
Diğer	18,14				
<i>Shimia aquaeponi</i>	4,70	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Pseudoalteromonas gelatinilytica</i>	3,20	Aerobik	Deniz suyu	(65)	
<i>Polaribacter lacunae</i>	2,16	Aerobik	Deniz suyu	(64)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	2,16	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	1,88	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Marinobacterium marisflavi</i>	1,79	Aerobik	Deniz suyu	(62)	
<i>Pseudoalteromonas peptidolytica</i>	1,50	Aerobik	Deniz suyu	(130)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,32	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>	1,22	Aerobik	Deniz suyu	(81)	

Çizelge 5.8. (devam)

<i>Aliishimia ponticola</i>	1,22	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1,13	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	1,03	Aerobik	Deniz suyu	(82)	
<i>Jiulongibacter sediminis</i>	0,94	Aerobik	Deniz suyu	(99)	
<i>Leisingera aquaemixtae</i>	0,94	Aerobik	Deniz suyu	(69)	
Diğer	48,33				O - t1
<i>Kinneretia asaccharophila</i>	13,35	Aerobik	Göl	(151)	
<i>Terasakiella brassicae</i>	11,63	Aerobik	Atık su	(114)	
<i>Marivita roseacus</i>	5,06	Aerobik	Deniz suyu	(80)	
<i>Marivita geojedonensis</i>	4,09	Aerobik	Deniz suyu	(101)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	3,88	Aerobik	Sediment	(59)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	3,34	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	2,69	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Halodesulfovibrio oceani</i>	2,37	Anaerobik	Deniz suyu	(138)	

Çizelge 5.8. (devam)

<i>Thalassobius litoralis</i>	1,61	Aerobik	Deniz suyu	(82)	
<i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i>	1,29	Anaerobik	Deniz suyu	(138)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1,29	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>LentilactoBacillus kefiri</i>	1,08	Anaerobik	Kefir	(152)	
Diğer	29,33				O - t2
<i>Oleigrimonas citrea</i>	26,72	Aerobik	Deniz suyu	(104)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	14,72	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Catenococcus thiocycli</i>	13,85	Anaerobik	Deniz suyu	(79)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4,36	Anaerobik	Meyve/sebze üzerinde	(105)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	2,07	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Shimia aquaeponi</i>	1,96	Aerobik	Deniz suyu	(61)	
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,64	Aerobik	Deniz suyu	(73)	
<i>Thalassospira australica</i>	1,53	Aerobik	Deniz suyu	(106)	
<i>Halodesulfovibrio spirochaetisodalis</i>	1,42	Anaerobik	Deniz suyu	(138)	

Çizelge 5.8. (devam)

<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	1,31	Aerobik	Deniz suyu	(66)	
<i>Salipiger profundus</i>	1,09	Aerobik	Deniz suyu	(85)	
Diğer	31,91				
<i>Carboxylicivirga taeanensis</i>	7,11	Aerobik	Deniz suyu	(86)	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	4,81	Aerobik	Deniz suyu	(63)	
<i>Sunxiuqinia elliptica</i>	4,00	Aerobik	Deniz suyu	(115)	
<i>Halomonas halophila</i>	3,66	Aerobik	Soda gölü	(93)	
<i>Salipiger profundus</i>	3,59	Aerobik	Deniz suyu	(85)	
<i>Vibrio hyugaensis</i>	3,25	Aerobik	Deniz suyu	(75)	
<i>Aestuariivivens insulae</i>	2,44	Aerobik	Deniz suyu	(128)	
<i>Thalassospira australica</i>	2,37	Aerobik	Deniz suyu	(106)	
<i>Muricauda ruestringensis</i>	1,96	Anaerobik	Deniz suyu	(119)	
<i>Sulfitobacter sabulilitoris</i>	1,83	Aerobik	Deniz suyu	(67)	
<i>Marinifilum albidiflavum</i>	1,69	Anaerobik	Deniz suyu	(144)	
					O -t3

Çizelge 5.8. (devam)

<i>Cyclobacterium marinum</i>	1,69	Aerobik	Deniz suyu	(121)
<i>Sinirhodobacter hankyongi</i>	1,63	Aerobik	Çamur	(140)
<i>Catenococcus thiocyli</i>	1,56	Anaerobik	Deniz suyu	(86)
<i>Litorisediminivivens gilvus</i>	1,36	Aerobik	Deniz suyu	(66)
<i>Marinobacter nauticus</i>	1,36	Aerobik	Deniz suyu	(153)
<i>Paracoccus indicus</i>	1,15	Aerobik	Deniz suyu	(127)
<i>Henriciella pelagia</i>	1,08	Aerobik	Deniz suyu	(118)
<i>Terasakiella brassicae</i>	1,08	Aerobik	Atık su	(114)
<i>Vibrio thalassae</i>	1,08	Aerobik	Deniz suyu	(78)
<i>Feifantangia zhejiangensis</i>	1,02	Aerobik	Deniz suyu	(122)
<i>Carboxylicivirga linearis</i>	1,02	Anaerobik	Deniz suyu	(86)
<i>Litoreibacter ponti</i>	1,02	Aerobik	Deniz suyu	(73)
<i>Muricauda olearia</i>	1,02	Aerobik	Deniz suyu	(126)

Çizelge 5.8. (devam)

<i>Petrocella atlantisensis</i>	1,02	Anaerobik	Deniz suyu	(145)
<i>Alkaliphilus namsaraevii</i>	1,02	Anaerobik	Soda gölü	(154)
<i>Marteella lutilitoris</i>	0,95	Aerobik	Deniz suyu	(67)
<i>Aliishimia ponticola</i>	0,95	Aerobik	Deniz suyu	(61)
<i>Nioella nitratireducens</i>	0,95	Aerobik	Deniz suyu	(90)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,95	Aerobik	Deniz suyu	(94)
<i>Thalassospira marina</i>	0,95	Aerobik	Deniz suyu	(107)
<i>Vibrio gallicus</i>	0,88	Anaerobik	<i>Halotis tuberculata</i> bağırsağı	(98)
<i>Vibrio hangzhouensis</i>	0,88	Aerobik	Sediment	(155)
<i>Devosia marina</i>	0,81	Aerobik	Derin deniz suyu	(156)
<i>Defluviimonas aestuarii</i>	0,81	Aerobik	Deniz suyu	(146)
<i>Muricauda taeanensis</i>	0,81	Aerobik	Deniz suyu	(120)

Çizelge 5.8. (devam)

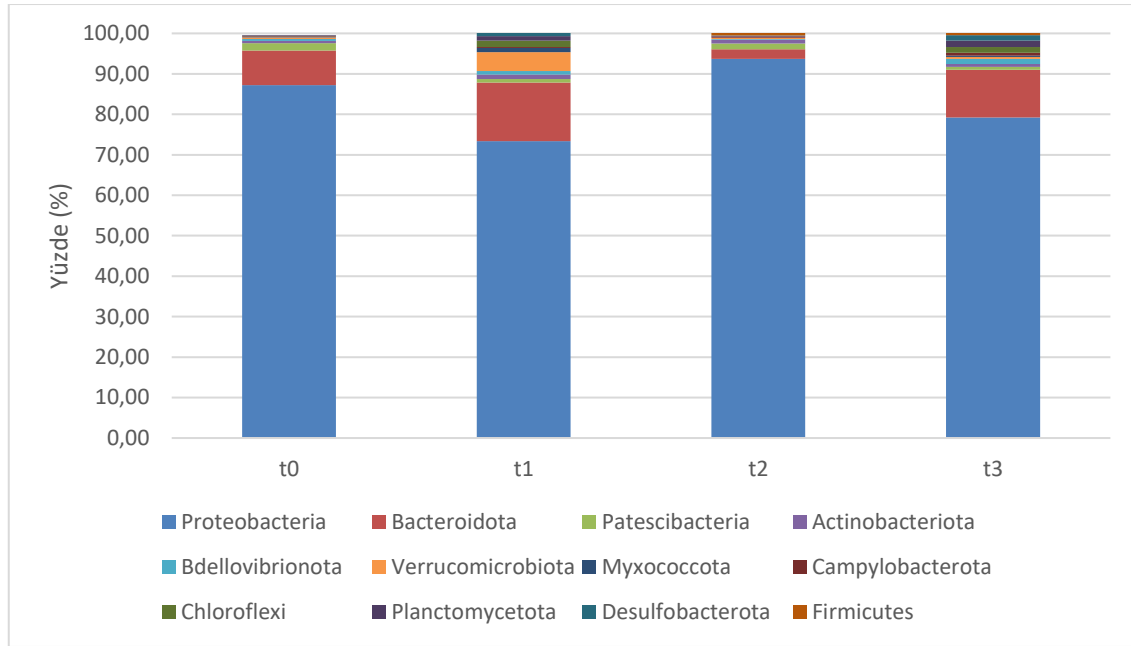
<i>Limimanicola aestuariicola</i>	0,75	Aerobik	Deniz suyu	(108)
<i>Roseivirga spongicola</i>	0,75	Aerobik	Deniz suyu	(157)
<i>Yangia pacifica</i>	0,75	Aerobik	Sediment	(109)
<i>Cohaesibacter marisflavi</i>	0,75	Aerobik	Sediment	(115)
<i>Alteromonas mediterranea</i>	0,68	Aerobik	Deniz suyu	(71)
<i>Maricaulis virginensis</i>	0,68	Aerobik	Deniz suyu	(92)

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

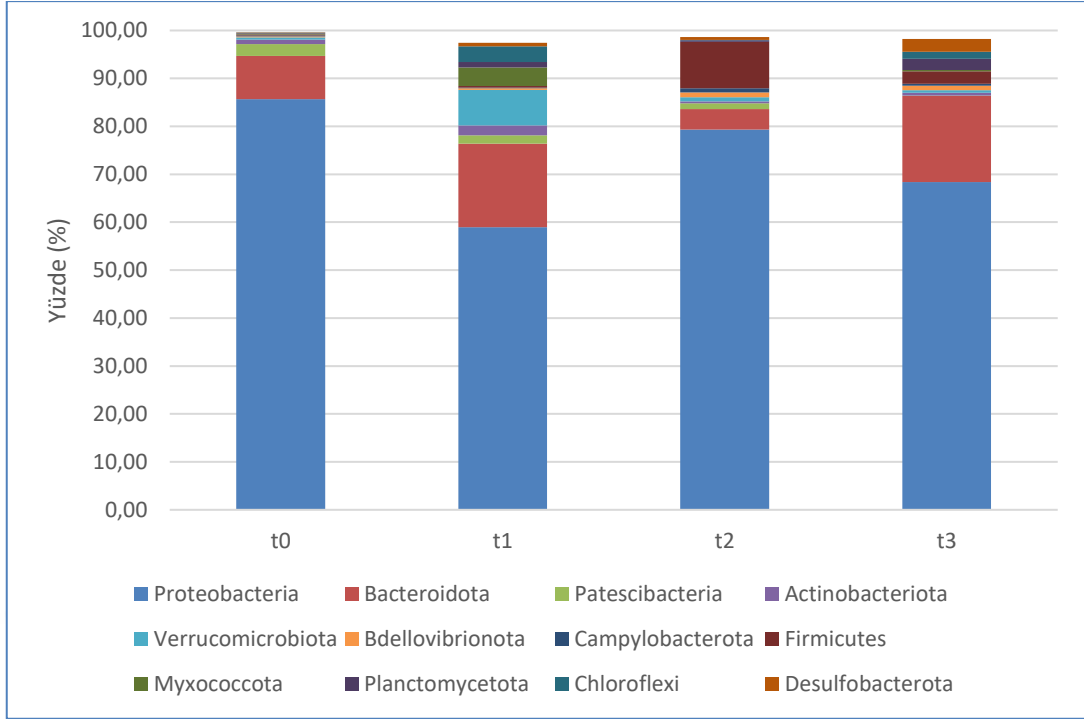
#### 6.1.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI

##### 6.1.1.1. Filum Düzeyinde Taksonomik Profil



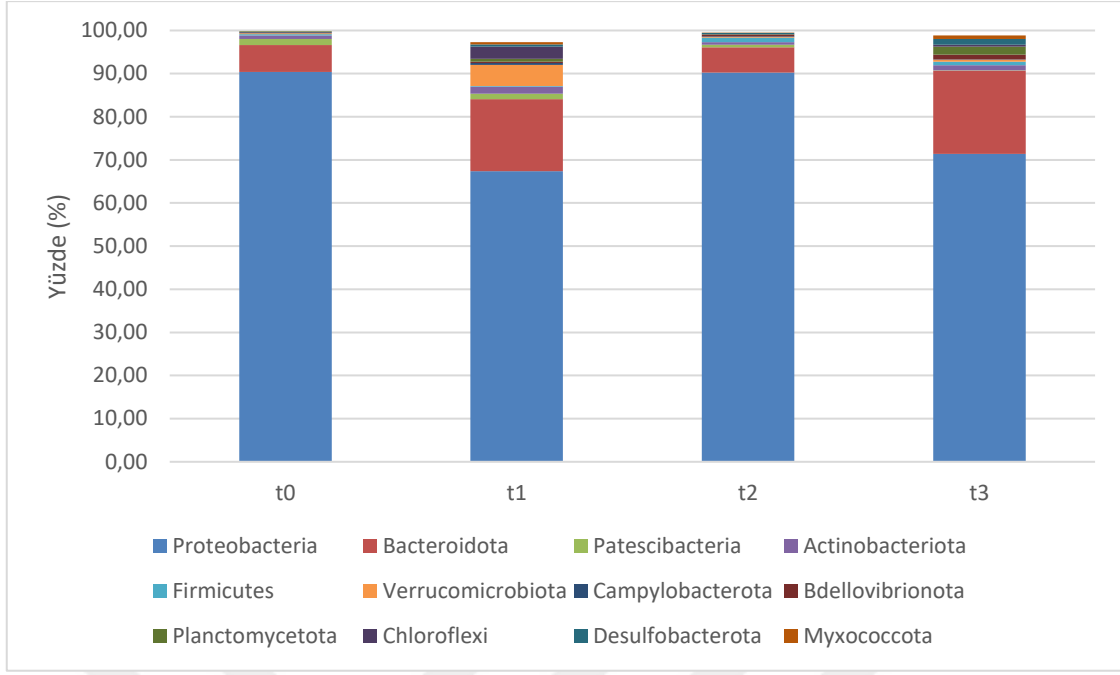
Şekil 6.1. Probiyotik katkısı yapılmamış (K) biyoyumak zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi

Probiyotik katkısı yapılmamış (K) biyoyumak sisteminde 29 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında Proteobacteria (%73,40-%93,70), Bacteroidota (%2,42-%14,47) ve Patescibacteria (%0,88– 1,79) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir.



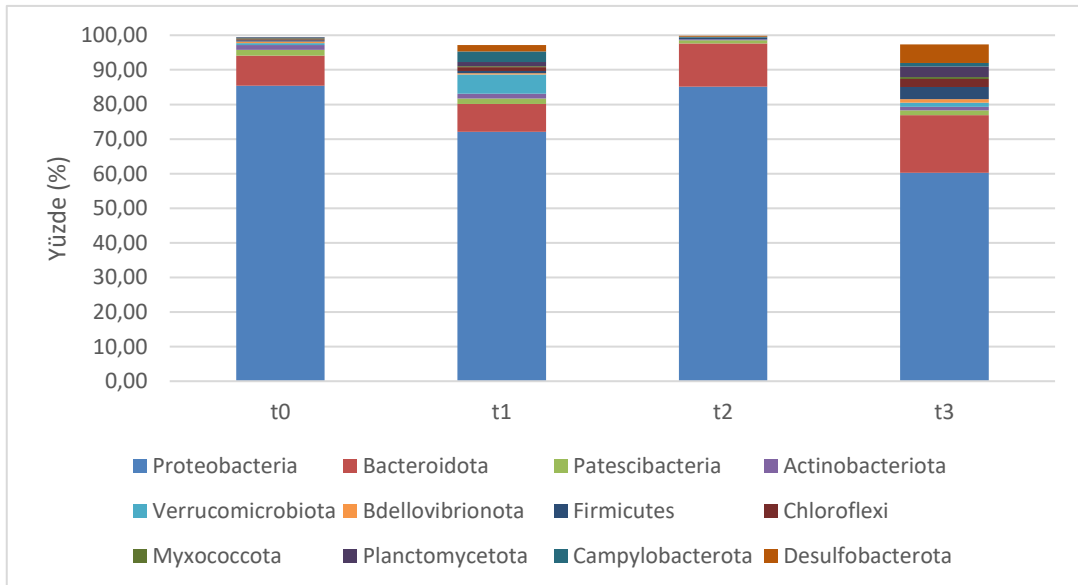
Şekil 6.2. *Bacillus cereus* katkısı yapılmış (BC) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi

*Bacillus cereus* katkısı yapılmış (BC) biyoyumak sisteminde 33 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında Proteobacteria (%58,96-%85,70), Bacteroidota (%4,27 - %17,94) ve Patescibacteria (%0,08 – 2,48) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir.



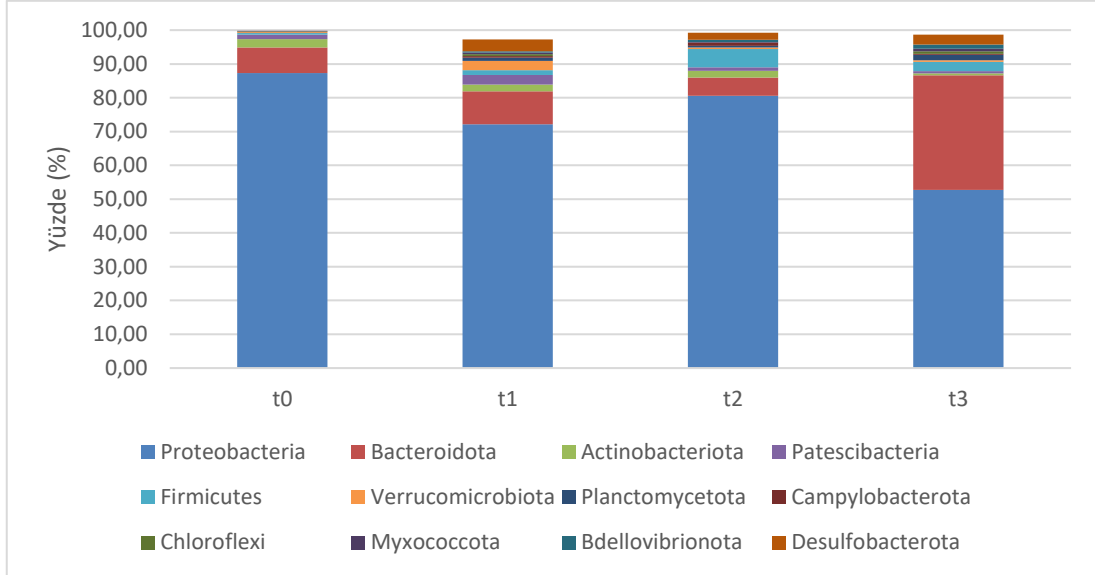
Şekil 6.3. *Bacillus thuringiensis* katkısı yapılmış (BT) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi

*Bacillus thuringiensis* katkısı yapılmış (BT) biyoyumak sisteminde 30 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında Proteobacteria (%67,40-%90,42), Bacteroidota (%5,84- %19,28) ve Patescibacteria (%0,08 – 1,38) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.4. Probiomax katkısı yapılmış (P) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi

Probiomax katkısı yapılmış (P) biyoyumak sisteminde 30 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında Proteobacteria (%60,27-%85,45), Bacteroidota (%8,07-%16,67) ve Patescibacteria (%0,92– 1,67) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6.5. OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak grubunun zamana bağlı filum düzeyinde OTU değişimi

OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak sisteminde 30 farklı bakteri filumu tespit edilmiştir. Bu filumlar arasında Proteobacteria (%52,77-%87,30), Bacteroidota (%5,42-%33,84) ve Patescibacteria (%0,56– 2,45) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir.

Genel itibari ile tüm biyoyumak deneme gruplarında Proteobacteria (%52,77 - %93,70), Bacteroidota (%2,42 - %33,84) ve Patescibacteria (%0,08 - 2,48) en baskın filumlar olarak tespit edilmiştir. Proteobacteria filumu sucul sistemlerde, karides ve tilapya yetiştiriciliği yapılan biyoyumak sistemlerinde ve yetiştirme sularında, biyofilmlerde ve devridaim yapılan su sistemlerinde genellikle en baskın filum olduğu çeşitli çalışmalarca gösterilmiştir (158), (159), (160). Çalışmanın başında (t0) tüm biyoyumak deneme gruplarında Proteobacteria'nın en yüksek oranda varlık göstermesi bu filumun doğal deniz ortamlarında en sık görülen filum olması ile tutarlı bir sonuç olarak yorumlanmaktadır. Okyanuslarda bu filuma ait türler toplam bakteriyel biyokütlenin %79'unu oluştururken tatlısularında bu oran %40 oranına düşmektedir (161), tüm biyoyumak deneme gruplarında deniz suyu kullanılması bu veriyi desteklemektedir. Proteobacteria türlerinin metabolik enerji elde edebilecek çeşitli yolları bulunmaktadır. Bunlar arasında fototofik, kemotofik ve kemoganotropik yollar en yaygın olan enerji metabolizması yollarıdır (162) bu sayede

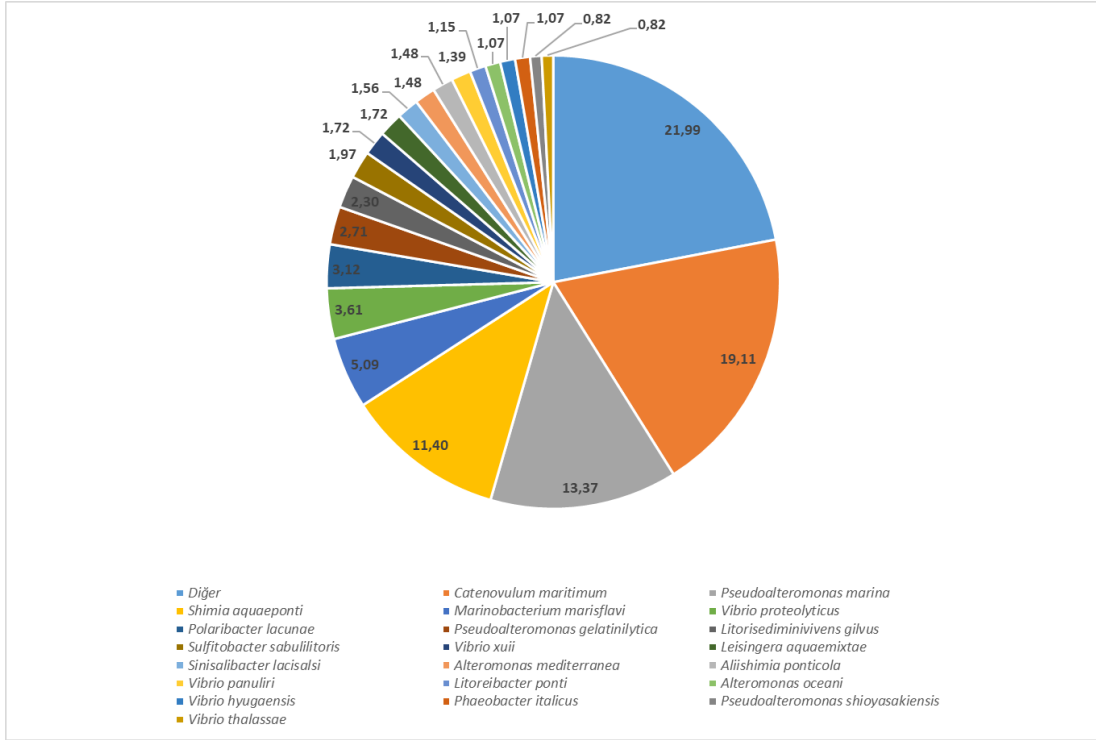
atık sularında tekrar değerlendirilmesi ve su ürünleri yetiştiriciliği sistemine kazandırılmasını hedefleyen biyoyumak sistemlerinde bu filum besin döngüsü ve organik bileşiklerin geri kazandırılması özelliği ile önemli rol oynamaktadır.

Tüm biyoyumak deneme gruplarında en baskın bulunan ikinci filum Bacteroidota'nın probiyotik ilavesi ile sürdürülen farklı biyoyumak çalışmalarında da Proteobacteria'dan sonra en baskın filum olarak tespit edildiği rapor edilmiştir (159). Doğal denizel sistemlerde total bakteriyal çeşitliliğin yaklaşık %8-9'unu temsil eden bu filumun organik materyal oranının oldukça yüksek olduğu nemli toprak gibi çevrelerde çeşitliliğinin %19'a ulaştığı rapor edilmiştir (161). Kontrol biyoyumak sistemi dışında diğer tüm sistemlerde çalışmanın başlangıcında (t0) bu filumun görece bolluğunun doğal sistemler ile benzer olup (%6,22 – %9,55) çalışmanın sonunda (t3) en yüksek orana (%16,67 - %33,84) ulaşması sistemlerdeki organik madde miktarının Şekil 5.1.'de gösterildiği gibi maksimum seviyeye ulaşması ile açıklanabilir.

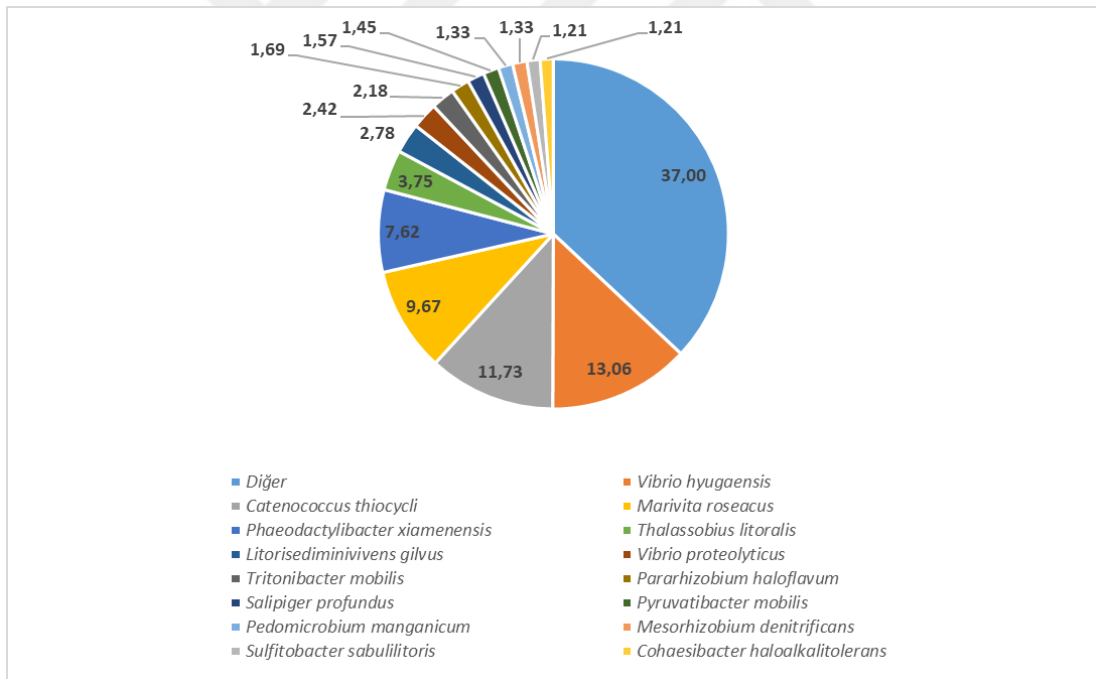
#### **6.1.1.2. Tür Düzeyinde Taksonomik Profil**

Her bir biyoyumak deneme grubunun içerdiği tür bilgileri tespit edilmiş ve bu türlerin toplam bakteriyal çeşitlilik içerisindeki oranları hesaplanarak %0,5'lik eşik değerinin üzerindeki türler tablo haline getirilmiş ve %0,5'lik oranın altındaki bakteri türleri ise 'diğer' olarak adlandırılmıştır.

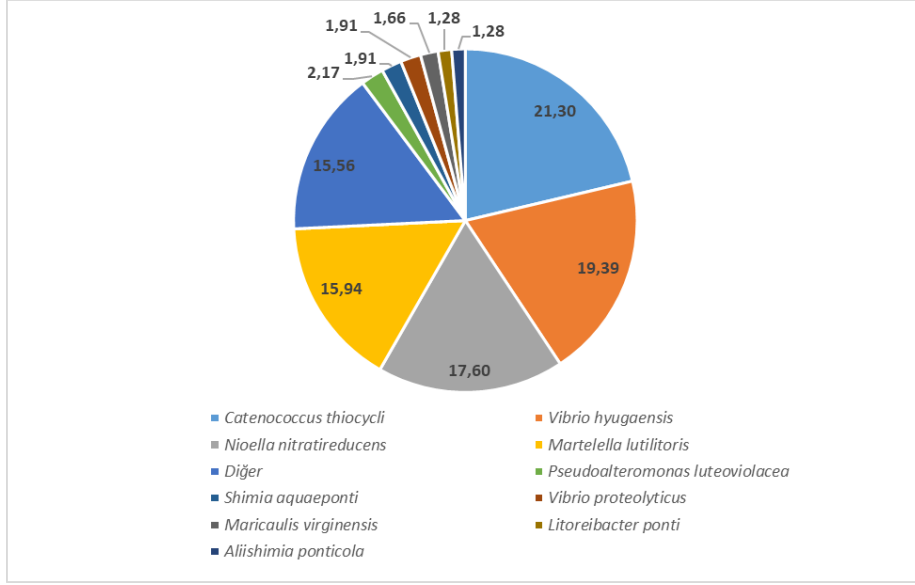
Tablolarda gösterilen %0,5 oranı üzerindeki bakterilerin neredeyse tamamının denizel kökenli, Gram (-) ve aerobik bakterilerden oluştuğu görülmüştür.



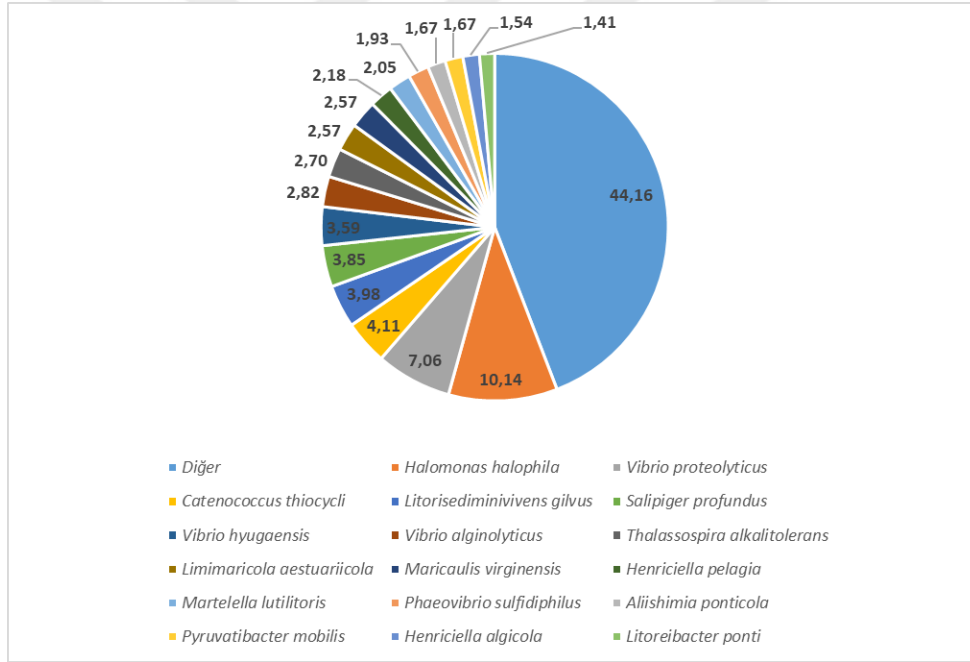
Şekil 6.6. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t0)



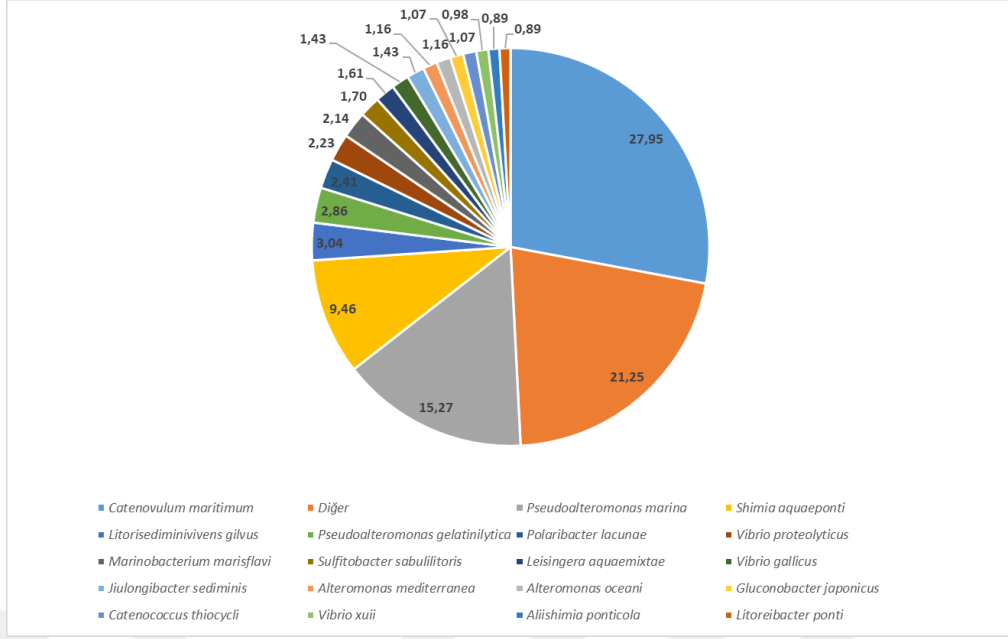
Şekil 6.7. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t1)



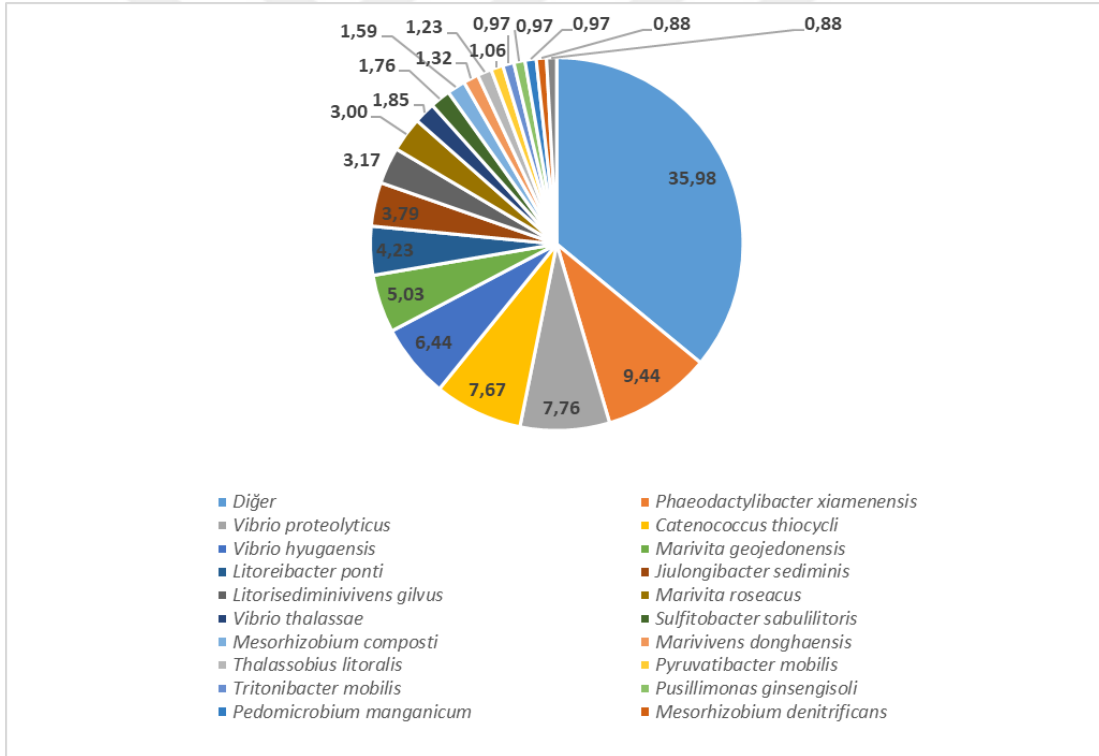
Şekil 6.8. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t2)



Şekil 6.9. Probiyotik Katkısı Yapılmayan Kontrol (K) Biyoyumak Grubu (t3)

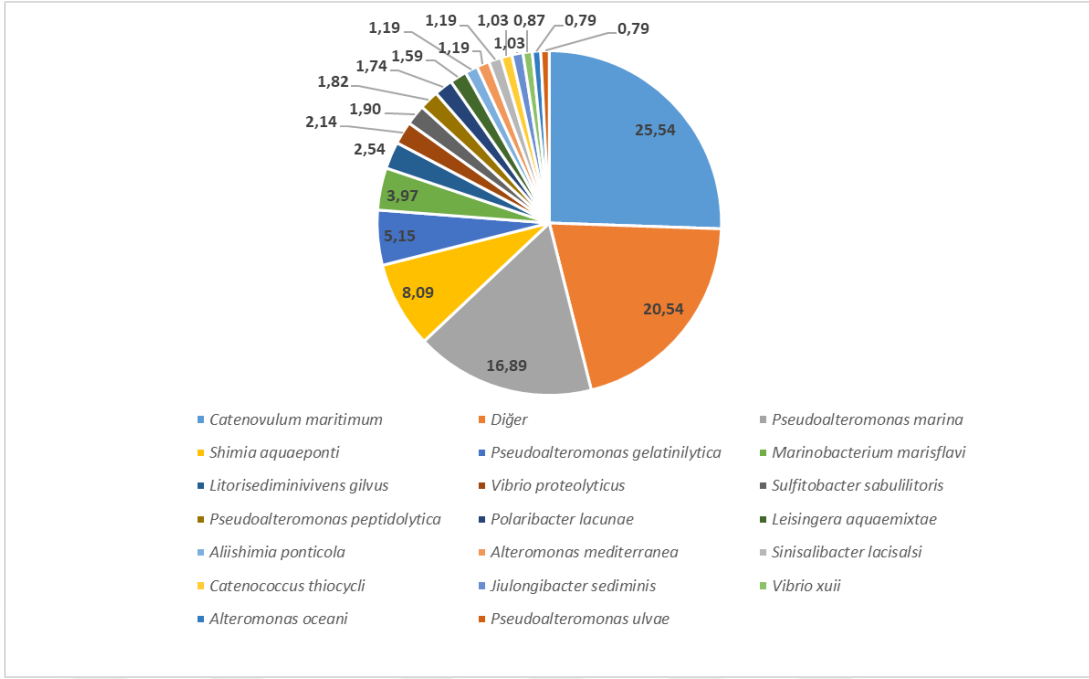


Şekil 6.10. *Bacillus cereus* Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t0)

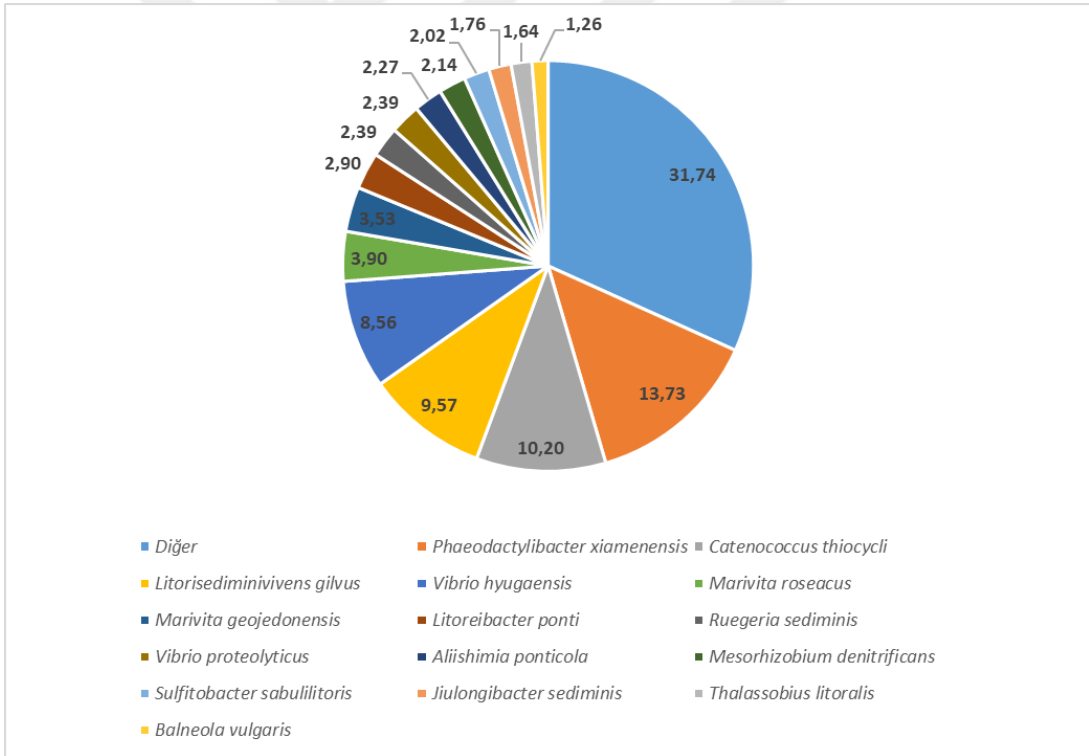


Şekil 6.11. *Bacillus cereus* Katkısı Yapılmış (BC) Biyoyumak Grubu (t1)

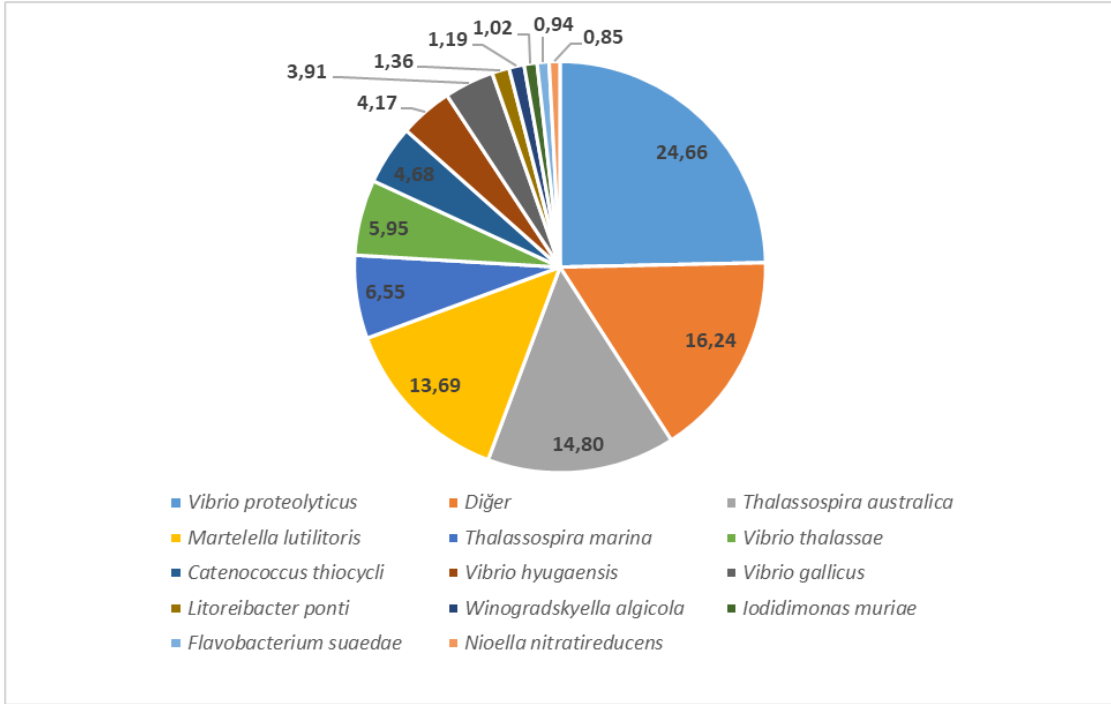




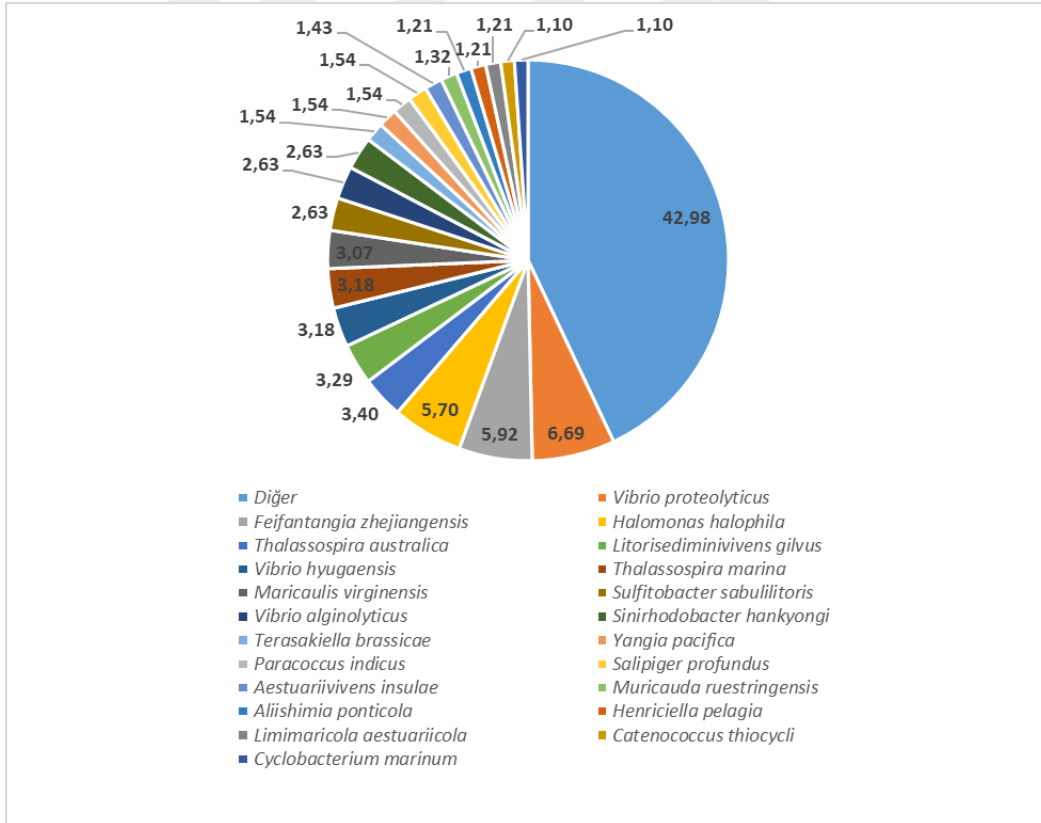
Şekil 6.14. *Bacillus thuringiensis* Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t0)



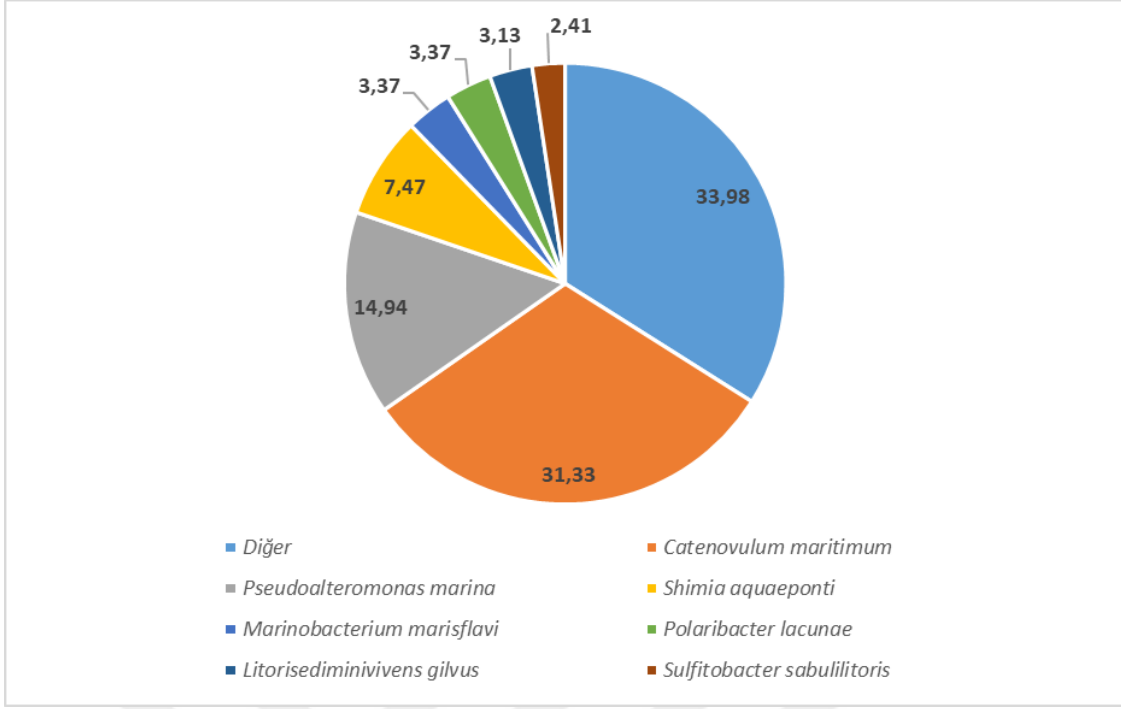
Şekil 6.15. *Bacillus thuringiensis* Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t1)



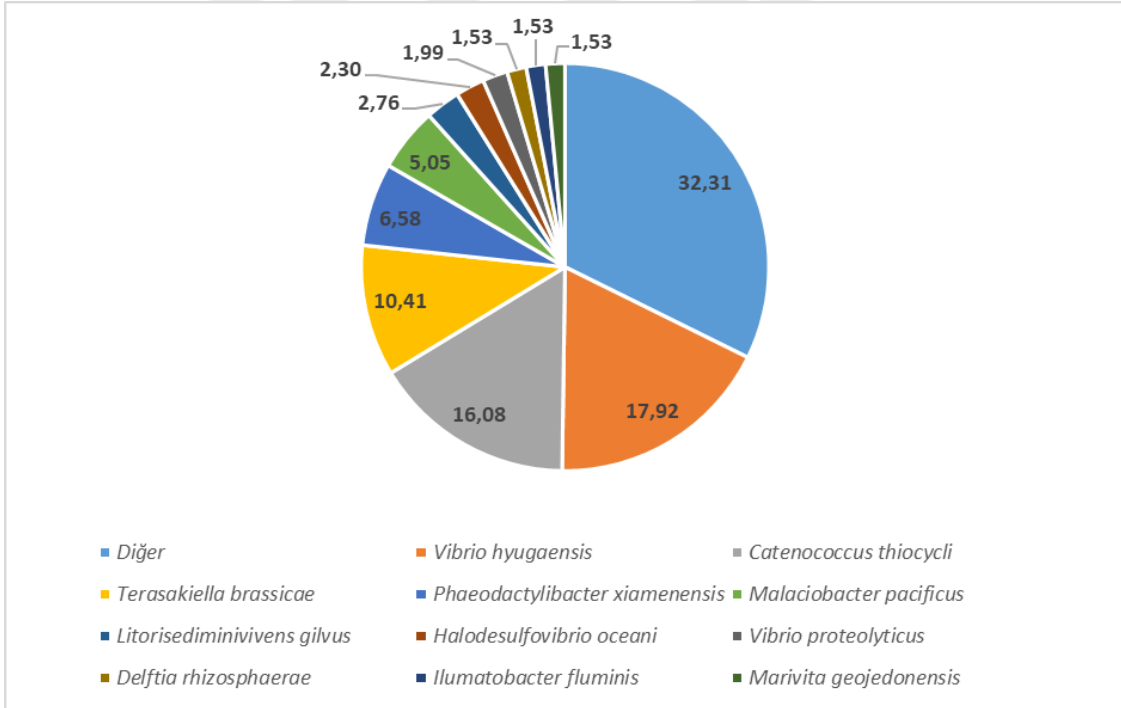
Şekil 6.16. *Bacillus thuringiensis* Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t2)



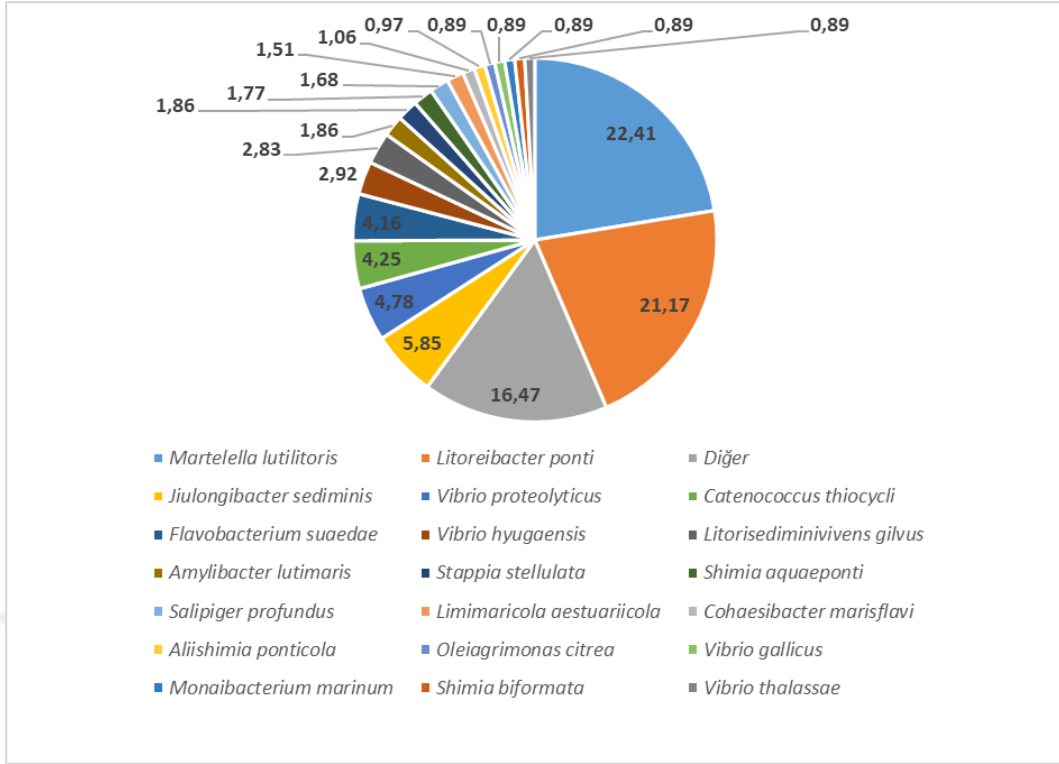
Şekil 6.17. *Bacillus thuringiensis* Katkısı Yapılmış (BT) Biyoyumak Grubu (t3)



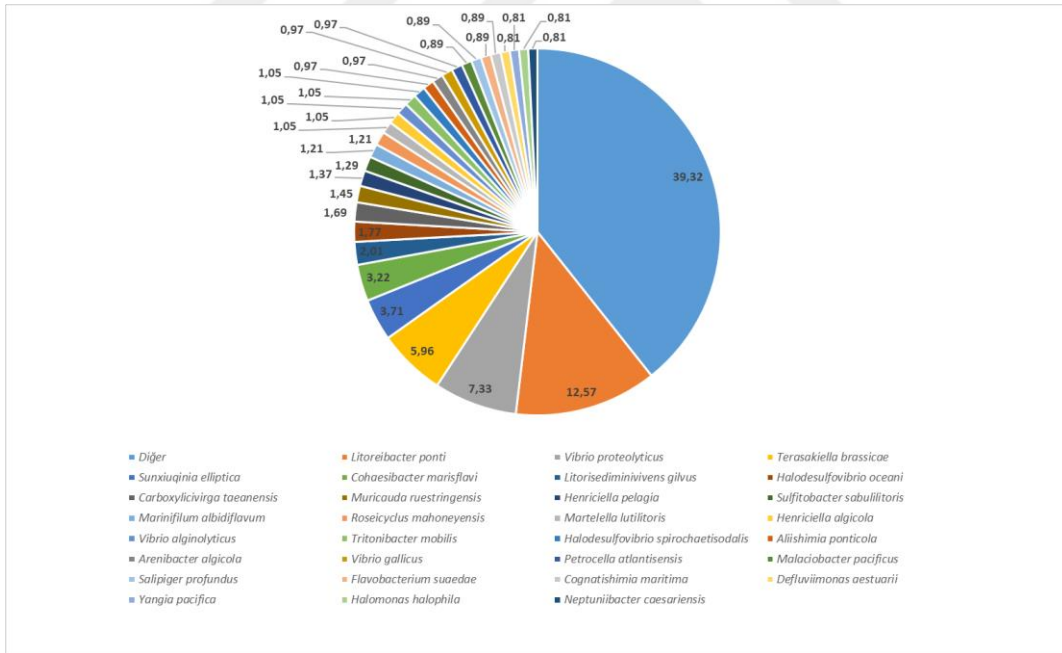
Şekil 6.18. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t0)



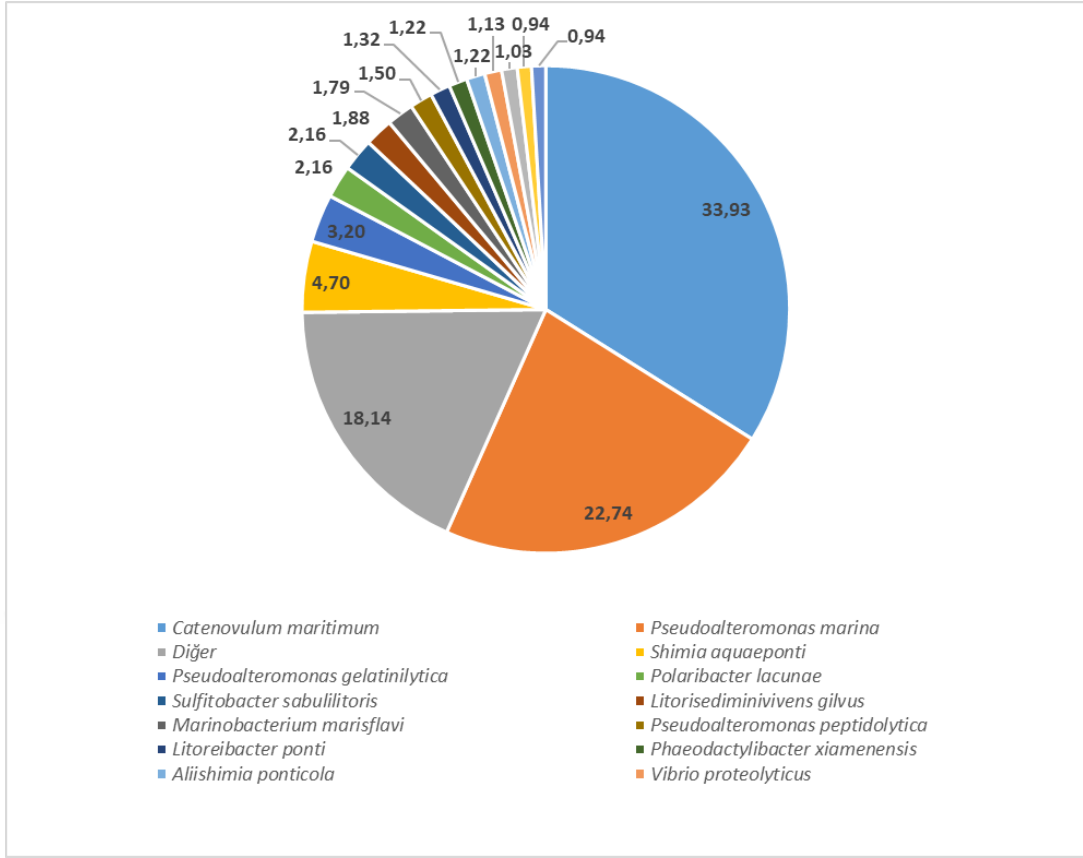
Şekil 6.19. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t1)



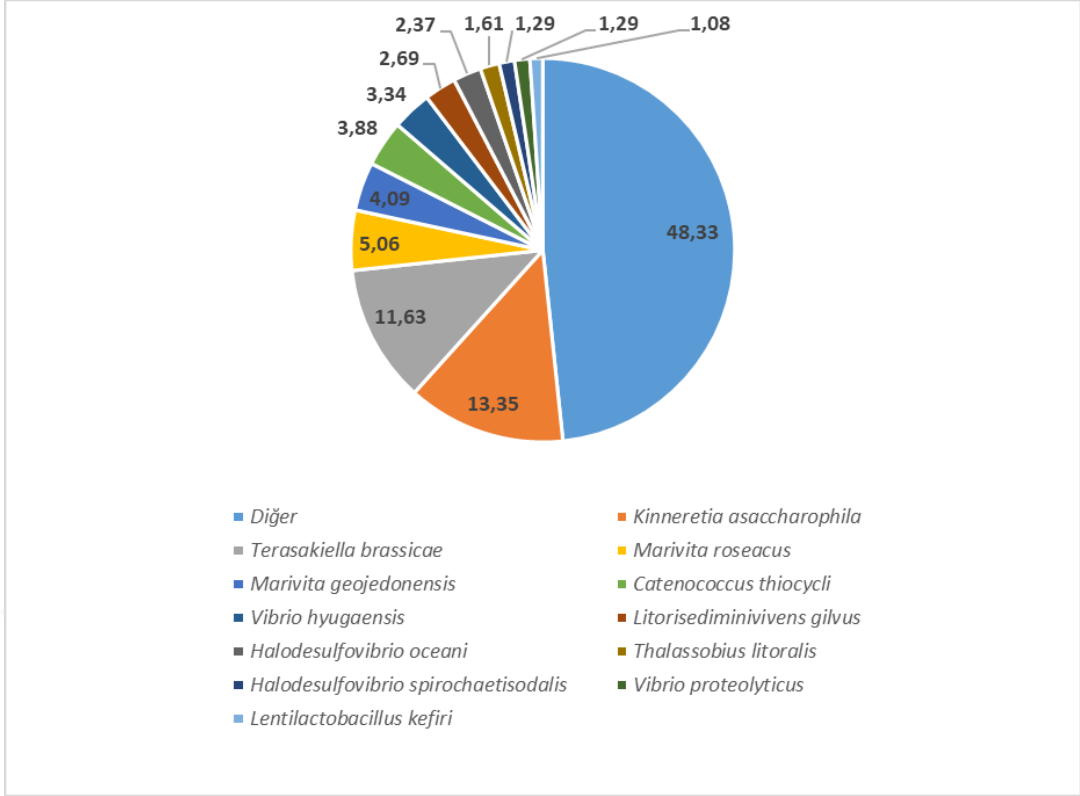
Şekil 6.20. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t2)



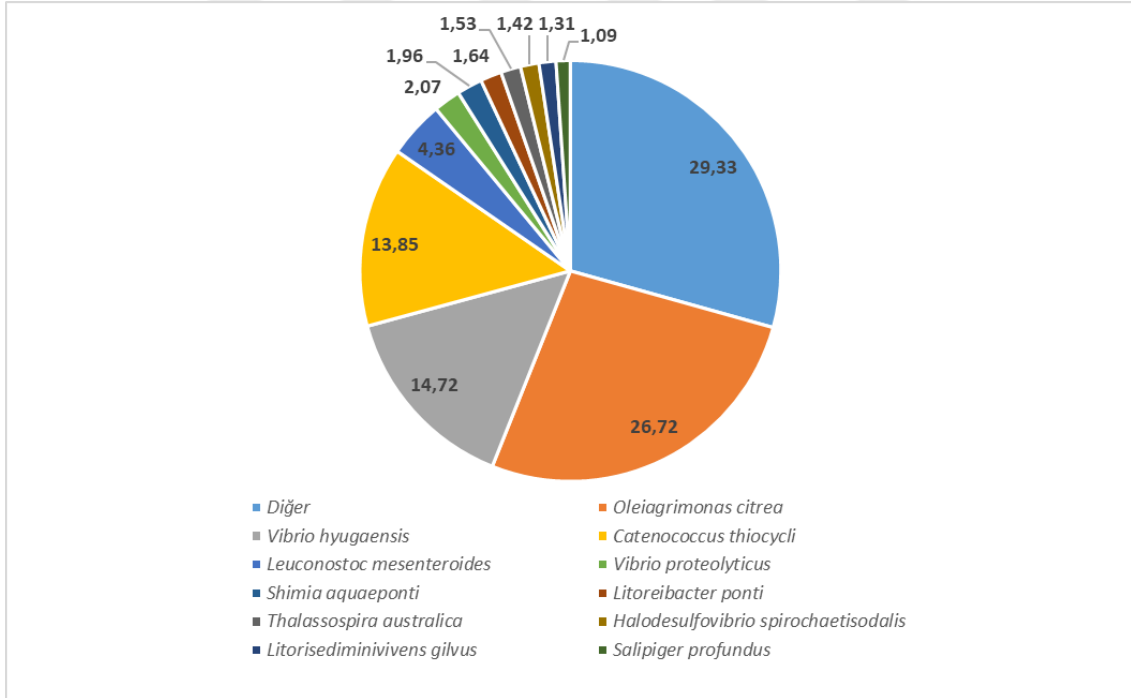
Şekil 6.21. Probiomax Katkısı Yapılmış (P) Biyoyumak Grubu (t3)



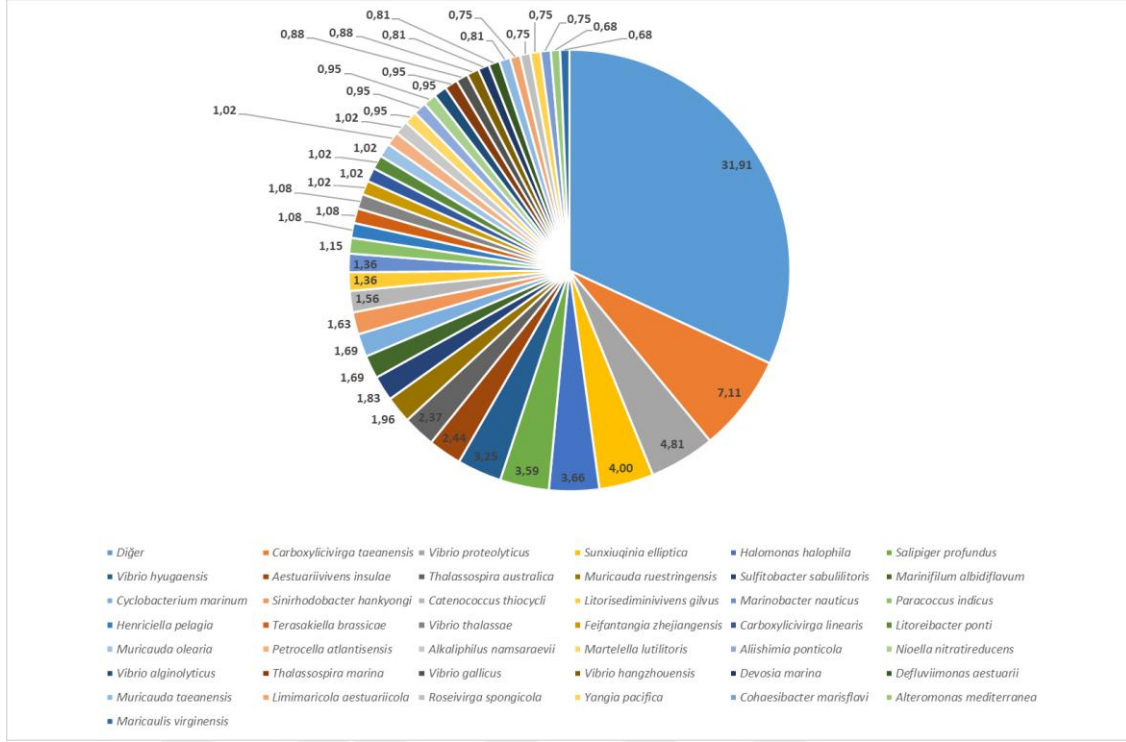
Şekil 6.22. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t0)



Şekil 6.23. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t1)



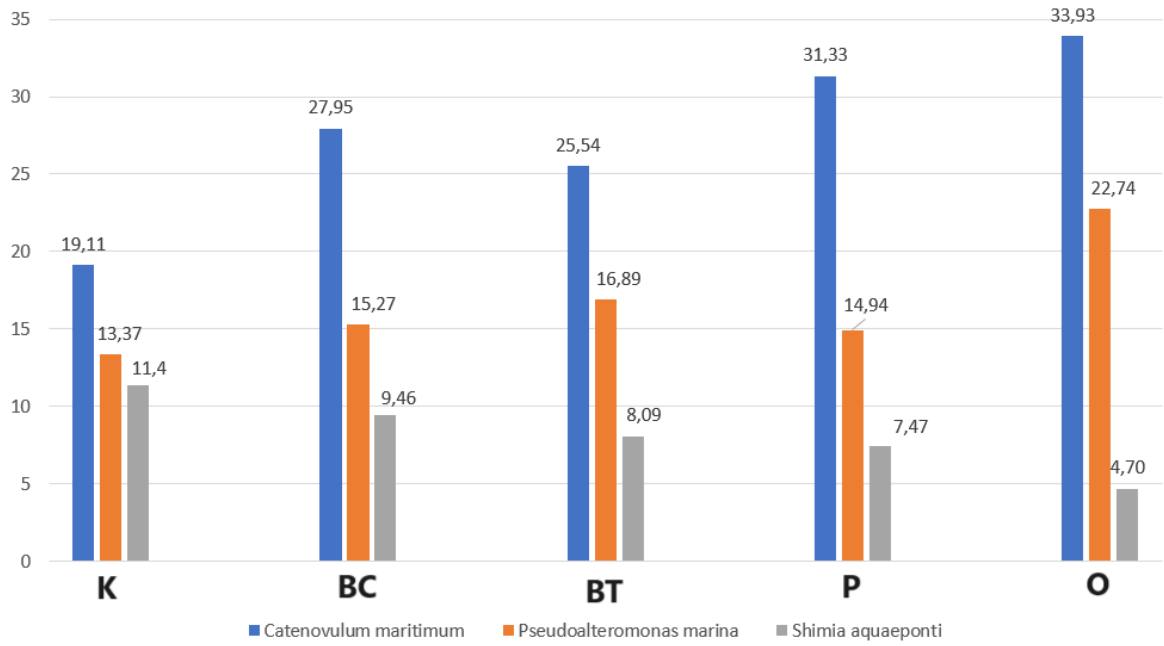
Şekil 6.24. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t2)



Şekil 6.25. OLVIT Probiotics Katkısı Yapılmış (O) Biyoyumak Grubu (t3)

### 6.1.1.2.1. Çalışma Başlangıcı (t0) ve Çalışma Sonu (t3) Baskın Türlerin Profili

Biyoyumak sistemlerinin (BC, BT, P, O ve K) biyoyumak oluşumunun başlangıcından itibaren 1 saat sonraki süreyi temsil eden t0 anında yapılan örnekleme sistemlerde tespit edilen en baskın üç bakteri türünün beklenildiği gibi aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 6.26. Biyoyumak deneme gruplarında t0 zamanında en çok temsil edilen üç tür

Tespit edilen üç baskın türün de denizel kökenli, biyoyumak oluşumunu destekleyici ve su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik etkiye sahip olması bu biyoyumak sistemlerinin deniz suyu ile oluşturulmuş halihazırda su ürünleri yetiştiriciliğinde besin ve probiyotik etkisi sebebi ile yem olarak kullanılan stok bir biyoyumak oluşumundan köken aldığı olgusu ile tutarlı olmaktadır.

Tespit edilen türlere daha detaylı baktığımızda:

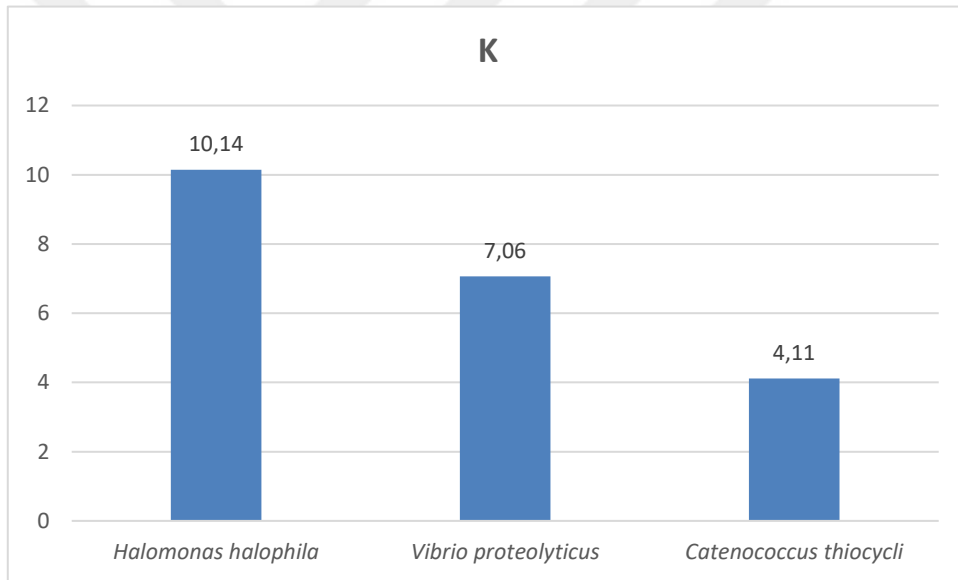
*Catenovulum* cinsi yaygın denizel bir probiyotiktir. *Catenovulum* cinsleri proteinleri ve polisakkaritleri parçalayabilmekte ve Vibriolara karşı sucul organizmaların direncini arttırabilmektedir (163). Kıyı sedimentlerinden izole edilen *Catenovulum maritimum* türlerinin bir polisakkarit olan agarı degrades etmede oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (6). Deneyde kullanılan biyoyumak sistemlerinin tamamında bu türün baskın olması biyoyumakların inoküle edildiği stok biyoyumağın bu türü yaygın olarak içerdiği bilinen deniz suyu ve karides bağırsak içeriği (164), (64) ile oluşturulması öne sürülebilir.

*Pseudoalteromonas* türlerinin biyoyumak oluşumu aşamasında aktive karbon, magnezyum oksit ve alüminyum oksit gibi çeşitli katıların askıda kalıp yumak formunu oluşturması ile desteklediği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (165), (166). Bu cinslerin türleri atık sularda

bulunan biyo-parçalanabilir materyalleri parçalayarak ürettikleri biyoflokülanter ile biyoyumak oluşumunda faydalı etki göstermektedirler. *Pseudoalteromonas marina* türü sucul sistemlerde oluşturdukları yoğun formda biyofilm tabakaları ile çeşitli sucul omurgasızların larva gelişiminde olumsuz etkilere yol açtığı gösterilmiştir (167).

*Shimia aquaeponi* (diğer taksonomik ismi *Thalassobius aquiponti*)'nin patojenik *Vibrio anguillarum* enfekte balıklar için probiyotik olarak kullanılabilceği öner sürülmüş ve *V. anguillarum*'a karşı antibiyotik etkisi kanıtlanmış ve bu patojenin su ürünleri yetiştiriciliğindeki kontrolü için kullanılabilceği öne sürülmüştür (168).

Biyoyumakların 21 günlük olgunlaşma süreleri tamamlandığında içerdikleri en baskın üç türün denizel kökenli, probiyotik etkiye sahip ve biyoyumak oluşumunu destekleyici türler olduğu görülmektedir.

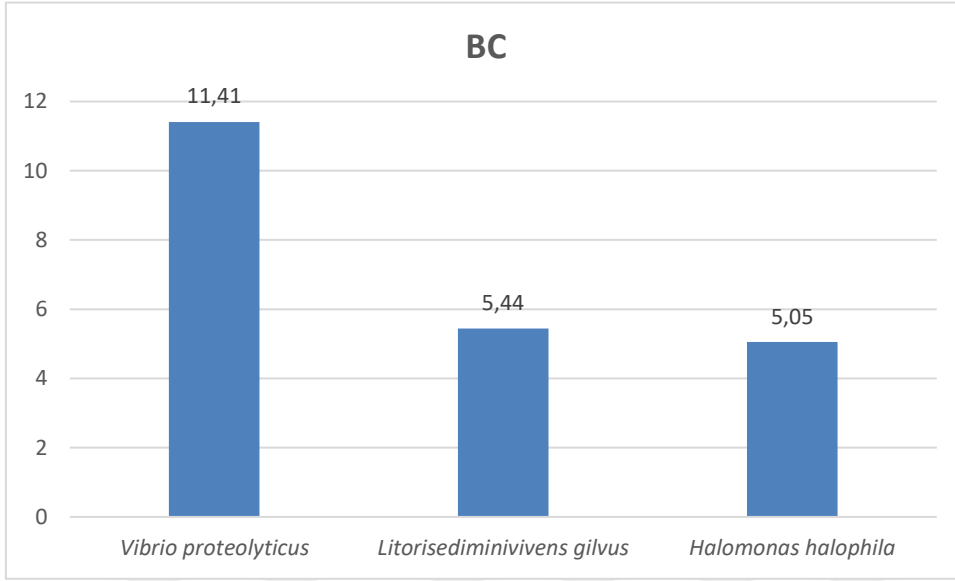


Şekil 6.27. Probiyotik katkısı yapılmayan kontrol (K) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür

Kontrol grubu biyoyumak sisteminin (K) 21. Günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında *Catenococcus thiocycli* türünün tüm türler içerisinde %4,11'lik bir orana sahip olduğu görülmektedir.

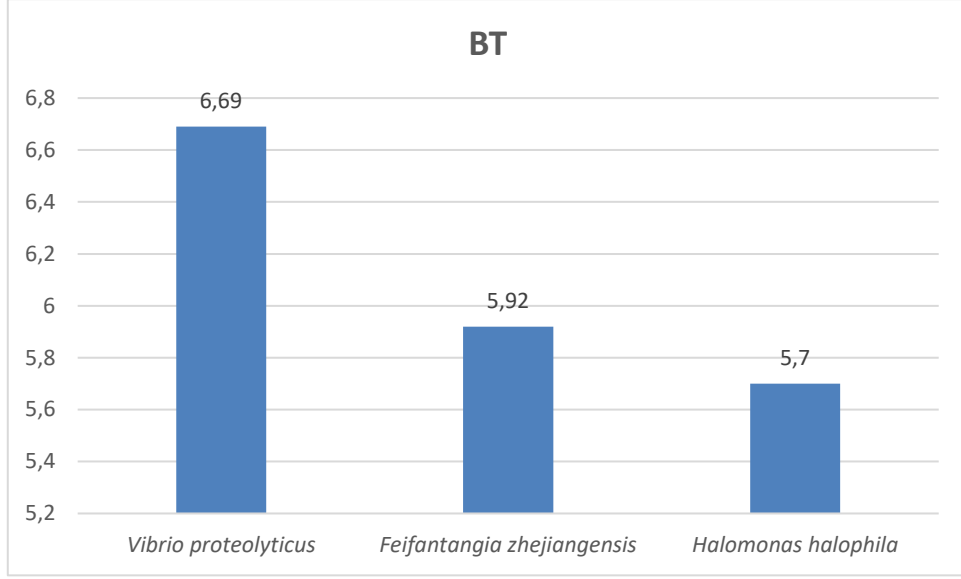
Jung ve arkadaşlarının 500 litrelik bir tankta karbon kaynağı olarak bu çalışmadakine benzer olarak melas kullanılan ve karbon:azot oranı 15-20 olarak ayarlanan biyoyumak ile beslenen kaya solucanlarının bağırsak mikrobiyomunda *Catenococcus thiocycli* türünün tür düzeyinde tüm mikrobiyomun %6.3'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir (110). *C. thiocycli*

türünün aynı zamanda sülfürü okside ederek demir sülfür gibi bileşikler üreterek özellikle atık su arıtımında potansiyel olarak faydalı bir tür olabileceği tartışılmaktadır (169).



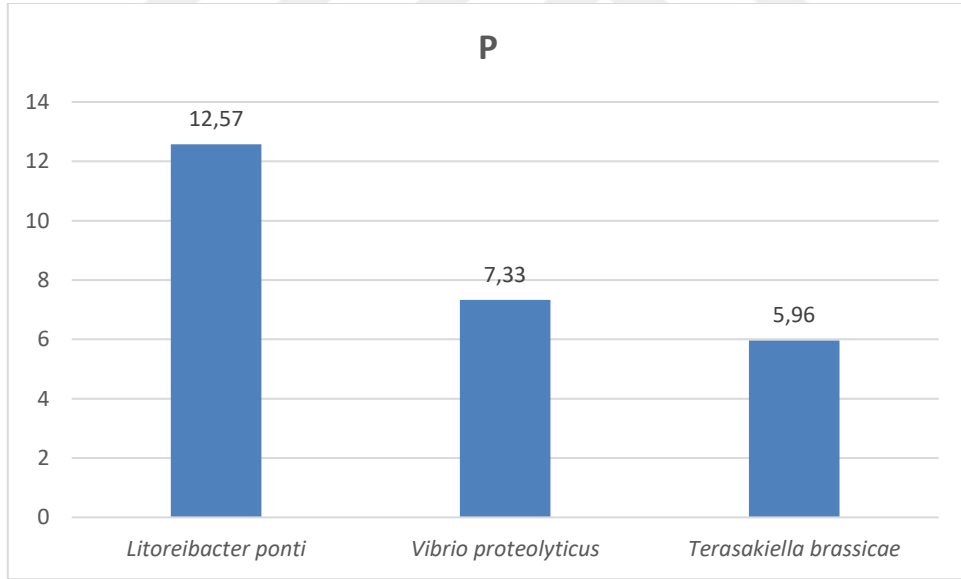
Şekil 6.28. *Bacillus cereus* katkısı yapılmış (BC) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür

*Bacillus cereus* katkısı yapılmış (BC) biyoyumak sisteminin 21. Günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında *Litorisediminivivens gilvus* türünün tüm türler içerisinde %5,44'lük bir orana sahip olduğu görülmektedir. Farklı protein diyetlerinin büyüme performansı, immün tepkisi ve bağırsak mikrobiyotasındaki etkileri gözlemlendiğinde biyoyumak sisteminde 90 gün boyunca farklı protein seviyeleri ile beslenen *Farfantepenaeus aztecus* türü karideslerin de deney sonundaki mikrobiyom içeriklerinde *Litorisediminivivens gilvus* türünde artış olduğu rapor edilmiştir (170).



Şekil 6.29. *Bacillus thuringiensis* katkısı yapılmış (BT) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür

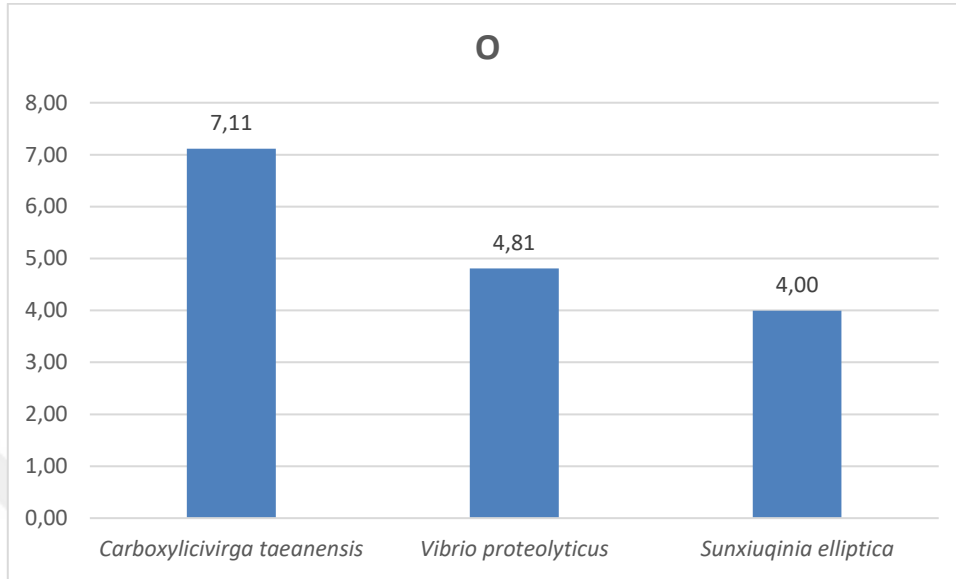
*Bacillus thuringiensis* katkısı yapılmış (BT) biyoyumak sisteminin 21. Günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında *Feifantangia zhejiangensis* türünün tüm türler içerisinde %5,92'lik bir orana sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 6.30. Probiomax katkısı yapılmış (P) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür

*Probiomax* katkısı yapılmış (P) biyoyumak sisteminin 21. Günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında *Litoreibacter ponti* türünün tüm türler içerisinde %12,57'lik ve *Terasakiella brassicae* türünün tüm türler içerisinde %5,96'lık bir orana sahip olduğu görülmektedir.

Benzer olarak *Bacillus* türlerini içeren probiyotik ilavesi ile beslenen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) bağırsak mikrobiyomunu domine eden cinsler arasında *Terasakiella* cinsleri de bulunduğu rapor edilmiştir (171).



Şekil 6.31. OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak grubunda en çok temsil edilen üç tür

OLVIT Probiotics katkısı yapılmış (O) biyoyumak sisteminin 21. Günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında *Carboxylicivirga taeanaensis* türünün tüm türler içerisinde %7,11'lik ve *Sunxiuqinia elliptica* türünün tüm türler içerisinde %4'lük bir orana sahip olduğu görülmektedir.

15 haftalık bir periyotta *Streptococcus agalactiae* patojen türü ile enfekte edilmiş tilapya (*Oreochromis mossambicus*) türlerinin bağırsak mikrobiyom profili incelendiğinde bu patojen tarafından etkilenmeyen tilapyalarda bağırsak mikrobiyomunda patojen etmeninden etkilenenlere kıyasla *Carboxylicivirga* cinsinin baskın geldiği gözlemlenmiş ve bu gözleme dayalı olarak *Carboxylicivirga* cinsinin probiyotik potansiyeli olduğu kanısına varılmıştır (172).

Kontrol (K), *Bacillus thuringiensis* katkısı yapılmış (BT) ve *Bacillus cereus* katkısı yapılmış (BC) biyoyumak sistemlerinde *Halomonas halophila* türü tüm türler içerisinde sırasıyla %10,14, %5,05 ve %5,7 oranında temsil edildiği görülmektedir.

*Halomonas* türleri özellikle endüstriyel atık suların arıtımında potansiyel topaklaştırıcı (yumak oluşturu) ajanlardır. Bu bakterilerin kültüre edildikleri ortamların manipülasyonu

ile biyoyumak oluşumunun %250 oranında arttırılabildiği rapor edilmiştir (173). *Halomonas* cinsine ait birçok deniz bakterisi ekzopolisakkarit (EPS) üreterek biyofilm oluşturma özelliğine sahiptir. Derin deniz sularından izole edilen *Halomonas* türlerinin aromatik hidrokarbonları degrede ettiği de rapor edilmiştir. Bu cinse ait türler birçok hidrofobik organik kirleticinin (fenantren, flören, piren ve bifenil) çözünürlüğünü ve degridasyonunu arttırarak atık suların geri dönüştürülmesinde görev almaktadırlar (174). Deniz sedimentinden izole edilen *Halomonas* türlerinin glikoz ve üreyi karbon ve azot kaynakları olarak kullandıklarında optimal gelişme gösterdikleri ve oluşturdukları biyoyumakların materyal olarak polisakkarit ve protein içerdiği rapor edilmiştir (175).

*Vibrio proteolyticus* türü tüm biyoyumak sistemlerinin 21. günündeki mikrobiyom profiline bakıldığında sistemlerin her birinde toplam tür sayısının %7,06 (K), %11,4 (BC), %6,69 (BT), %7,33 (P) ve %4,81 (O) oranı ile temsil edildiği görülmüştür.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde vibriosisin kontrolü antibiyotik uygulamaları ile sağlanmaya çalışsa da bu uygulamalar dirençli bakteri sayısının ve antibiyotik kalıntılarının yetiştiriciliği yapılan canlılarda periyodik artışına sebep olabilmektedir. Antibiyotik uygulamasına alternatif olarak *Vibrio* türlerine inhibe etki gösteren probiyotik bakterilerin kullanımı öne sürülebilir. Probiyotik etki gösteren probiyotik bakteriler konağın bağırsak sistemini kolonize ederek doğal bir savunma mekanizması sağlayabilmektedir. *Vibrio* cinsine mensup bir tür olmasına karşın *Vibrio proteolyticus* türünün bu koşulları in vitro ve in vivo durumlarda da sağladığı uzun süredir bilinmektedir (176). Bu sebeple belirtilen bakteri türünün yaygın antijenlere ve bazı spesifik patojenlere karşı potansiyel bir probiyotik ve canlı aşı olarak kullanımının kapısı açılmıştır. Bu anlamda su ürünlerinde önemli patojenlerden olan *Photobacterium damsela* ve *Vibrio harveyi* ile enfekte edilmiş yetiştiriciliği yapılan *Solea senegalensis* türü su ürünü 138 probiyotik etki gösterdiği bilinen bakteri suşu ile inoküle edildikten sonra yalnızca *Vibrio proteolyticus* ve *Vibrio alginolyticus* türlerinin iki patojen türe karşıda inhibe edici etki gösterdiği, bu iki probiyotik tür arasında da *Vibrio proteolyticus* türünün konakta antikor üretimi ve hayatta kalma oranını kayda değer miktarda arttırdığı gösterilmiştir (177). Türün enzimatik aktivesine bakıldığında lesitinaz, jelatinaz, kazeinaz, amilaz, proteinaz ve lipaz aktiviteleri sayesinde konak tarafından besin alımı verimini arttırdığı ve sindirimi kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (177).

*Vibrio proteolyticus* türünün probiyotik kapasitesini kapsamlı bir şekilde test etmek amacıyla Medina ve arkadaşları (178) *V. proteolyticus* suşunu yetiştiriciliği yapılan dil balığına (*Solea senegalensis*) enjekte ederek, yetiştirdiği suya ve diyetine ekleyerek patojenite etmeni varlığında konaktaki immün tepki genlerinin anlatımını ve antikor üretimini test etmişlerdir. Yaklaşık 60 süresince devam eden çalışmada suş ile inkübe edilen balıkların kanında, deri mukusunda ve bağırsağında kayda değer biçimde antikor artışı saptanmıştır. Araştırmacıların öne sürdüğü probiyotik etki mekanizmasına göre *V. proteolyticus* suşu mukoza ile etkileşime girdiğinde doğal sıvısal (humoral) ve doğal katil hücrelerini içeren hücrel bağışıklığı aktive ederek patojenlere karşı bağışıklık uyarıcı bir etmen olup spesifik antikorların üretimini desteklemektedir. Suşun antikorları ile yaygın Vibrio patojenlerinin antikorlarının benzerliği suşun bir canlı aşı gibi davranmasını sağlamaktadır.

Kefal yetiştiriciliğinde besin takviyesi olarak *C. fusca* ve *V. proteolyticus* karışımı kullanıldığında kontrol grubuna kıyasla büyüme performansı ve besin kullanımında kayda değer artış ve immün sistemde olumlu etkiler gözlemlendiği çalışma gruplarınca test edilip rapor edilmiştir (179).

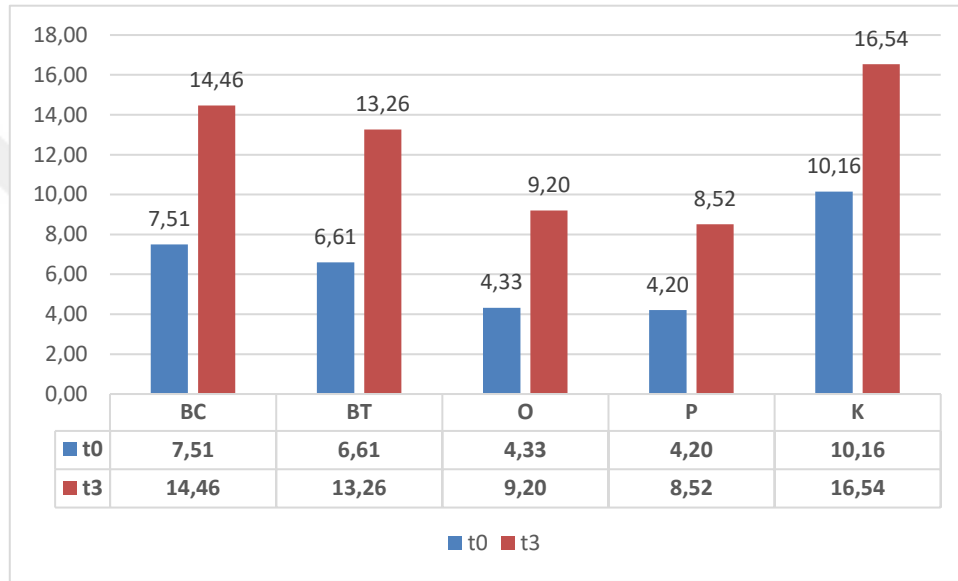
*V. proteolyticus* türünün biyoyumak içerisinde su ürünleri yetiştiriciliği yapılan canlıya yem ve probiyotik takviyesi şeklinde verilmesi ile büyüme oranını, Vibrio ve diğer bazı patojenlere karşı direnci, hayatta kalma oranını, antikor üretimini, besin kullanım başarısını ve sindirimini artırdığının literatür ile desteklenip test edilen tüm biyoyumak sistemlerinin 21.gününde en çok temsil edilen üç türden biri olması, canlıdan bağımsız oluşturulan biyoyumak sistemlerinin su ürünleri yetiştiriciliği için maliyeti az, canlı sağlığını ve gelişimini destekleyici, çevre dostu besin ve probiyotik takviyeleri olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır.

*Bacillus* türleri katkısı yapılan biyoyumak deneme gruplarında bu türlerin tespit edilemediği görülmüştür. Biyoyumak sistemlerini sürdürmek için gereken tuz, sıcaklık, oksijen miktarı, karbon:azot oranı gibi faktörlerin kültüre edilen bu türlerin canlılıklarını sürdürmesi için gerekli koşullardan farklı oldukları bilinmektedir. Biyoyumak sistemleri harici eklenen karbon kaynakları ve havalandırma sistemi ile geniş çeşitliliğe sahip heterotrofik bakterilerin gelişimini teşvik etmektedir. Bu koşullar biyoyumak içerisinde kültüre edilen bakteriler için faydalı olsa da spesifik kültür koşullarına ihtiyaç duyan, adapte olamayan bakteri türleri için

gelişimi kısıtlayabilmektedir (180) (181). Biyoyumak sistemlerine *Bacillus* türleri içeren probiyotik katkısı yapan diğer araştırmacıların da bu eklemenin sistemde değişiklik yaratmadığını rapor ettikleri görülmüştür (182) (183).

#### 6.1.1.2.2. *Vibrio* Cinslerinin Dağılımı

*Vibrio* cinsi sucul sistemlerde doğal olarak bulunan bir cins olması sebebiyle biyoyumak sistemlerinin tümünde *Vibrio* türleri çalışmanın başlangıcından sonuna dek belli bir oranda bulunmakta ve zamanla bu cinse ait bakterilerde artış gözlemlenmiştir.

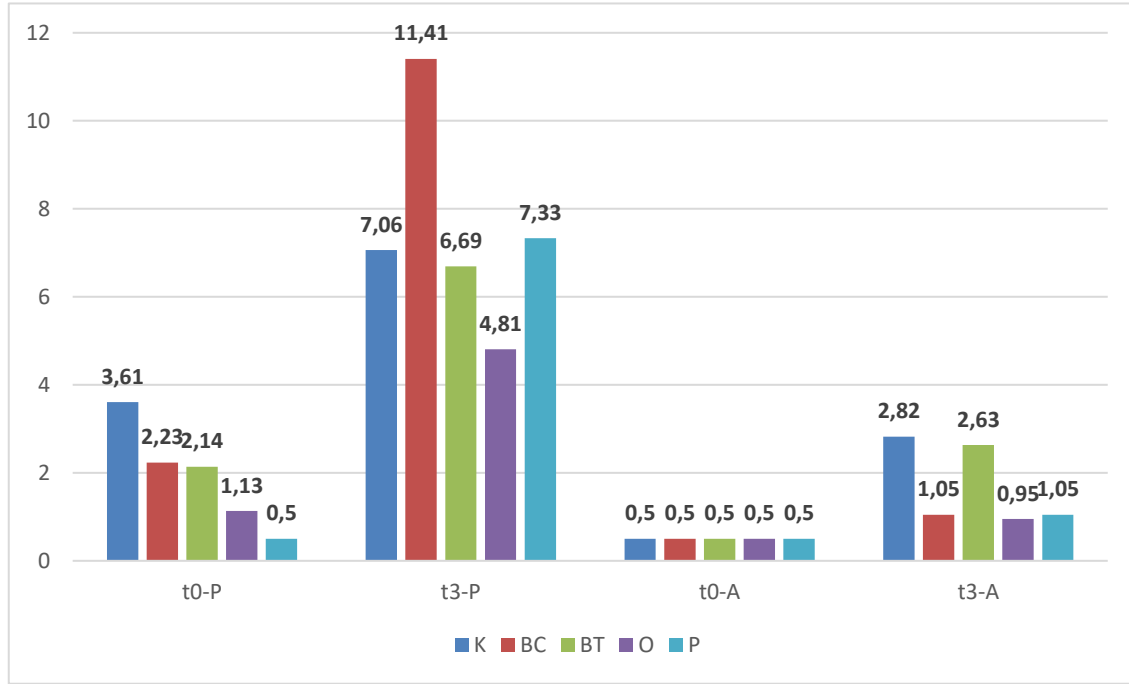


Şekil 6.32. *Vibrio* türlerinin biyoyumak deneme gruplarında t0 ve t3 zamanlarındaki yüzdelik temsili

*Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* ve *Vibrio parahaemolyticus* gibi *Vibrio* türlerinin su ürünlerinde oldukça patojenik türler olduğu bilinse de (184), (185), (186) bazı *Vibrio* türlerinin konağın immün sistemini uyararak (İmmünostimülasyon) konağın savunma mekanizmasını aktive ettiği karides türleri üzerinde çalışılmıştır (moullack). Bu sebeple patojen türlerce zengin olan *Vibrio* cinsinin bazı üyelerinin probiyotik olarak kullanımı tartışmalı bir konudur. Örneğin *V. alginolyticus* türünün hem hasta hem de sağlıklı larva ve yetişkin karideslerde yüksek oranda saptandığı (187) buna karşın bu türün *V. harveyi* alakalı enfeksiyon hastalığının kontrolünde kullanıldığı (188) da rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada araştırmacılar *Bacillus* ve *Vibrio* türleri ile inoküle edilmiş karideslerde kontrole kıyasla kayda değer bir büyüme oranı gözlemlenmiştir (189). Ek olarak bir diğer *Vibrio* türü olan *Vibrio lentus*'un *V. harveyi* ile inoküle edilmiş levrek balıklarında kontrol

grubuna kıyasla kayda değer bir koruma etkisine sahip olduğu, aynı çalışmada ayrı ayrı *Bacillus* türleri ve *Vibrio proteolyticus* ile inoküle edilmiş levrek gruplarında daha üstün bir koruma sağladığı rapor edilmiştir (190).

Su ürünlerinde probiyotik etkileri olduğu bilinen ve 6.1.1.2.1. numaralı başlıkta da açıklanan *V. proteolyticus* ve *V. alginolyticus* türlerinin çalışmanın başlangıcında biyoyumak deneme gruplarında az bir oranda temsil edilip çalışmanın sonunda bu oranların arttığı saptanmıştır.



Şekil 6.33. *V. proteolyticus* (t0-P,t3-P) ve *V. alginolyticus* (t0-A,t3-A) türlerinin biyoyumak deneme gruplarında t0 ve t3 zamanlarındaki temsili

*V. proteolyticus* ve *V. alginolyticus* türlerinin oluşturulan olgun biyoyumak sistemlerindeki gözlemlenen bu artışı, bu türlerin probiyotik etkileri (immünostimülasyon, konağın büyüme ve hayatta kalma oranlarında artış, besinlerin sindirim ve parçalanma oranlarında olumlu etkiler vb.) göz önüne alındığında kabul edilebilir bir etki olduğu öne sürülebilir. *V. proteolyticus* türünün özellikle *Bacillus* türleri ile inoküle edilmiş biyoyumak deneme gruplarında kayda değer bir artışa sahip olduğu görülmektedir (BC için 2,23 -> 11,42 ve BT için 2,14 -> 6,69) .

## 6.2. SONUÇ

Bu çalışmada gözlemlenen ticari probiyotikler ve Bacillus türlerinin eklenmesi, biyoyumak sistemlerinde mikrobiyom çeşitliliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu eklemelerin, su ürünleri yetiştiriciliğinde hayvanların sağlık durumları üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir. Özellikle, probiyotiklerin hastalık etmenlerine karşı koruyucu etkisi ve prebiyotiklerin canlıların bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi yönler, bu eklemelerin beslenme verimliliği ve hastalıklara karşı direnci artırabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, probiyotik ve prebiyotik eklemelerinin, su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe ekonomik ve sağlık açısından sunduğu avantajlar dikkate alınmalıdır. Biyoyumak sistemlerinin çevresel sürdürülebilirlik üzerindeki etkileri, bu çalışmanın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu sistemlerin atık su arıtımı ve geri dönüşümündeki rolleri, karbon, azot ve fosfor döngüsündeki etkileriyle birlikte incelendiğinde, ekosistem sağlığı ve biyoçeşitliliğin korunmasına katkıda buldukları gözlemlenmiştir. Bu bulgular, biyoyumak teknolojilerinin çevre koruma stratejilerinde nasıl bir rol oynayabileceğine ışık tutmakta ve bu yöntemlerin geleneksel atık su arıtım yöntemlerine göre sahip olduğu potansiyel avantajları ortaya koymaktadır. Biyoyumak sistemlerinin su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe ekonomik etkileri, bu çalışmanın başka bir önemli yönünü teşkil etmektedir. Geleneksel yem maliyetlerine kıyasla, bu sistemlerin sağladığı tasarruflar ve yatırım getirisinin yanı sıra, ölçeklenebilirlik potansiyelleri üzerinde durulmuştur. Bu bağlamda, bu teknolojinin maliyet-etkinliği ve su ürünleri yetiştiriciliği alanındaki geniş uygulama alanları, sektörün sürdürülebilirliğine ve karlılığına önemli katkılar sağlayabilir. Yeni nesil dizileme ve eDNA metabarkodlama yöntemlerinin biyoyumak sistemlerinin analizindeki rolleri, teknolojik ilerlemeler açısından dikkate değerdir. Bu teknikler, mikrobiyal çeşitliliğin ve dinamiklerin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak tanımıştır. Bununla birlikte, bu metodolojilerin uygulanmasında karşılaşılan teknik zorluklar ve analiz süreçlerindeki karmaşıklıklar da bu çalışmada ele alınmıştır. Biyoyumak teknolojisinin potansiyel uygulama alanları, su ürünleri yetiştiriciliği dışında da geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu çalışma, özellikle kentsel ve endüstriyel atık su arıtımında bu sistemlerin kullanım potansiyelini ortaya koymuştur. Ayrıca, bu araştırmanın sonuçları gelecekteki çalışmalara yön verebilir ve biyoyumak sistemlerinin ölçeklendirilmesi, uzun vadeli etkileri ve farklı sucul ortamlardaki uygulamaları gibi yeni araştırma konularını gündeme getirebilir.

Bu bağlamda, bu teknolojinin daha geniş çapta uygulanabilirliği ve sürdürülebilirlik potansiyeli üzerinde durulmalıdır.



## KAYNAKLAR

1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020 Dec;8(1):103.
2. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Oct;11(5):442–6.
3. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Apr 17;109(16):6241–6.
4. Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, Troedsson C. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *Voolstra CR, editor. PLoS ONE*. 2014 Feb 7;9(2):e87624.
5. Kaya D, Genç E. Biofloc technology in aquaculture. *Ege J Fish Aquat Sci*. 2018 Jun 15;35(2):219–25.
6. You Y, Xie W, Li C, Gu Z, Ban X, Zhang F, et al. Characterization and efficient production of an  $\alpha$ -agarase from marine bacterium *Catenovulum maritimum* STB14. *Food Bioeng*. 2023 Mar;2(1):3–14.
7. Mugwanya M, Dawood MAO, Kimera F, Sewilam H. Biofloc Systems for Sustainable Production of Economically Important Aquatic Species: A Review. *Sustainability*. 2021 Jun 29;13(13):7255.
8. Xu WJ, Morris TC, Samocha TM. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*. 2016 Feb;453:169–75.
9. De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N, Verstraete W. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*. 2008 Jun;277(3–4):125–37.
10. Khanjani MH, Sajjadi MM, Alizadeh M, Sourinejad I. Nursery performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) cultivated in a biofloc system: the effect of adding different carbon sources. *Aquac Res*. 2017 Apr;48(4):1491–501.
11. Panigrahi A, Sundaram M, Saranya C, Swain S, Dash RR, Dayal JS. Carbohydrate sources differentially influence growth performances, microbial dynamics and immunomodulation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under biofloc system. *Fish Shellfish Immunol*. 2019 Mar;86:1207–16.
12. Xu WJ, Pan LQ. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture*. 2013 Nov;412–413:117–24.

13. Hebert PDN, Ratnasingham S, De Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2003 Aug 7 [cited 2023 Nov 29];270(suppl\_1). Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2003.0025>
14. Arnot DE, Roper C, Bayoumi RAL. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Sep;61(1):15–24.
15. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2005 Oct 29;360(1462):1847–57.
16. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Jan 24;103(4):968–71.
17. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Jun 7;102(23):8369–74.
18. Větrovský T, Baldrian P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. Neufeld J, editor. *PLoS ONE*. 2013 Feb 27;8(2):e57923.
19. Choudhary P, Singh BN, Chakdar H, Saxena AK. DNA barcoding of phytopathogens for disease diagnostics and bio-surveillance. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021 Mar;37(3):54.
20. Krishna Krishnamurthy P, Francis RA. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodivers Conserv*. 2012 Jul;21(8):1901–19.
21. Ashfaq M, Hebert PDN. DNA barcodes for bio-surveillance: regulated and economically important arthropod plant pests. Naaum A, editor. *Genome*. 2016 Nov;59(11):933–45.
22. Jiao L, Yin Y, Cheng Y, Jiang X. DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis* : comparison of data from heated or aged wood samples. *Holzforschung*. 2014 May 1;68(4):487–94.
23. Sweeney BW, Battle JM, Jackson JK, Dapkey T. Can DNA barcodes of stream macroinvertebrates improve descriptions of community structure and water quality? *J North Am Benthol Soc*. 2011 Mar;30(1):195–216.
24. Techen N, Parveen I, Pan Z, Khan IA. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Curr Opin Biotechnol*. 2014 Feb;25:103–10.
25. Ogram A, Saylor GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods*. 1987 Dec;7(2–3):57–66.

26. Van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. *Investig Genet.* 2010;1(1):14.
27. Pedersen MW, Ginolhac A, Orlando L, Olsen J, Andersen K, Holm J, et al. A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and microfossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quat Sci Rev.* 2013 Sep;75:161–8.
28. Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res.* 2007 Jan;6(1–2):37–53.
29. Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol.* 2012 Jun;21(11):2565–73.
30. Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, Paukert C. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biol Conserv.* 2015 Mar;183:77–84.
31. Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, Baumgardt J, Waits LP. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshw Sci.* 2013 Sep;32(3):792–800.
32. Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial EDNA. Gilbert M, editor. *Methods Ecol Evol.* 2014 Jul;5(7):676–84.
33. Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z. Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. Gilbert JA, editor. *PLoS ONE.* 2012 Apr 26;7(4):e35868.
34. Liang Z, Keeley A. Filtration Recovery of Extracellular DNA from Environmental Water Samples. *Environ Sci Technol.* 2013 Aug 20;47(16):9324–31.
35. Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Mol Ecol Resour.* 2016 Jan;16(1):56–68.
36. Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, McVeigh MM, Lodge DM. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol Ecol Resour.* 2015 Jan;15(1):168–76.
37. Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, et al. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial EDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. Yu D, editor. *Methods Ecol Evol.* 2017 May;8(5):635–45.

38. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2012 Apr;21(8):2045–50.
39. Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016 Feb;25(4):929–42.
40. Kraaijeveld K, De Weger LA, Ventayol García M, Buermans H, Frank J, Hiemstra PS, et al. Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Mol Ecol Resour.* 2015 Jan;15(1):8–16.
41. Bartelme RP, Smith MC, Sepulveda-Villet OJ, Newton RJ. Component Microenvironments and System Biogeography Structure Microorganism Distributions in Recirculating Aquaculture and Aquaponic Systems. Tamaki H, editor. *mSphere.* 2019 Aug 28;4(4):e00143-19.
42. Rurangwa E, Verdegem MCJ. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev Aquac.* 2015 Jun;7(2):117–30.
43. Boutin S, Bernatchez L, Audet C, Derôme N. Network Analysis Highlights Complex Interactions between Pathogen, Host and Commensal Microbiota. Rawls JF, editor. *PLoS ONE.* 2013 Dec 23;8(12):e84772.
44. Johny TK, Puthusseri RM, Bhat SG. A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquac Res.* 2021 Oct;52(10):4574–600.
45. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Oct;14(10):908–34.
46. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jul;72(7):5069–72.
47. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(D1):D633–42.
48. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 27;41(D1):D590–6.
49. Huang JN, Wen B, Zhu JG, Zhang YS, Gao JZ, Chen ZZ. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). *Sci Total Environ.* 2020 Sep;733:138929.

50. Huyben D, Rimoldi S, Ceccotti C, Montero D, Betancor M, Iannini F, et al. Effect of dietary oil from *Camelina sativa* on the growth performance, fillet fatty acid profile and gut microbiome of gilthead Sea bream ( *Sparus aurata* ). PeerJ. 2020 Dec 9;8:e10430.
51. Rimoldi S, Antonini M, Gasco L, Moroni F, Terova G. Intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) may be improved by feeding a *Hermetia illucens* meal/low-fishmeal diet. Fish Physiol Biochem. 2021 Apr;47(2):365–80.
52. Solovyev MM, Kashinskaya EN, Bochkarev NA, Andree KB, Simonov E. The effect of diet on the structure of gut bacterial community of sympatric pair of whitefishes ( *Coregonus lavaretus* ): one story more. PeerJ. 2019 Dec 3;7:e8005.
53. Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture. 2012 Aug;356–357:351–6.
54. Mugwanya M, Dawood MAO, Kimera F, Sewilam H. Biofloc Systems for Sustainable Production of Economically Important Aquatic Species: A Review. Sustainability. 2021 Jun 29;13(13):7255.
55. Vargas-Albores F, Porchas-Cornejo MA, Martínez-Porchas M, Villalpando-Canchola E, Gollas-Galván T, Martínez-Córdova LR. Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. Helgol Mar Res. 2017 Dec;71(1):5.
56. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Dec;64(4):655–71.
57. Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. 2008 Jan;274(1):1–14.
58. Vargas-Albores F, Martínez-Porchas M, Arvayo MA, Villalpando-Canchola E, Gollas-Galván T, Porchas-Cornejo MA. Immunophysiological Response of Pacific White Shrimp Exposed to a Probiotic Mixture of Proteobacteria and Firmicutes in Farm Conditions. North Am J Aquac. 2016 Jul;78(3):193–202.
59. Martínez-Córdova LR, Vargas-Albores F, Garibay-Valdez E, Ortiz-Estrada AM, Porchas-Cornejo MA, Lago-Lestón A, et al. Amaranth and wheat grains tested as nucleation sites of microbial communities to produce bioflocs used for shrimp culture. Aquaculture. 2018 Dec;497:503–9.
60. Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F, et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiol. 2016 Dec;16(1):157.
61. Çelik I, Keskin E. Revealing the Microbiome of Four Different Thermal Springs in Turkey with Environmental DNA Metabarcoding. Biology. 2022 Jun 30;11(7):998.

62. Boyer F, Mercier C, Bonin A, Le Bras Y, Taberlet P, Coissac E. OBITOOLS : a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* 2016 Jan;16(1):176–82.
63. Kaya D, Genc E, Genc MA, Aktas M, Eroldogan OT, Guroy D. Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding rates and stocking densities. *Aquaculture.* 2020 Nov;528:735526.
64. Shi MJ, Du WJ, Wang C, Chen GJ, Du ZJ. *Catenovulum sediminis* sp. nov., isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Oct 1;67(10):3894–8.
65. Nam YD, Chang HW, Park JR, Kwon HY, Quan ZX, Park YH, et al. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 Jan 1;57(1):12–8.
66. Kim YO, Park IS, Park S, Kim H, Nam BH, Kim DG, et al. *Aliishimia ponticola* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019 Oct 1;69(10):3109–15.
67. Kim H, Oh HM, Yang SJ, Lee JS, Hong JS, Cho JC. *Marinobacterium marisflavi* sp. nov., Isolated from a Costal Seawater. *Curr Microbiol.* 2009 May;58(5):511–5.
68. Ray A, Kinch LN, De Souza Santos M, Grishin NV, Orth K, Salomon D. Proteomics Analysis Reveals Previously Uncharacterized Virulence Factors in *Vibrio proteolyticus*. McFall-Ngai MJ, editor. *mBio.* 2016 Sep 7;7(4):e01077-16.
69. Kang H, Kim H, Joung Y, Joh K. *Polaribacter lacunae* sp. nov., isolated from a lagoon. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Mar 1;67(3):681–6.
70. Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Uknalis J, Boyd EF, Fay JP. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-Induced Killing of Vibrios and Other Bacterial Pathogens. Liu SJ, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Jun;83(11):e00175-17.
71. Park S, Ha MJ, Jung YT, Yoon JH. *Litorisediminivivens gilvus* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Nov 1;66(11):4681–5.
72. Park S, Kim IK, Lee JS, Yoon JH. *Sulfitobacter sabulilitoris* sp. nov., isolated from marine sand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019 Oct 1;69(10):3230–6.
73. Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, et al. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Jan 1;53(1):245–52.
74. Rodrigo-Torres L, Pujalte MJ, Arahall DR. Draft genome of *Leisingera aquaemixtae* CECT 8399 T , a member of the Roseobacter clade isolated from a junction of fresh and ocean water in Jeju Island, South Korea. *Genomics Data.* 2016 Mar;7:233–6.

75. Wang YW, Ren WT, Xu YY, Zhang XQ. Corrigendum: *Muriiphilus fusiformis* gen. nov., sp. nov., a novel non-marine bacterium belonging to the Roseobacter group, and reclassification of *Maritimibacter lacisalsi* (Zhong et al. 2015) as *Muriicola lacisalsi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2021 Sep 21 [cited 2023 Nov 29];71(9). Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004964>
76. Ivanova EP, López-Pérez M, Zabalos M, Nguyen SH, Webb HK, Ryan J, et al. Ecophysiological diversity of a novel member of the genus *Alteromonas*, and description of *Alteromonas mediterranea* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 Jan;107(1):119–32.
77. Kumari P, Poddar A, Schumann P, Das SK. *Vibrio panuliri* sp. nov., a marine bacterium isolated from spiny lobster, *Panulirus penicillatus* and transfer of *Vibrio ponticus* from Scophthalmi clade to the newly proposed Ponticus clade. *Res Microbiol*. 2014 Dec;165(10):826–35.
78. Park S, Park JM, Park DS, Yoon JH. *Litoreibacter ponti* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Nov 1;64(Pt\_11):3810–5.
79. Jin Q wen, Hu Y hua, Sun L. *Alteromonas oceani* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of a hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Feb 1;68(2):657–62.
80. Urbanczyk Y, Ogura Y, Hayashi T, Urbanczyk H. Description of a novel marine bacterium, *Vibrio hyugaensis* sp. nov., based on genomic and phenotypic characterization. *Syst Appl Microbiol*. 2015 Jul;38(5):300–4.
81. Sonnenschein EC, Jimenez G, Castex M, Gram L. The *Roseobacter* -Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. Stabb EV, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Feb 12;87(5):e02581-20.
82. Li M, Wu W, You W, Huang S, Huang M, Luo X, et al. A novel screening method for the detection of *Pseudoalteromonas shioyasakiensis*, an emerging opportunistic pathogen that caused the mass mortality of juvenile Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) during a record-breaking heat wave. *Aquaculture*. 2021 Dec;545:737191.
83. Dubert J, Balboa S, Regueira M, González-Castillo A, Gómez-Gil B, Romalde JL. *Vibrio barjaei* sp. nov., a new species of the Mediterranei clade isolated in a shellfish hatchery. *Syst Appl Microbiol*. 2016 Dec;39(8):553–6.
84. Hagaggi NShA, Abdul-Raouf UM. Macroalga-associated bacterial endophyte bioactive secondary metabolites twinning: *Cystoseira myrica* and its associated *Catenococcus thiocyli* QCm as a model. *World J Microbiol Biotechnol*. 2022 Nov;38(11):205.
85. Zhou X, Zhang XA, Jiang ZW, Yang X, Zhang XL, Yang Q. Combined characterization of a new member of *Marivita cryptomonadis* strain LZ-15-2 isolated from cultivable phycosphere microbiota of highly toxic HAB dinoflagellate *Alexandrium catenella* LZT09. *Braz J Microbiol*. 2021 Jun;52(2):739–48.

86. Chen Z, Lei X, Lai Q, Li Y, Zhang B, Zhang J, et al. *Phaeodactylibacter xiamenensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Saprospiraceae isolated from the marine alga *Phaeodactylum tricornutum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Oct 1;64(Pt\_10):3496–502.
87. Kurilenko VV, Romanenko LA, Chernysheva NY, Velansky PV, Tekutyeva LA, Isaeva MP, et al. *Thalassobius aquimarinus* sp. nov., isolated from the Sea of Japan seashore. *Arch Microbiol*. 2021 Aug;203(6):3201–7.
88. Henriksen NNSE, Lindqvist LL, Wibowo M, Sonnenschein EC, Bentzon-Tilia M, Gram L. Role is in the eye of the beholder—the multiple functions of the antibacterial compound tropodithietic acid produced by marine *Rhodobacteraceae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2022 May 6;46(3):fuac007.
89. Shen X, Li Y, Zhao Z, Han YF, Zhang WW, Yu XY, et al. Polyphasic taxonomic characterisation of a novel strain as *Pararhizobium haloflavum* sp. nov., isolated from soil samples near a sewage treatment tank. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018 Apr;111(4):485–91.
90. Wirth JS, Whitman WB. Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citricella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Jul 1;68(7):2393–411.
91. Wang H, Qi C, Chen W, Dong W, Tang H, Hu X. *Carboxylicivirga flava* sp. nov., isolated from marine surface sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016 Dec 1;66(12):5412–6.
92. Gebers R. Enrichment, Isolation, and Emended Description of *Pedomicrobium ferrugineum* Aristovskaya and *Pedomicrobium manganicum* Aristovskaya. *Int J Syst Bacteriol*. 1981 Jul 1;31(3):302–16.
93. Siddiqi MZ, Thao NTP, Choi G, Kim DC, Lee YW, Kim SY, et al. *Mesorhizobium denitrificans* sp. nov., a novel denitrifying bacterium isolated from sludge. *J Microbiol*. 2019 Apr;57(4):238–42.
94. Sultanpuram VR, Lodha TD, Chintalapati VR, Chintalapati S. *Cohaesibacter haloalkalitolerans* sp. nov., isolated from a soda lake, and emended description of the genus *Cohaesibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Nov 1;63(Pt\_11):4271–6.
95. Rajasabapathy R, Mohandass C, Yoon JH, Dastager SG, Liu Q, Khieu TN, et al. *Nioella nitratireducens* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Rhodobacteraceae* isolated from Azorean Island. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 Feb;107(2):589–95.
96. Yang LH, Xiong H, Lee OO, Qi SH, Qian PY. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Jun;44(6):625–30.

97. Abraham WR. Phylogeny of *Maricaulis* Abraham et al. 1999 and proposal of *Maricaulis virginensis* sp. nov., *M. parjimensis* sp. nov., *M. washingtonensis* sp. nov. and *M. salignorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 Nov 1;52(6):2191–201.
98. Kucera D, Pernicová I, Kovalčík A, Koller M, Müllerová L, Sedláček P, et al. Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresour Technol.* 2018 May;256:552–6.
99. Zhang X ling, Qi M, Li Q hong, Cui Z dong, Yang Q. *Maricaulis alexandrii* sp. nov., a novel active biofloculants-bearing and dimorphic prosthecate bacterium isolated from marine phycosphere. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2021 Aug;114(8):1195–203.
100. Tsubouchi T, Ohta Y, Haga T, Usui K, Shimane Y, Mori K, et al. *Thalassospira alkalitolerans* sp. nov. and *Thalassospira mesophila* sp. nov., isolated from a decaying bamboo sunken in the marine environment, and emended description of the genus *Thalassospira*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Jan 1;64(Pt\_1):107–15.
101. Abraham WR, De Carvalho MP, Da Costa Neves TSP, Memoria MT, Tartuci IT, Vancanneyt M, et al. Proposal of *Henriciella barbarensis* sp. nov. and *Henriciella algicola* sp. nov., stalked species of the genus and emendation of the genus *Henriciella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Aug 1;67(8):2804–10.
102. Lakshmi KVNS, Sasikala Ch, Ashok Kumar GV, Chandrasekaran R, Ramana ChV. *Phaeovibrio sulfidiphilus* gen. nov., sp. nov., phototrophic alphaproteobacteria isolated from brackish water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011 Apr 1;61(4):828–33.
103. Sawabe T, Hayashi K, Moriwaki J, Thompson FL, Swings J, Potin P, et al. *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 May 1;54(3):843–6.
104. Liu Y, Du J, Lai Q, Dong C, Xie Y, Shao Z. *Jiulongibacter sediminis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Cytophagaceae, isolated from the surface sediment of the Jiulong River in China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Jun 10;66(6):2347–53.
105. Malimas T, Yukphan P, Takahashi M, Muramatsu Y, Kaneyasu M, Potacharoen W, et al. *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Mar 1;59(3):466–71.
106. Yoon JH, Kang SJ, Lee JS. *Marivita geojedonensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Feb 1;63(Pt\_2):423–7.
107. Lin SY, Hameed A, Hsieh YT, Young CC. *Mesorhizobium composti* sp. nov., isolated from compost. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2019 Sep;112(9):1387–98.
108. Srinivasan S, Kim MK, Sathiyaraj G, Kim YJ, Yang DC. *Pusillimonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Aug 1;60(8):1783–7.
109. Yang SH, Seo HS, Seong CN, Kwon KK. *Oleiagrimonas citrea* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flat sediment and emended description of the genus

- Oleiagrimonas Fang et al. 2015 and Oleiagrimonas soli. Int J Syst Evol Microbiol. 2017 Jun 1;67(6):1672–5.
110. Jung HY, Kim CH, Kim JK. Identification of the bacterial composition in the rockworm gut and biofloc-fed adult gut flora beneficial for integrated multitrophic aquaculture. Fish Aquat Sci. 2021 Sep;24(9):297–310.
111. Ivanova EP, López-Pérez M, Webb HK, Ng HJ, Dang THY, Zhukova NV, et al. Thalassospira australica sp. nov. isolated from sea water. Antonie Van Leeuwenhoek. 2016 Aug;109(8):1091–100.
112. Dong C, Liu R, Lai Q, Liu Y, Shao Z. Thalassospira marina sp. nov., isolated from surface seawater. Int J Syst Evol Microbiol. 2018 Sep 1;68(9):2943–8.
113. Wang T, Wirth JS, Whitman WB. *Limimaricola*. In: Whitman WB, editor. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Internet]. 1st ed. Wiley; 2021 [cited 2023 Nov 29]. p. 1–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01673>
114. Dai X, Wang BJ, Yang QX, Jiao NZ, Liu SJ. Yangia pacifica gen. nov., sp. nov., a novel member of the Roseobacter clade from coastal sediment of the East China Sea. Int J Syst Evol Microbiol. 2006 Mar 1;56(3):529–33.
115. Sun JQ, Xu L, Liu M, Wang XY, Wu XL. Flavobacterium suaedae sp. nov., an endophyte isolated from the root of Suaeda corniculata. Int J Syst Evol Microbiol. 2016 May 1;66(5):1943–9.
116. Uchino Y, Hirata A, Yokota A, Sugiyama J. Reclassification of marine Agrobacterium species: Proposals of Stappia stellulata gen. nov., comb. nov., Stappia aggregata sp. nov., nom. rev., Ruegeria atlantica gen. nov., comb. nov., Ruegeria gelatinovora comb. nov., Ruegeria algicola comb. nov., and Ahrensia kieliense gen. nov., sp. nov., nom. rev. J Gen Appl Microbiol. 1998;44(3):201–10.
117. Jung SY, Oh TK, Yoon JH. Tenacibaculum aestuarii sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. Int J Syst Evol Microbiol. 2006 Jul 1;56(7):1577–81.
118. Rathgeber C, Yurkova N, Stackebrandt E, Schumann P, Beatty JT, Yurkov V. Roseicyclus mahoneyensis gen. nov., sp. nov., an aerobic phototrophic bacterium isolated from a meromictic lake. Int J Syst Evol Microbiol. 2005 Jul 1;55(4):1597–603.
119. Han SB, Su Y, Hu J, Wang RJ, Sun C, Wu D, et al. Terasakiella brassicae sp. nov., isolated from the wastewater of a pickle-processing factory, and emended descriptions of Terasakiella pusilla and the genus Terasakiella. Int J Syst Evol Microbiol. 2016 Apr 1;66(4):1807–12.
120. Qu L, Zhu F, Hong X, Gao W, Chen J, Sun X. Sunxiuqinia elliptica gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment in a sea cucumber farm. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Dec 1;61(12):2885–9.

121. Yoon J, Kang DH. *Terasakiella salincola* sp. nov., a marine alphaproteobacterium isolated from seawater, and emended description of the genus *Terasakiella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018 Jun 1;68(6):2048–53.
122. Jung YT, Park S, Lee JS, Yoon JH. *Loktanella marina* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016 Jul 1;66(7):2528–33.
123. Wu YH, Cheng H, Huo YY, Jin XB, Wang CS, Xu XW. *Henriciella pelagia* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 Aug 1;67(8):3020–5.
124. Bruns A, Rohde M, Berthe-Corti L. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001 Nov 1;51(6):1997–2006.
125. Kim JM, Jin HM, Jeon CO. *Muricauda taeanensis* sp. nov., isolated from a marine tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Jul 1;63(Pt\_7):2672–7.
126. Davidovich N, Pretto T, Sharon G, Zilberg D, Blum SE, Baider Z, et al. Cutaneous appearance of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum*, affecting gilthead seabream (*Sparus aurata*) cultured in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*. 2020 Nov;528:735507.
127. Zheng G, Chen ZG, Jiang RJ, Yang ZJ. *Feifantangia zhejiangensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater of the East China Sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 Dec;108(6):1441–7.
128. Yang C, Li Y, Guo Q, Lai Q, Wei J, Zheng T, et al. *Muricauda zhangzhouensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Jun 1;63(Pt\_6):2320–5.
129. Li AZ, Lin LZ, Zhang MX, Zhu HH. *Arenibacter antarcticus* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017 Nov 1;67(11):4601–5.
130. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jan;25(1):2–41.
131. Tang K, Su Y, Brackman G, Cui F, Zhang Y, Shi X, et al. MomL, a Novel Marine-Derived *N*-Acyl Homoserine Lactonase from *Muricauda olearia*. Parales RE, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Jan 15;81(2):774–82.
132. Lin D, Zhu S, Chen Y, Huang Y, Yang J, Chen J. *Paracoccus indicus* sp. nov., isolated from surface seawater in the Indian Ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2019 Jun;112(6):927–33.
133. Park S, Park JM, Kang CH, Yoon JH. *Aestuariiivens insulae* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015 Jun 1;65(Pt\_6):1883–8.
134. Venkateswaran K, Dohmoto N. *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000 Mar 1;50(2):565–74.

135. Egan S, Holmström C, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Jul 1;51(4):1499–504.
136. Kitamura R, Miura N, Ito M, Takagi T, Yamashiro H, Nishikawa Y, et al. Specific Detection of Coral-Associated *Ruegeria*, a Potential Probiotic Bacterium, in Corals and Subtropical Seawater. *Mar Biotechnol.* 2021 Aug;23(4):576–89.
137. Urios L, Agogué H, Lesongeur F, Stackebrandt E, Lebaron P. *Balneola vulgaris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes from the north-western Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Aug 1;56(8):1883–7.
138. Song J, Lim Y, Jang HJ, Joung Y, Kang I, Hong SJ, et al. Isolation and genome analysis of *Winogradskyella algicola* sp. nov., the dominant bacterial species associated with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *J Microbiol.* 2019 Nov;57(11):982–90.
139. Iino T, Ohkuma M, Kamagata Y, Amachi S. *Iodidimonas muriae* gen. nov., sp. nov., an aerobic iodide-oxidizing bacterium isolated from brine of a natural gas and iodine recovery facility, and proposals of Iodidimonadaceae fam. nov., Iodidimonadales ord. nov., Emcibacteraceae fam. nov. and Emcibacterales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Dec 1;66(12):5016–22.
140. Lee YW, Hoang TS, Rhee MS, Lee SY, Im WT. *Sinirhodobacter hankyongi* sp. nov., a novel denitrifying bacterium isolated from sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Jan 1;70(1):668–74.
141. Zhang Z, Yu C, Wang X, Yu S, Zhang XH. *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Feb 1;66(2):542–7.
142. Shivani Y, Subhash Y, Sasikala Ch, Ramana ChV. *Halodesulfovibrio spirochaetisodalis* gen. nov. sp. nov. and reclassification of four *Desulfovibrio* spp. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Jan 1;67(1):87–93.
143. Carro L, Mulas R, Pastor-Bueis R, Blanco D, Terrón A, González-Andrés F, et al. *Delftia rhizosphaerae* sp. nov. isolated from the rhizosphere of *Cistus ladanifer*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Jun 1;67(6):1957–60.
144. Matsumoto A, Kasai H, Matsuo Y, Shizuri Y, Ichikawa N, Fujita N, et al. *Ilumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Ilumatobacter coccineum* sp. nov., isolated from seashore sand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Sep 1;63(Pt\_9):3404–8.
145. Feng T, Kim KH, Chun BH, Jeon CO. *Amylibacter lutimaris* sp. nov., isolated from sea-tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018 Jun 1;68(6):2088–92.
146. Chernikova TN, Dallimore J, Lünsdorf H, Heipieper HJ, Golyshin PN. *Monaibacterium marinum*, gen. nov, sp. nov, a new member of the Alphaproteobacteria isolated from seawater of Menai Straits, Wales, UK. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Sep 1;67(9):3310–7.

147. Hameed A, Shahina M, Lin SY, Lai WA, Hsu YH, Liu YC, et al. *Shimia biformata* sp. nov., isolated from surface seawater, and emended description of the genus *Shimia* Choi and Cho 2006. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Dec 1;63(Pt\_12):4533–9.
148. Xu ZX, Mu X, Zhang HX, Chen GJ, Du ZJ. *Marinifilum albidiflavum* sp. nov., isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Nov 1;66(11):4589–93.
149. Quéméneur M, Erauso G, Frouin E, Zeghal E, Vandecasteele C, Ollivier B, et al. Hydrostatic Pressure Helps to Cultivate an Original Anaerobic Bacterium From the Atlantis Massif Subseafloor (IODP Expedition 357): *Petrocella atlantisensis* gen. nov. sp. nov. *Front Microbiol.* 2019 Jul 16;10:1497.
150. Math RK, Jin HM, Jeong SH, Jeon CO. *Defluviimonas aestuarii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a tidal flat, and emended description of the genus *Defluviimonas* Foesel et al. 2011. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Aug 1;63(Pt\_8):2895–900.
151. Gomila M, Pinhassi J, Falsen E, Moore ERB, Lalucat J. *Kinneretia asaccharophila* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, a member of the *Rubrivivax* branch of the family Comamonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Apr 1;60(4):809–14.
152. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 Apr 1;70(4):2782–858.
153. Tindall BJ. *Marinobacter nauticus* (Baumann et al. 1972) comb. nov. arising from instances of synonymy and the incorrect interpretation of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Arch Microbiol.* 2020 Apr;202(3):657–63.
154. Zakharyuk A, Kozyreva L, Ariskina E, Troshina O, Kopitsyn D, Shcherbakova V. *Alkaliphilus namsaraevii* sp. nov., an alkaliphilic iron- and sulfur-reducing bacterium isolated from a steppe soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Jun 1;67(6):1990–5.
155. Xu XW, Wu YH, Wang CS, Oren A, Wu M. *Vibrio hangzhouensis* sp. nov., isolated from sediment of the East China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Aug 1;59(8):2099–103.
156. Liu Y, Du J, Zhang J, Lai Q, Shao Z, Zhu H. *Devosia marina* sp. nov., isolated from deep seawater of the South China Sea, and reclassification of *Devosia subaequoris* as a later heterotypic synonym of *Devosia soli*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020 May 1;70(5):3062–8.
157. Lau SCK, Tsoi MMY, Li X, Plakhotnikova I, Dobretsov S, Wu M, et al. Description of *Fabibacter halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Roseivirga spongicola* sp. nov., and reclassification of [*Marinicola*] *seohaensis* as *Roseivirga seohaensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 May 1;56(5):1059–65.
158. Martins P, Cleary DFR, Pires ACC, Rodrigues AM, Quintino V, Calado R, et al. Molecular Analysis of Bacterial Communities and Detection of Potential Pathogens in a

- Recirculating Aquaculture System for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*. Jiravanichpaisal P, editor. PLoS ONE. 2013 Nov 21;8(11):e80847.
159. Lee DE, Lee J, Kim YM, Myeong JI, Kim KH. Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *J Microbiol.* 2016 Apr;54(4):296–304.
  160. Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, Porchas-Cornejo MA, Gollas-Galván T, Scheuren-Acevedo S, Arvayo MA, et al. Bacterial diversity studied by next-generation sequencing in a mature phototrophic *Navicula* sp.-based biofilm promoted into a shrimp culture system. *Aquac Res.* 2017 May;48(5):2047–54.
  161. Battistuzzi FU, Hedges SB. A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. *Mol Biol Evol.* 2009 Feb 1;26(2):335–43.
  162. Degli Esposti M. Bioenergetic Evolution in Proteobacteria and Mitochondria. *Genome Biol Evol.* 2014 Dec;6(12):3238–51.
  163. Cui F, Dong S, Shi X, Zhao X, Zhang XH. Overexpression and Characterization of a Novel Thermostable  $\beta$ -Agarase YM01-3, from Marine Bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01T. *Mar Drugs.* 2014 May 12;12(5):2731–47.
  164. Sui X, He X yan, Liu N hua, Dang Y ru, Cha Q qian, Sun M ling, et al. *Marinifaba aquimaris* gen. nov., sp. nov., a novel chitin-degrading gammaproteobacterium in the family Alteromonadaceae isolated from seawater of the Mariana Trench. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2021 Jul;114(7):947–55.
  165. Institute of Tropical Aquaculture, Universiti Malaysia Terengganu, 21030 Kuala Terengganu, Terengganu, Malaysia, Harun AAC, Ghazali NA, Institute of Tropical Aquaculture, Universiti Malaysia Terengganu, 21030 Kuala Terengganu, Terengganu, Malaysia, Hashim NFC, Institute of Tropical Aquaculture, Universiti Malaysia Terengganu, 21030 Kuala Terengganu, Terengganu, Malaysia, et al. The potential of biofloculant-producing bacteria as inoculum for biofloc based systems. *J Environ Biol.* 2018 Sep 15;39(5(SI)):917–22.
  166. Fu W, Liao M, Zhang D, Zhou Y, Yang H. Studies on Biofloculant Production by *Pseudoalteromonas* sp. NUM8, a Marine Bacteria Isolated from the Circulating Seawater. *J Ocean Univ China.* 2021 Oct;20(5):1276–84.
  167. Peng LH, Liang X, Xu JK, Dobretsov S, Yang JL. Monospecific Biofilms of *Pseudoalteromonas* Promote Larval Settlement and Metamorphosis of *Mytilus coruscus*. *Sci Rep.* 2020 Feb 13;10(1):2577.
  168. Sharifah EN, Eguchi M. The Phytoplankton *Nannochloropsis oculata* Enhances the Ability of Roseobacter Clade Bacteria to Inhibit the Growth of Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Gilbert JA, editor. PLoS ONE. 2011 Oct 28;6(10):e26756.
  169. Sorokin DYu, Robertson LA, Kuenen JG. Sulfur cycling in *Catenococcus thiocyclus*. *FEMS Microbiol Ecol.* 1996 Feb;19(2):117–25.

170. Genc E, Kaya D, Genc MA, Keskin E, Yavuzcan H, Guroy D, et al. Effect of biofloc technology in *Farfantepenaeus aztecus* culture: The optimization of dietary protein level on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, and intestinal microbiota. *J World Aquac Soc.* 2023 Nov 14;jwas.13041.
171. Hasyimi W, Widanarni W, Yuhana M. Growth Performance and Intestinal Microbiota Diversity in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Fed with a Probiotic Bacterium, Honey Prebiotic, and Synbiotic. *Curr Microbiol.* 2020 Oct;77(10):2982–90.
172. Pan X, Liu Q, Wen L, Huang Y, Ma H, Lin Y, et al. RETRACTED: Improving tilapia (*Oreochromis mossambicus*) resistance to streptococcal disease by improving the gut biome through administration of the microorganisms *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*. *Aquac Rep.* 2021 Jul;20:100636.
173. J. Lin. Production and characterization of heavy-metal removing bacterial bioflocculants. *Afr J Biotechnol [Internet].* 2012 May 17 [cited 2023 Nov 29];11(40). Available from: <http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/17May/Lin%20and%20Harichund.htm>
174. Gutierrez T, Berry D, Yang T, Mishamandani S, McKay L, Teske A, et al. Role of Bacterial Exopolysaccharides (EPS) in the Fate of the Oil Released during the Deepwater Horizon Oil Spill. *Chin WC, editor. PLoS ONE.* 2013 Jun 27;8(6):e67717.
175. Cosa S, Mabinya LV, Olaniran AO, Okoh OO, Bernard K, Deyzel S, et al. Bioflocculant Production by *Virgibacillus* sp. Rob Isolated from the Bottom Sediment of Algoa Bay in the Eastern Cape, South Africa. *Molecules.* 2011 Mar 14;16(3):2431–42.
176. Schrijver RD, Ollevier F. Protein digestion in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*/ and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. 2000;
177. Medina A, Moriñigo MÁ, Arijo S. Selection of putative probiotics based on antigen-antibody cross-reaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi* for use in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquac Rep.* 2020 Jul;17:100366.
178. Medina A, García-Márquez J, Moriñigo MÁ, Arijo S. Effect of the Potential Probiotic *Vibrio proteolyticus* DCF12.2 on the Immune System of *Solea senegalensis* and Protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi*. *Fishes.* 2023 Jun 30;8(7):344.
179. García-Márquez J, Vizcaíno AJ, Barany A, Galafat A, Ación G, Figueroa FL, et al. Evaluation of the Combined Administration of *Chlorella fusca* and *Vibrio proteolyticus* in Diets for *Chelon labrosus*: Effects on Growth, Metabolism, and Digestive Functionality. *Animals.* 2023 Feb 7;13(4):589.

180. Ray AJ, Lotz JM. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. *Aquac Eng.* 2014 Dec;63:54–61.
181. Wilén BM, Onuki M, Hermansson M, Lumley D, Mino T. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Res.* 2008 Apr;42(8–9):2300–8.
182. Kathia CM, Aida P, Jorge CM, Félix AGJ, Amadeo MJ. Effect of two probiotics on bacterial community composition from biofloc system and their impact on survival and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*).
183. Maia EDP, Alves Modesto G, Brito LO, Olivera Galvez A, Vasconcelos Gesteira TC. Intensive culture system of *Litopenaeus vannamei* in commercial ponds with zero water exchange and addition of molasses and probiotics. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2016 Apr;51(1):61–7.
184. Musa N, Wei LS, Wee W. Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Vibrio Harveyi* Isolated from Black Tiger Shrimp (*Penaeus Monodon*). 2008;
185. Baticados MCL, Lavilla-Pitogo CR, Cruz-Lacierda ER, Sunaz NA. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. 1990;
186. Mohny LL, Lightner DV, Bell TA. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *J World Aquac Soc.* 1994 Mar;25(1):116–25.
187. Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, et al. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Jun;65(6):2592–7.
188. López AM. Selección de probióticos inmunoestimulantes en lenguados (*Solea senegalensis* K) FRENTE A *Vibrio harveyi* Y *Photobacterium damsela* subsp. piscicida.
189. Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 2004 Apr;233(1–4):1–14.
190. Schaeck M, Duchateau L, Van Den Broeck W, Van Trappen S, De Vos P, Coulombet C, et al. *Vibrio lentus* protects gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae against challenge with *Vibrio harveyi*. *Vet Microbiol.* 2016 Mar;185:41–8.

## **Yayın ve Bildiriler**

1) Ercument Genc, Dogukan Kaya, Munevver Ayce Genc, Emre Keskin, Hijran Yavuzcan, Derya Guroy, Ahmet Gurler, Koray Umut Yaras, Atakan Pipilos, Berna Funda Ozbek, Bilgenur Harmansa Yilmaz, Mevlut Aktas. Effect of biofloc technology in *Farfantepenaeus aztecus* culture: The optimization of dietary protein level on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, and intestinal microbiota - Journal of the World Aquaculture Society, 2023

2) Hersi M.A., Genç E., Pipilos A., Keskin E. Effects of dietary synbiotics and biofloc meal on the growth, tissue histomorphology, whole-body composition and intestinal microbiota profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured at different salinities. - Aquaculture, 2023



Received: 20 April 2023 | Revised: 18 October 2023 | Accepted: 25 October 2023  
 DOI: 10.1111/jwas.13041

APPLIED RESEARCH

World Aquaculture Society | WILEY

## Effect of biofloc technology in *Farfantepenaeus aztecus* culture: The optimization of dietary protein level on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, and intestinal microbiota

Erçument Genc<sup>1</sup> | Dogukan Kaya<sup>2</sup> | Munevver Ayce Genc<sup>3</sup> |  
 Emre Keskin<sup>1</sup> | Hijran Yavuzcan<sup>1</sup> | Derya Guroy<sup>4</sup> |  
 Ahmet Gurler<sup>1</sup> | Koray Umut Yaras<sup>3</sup> | Atakan Pipilos<sup>1</sup> |  
 Berna Funda Ozbek<sup>3</sup> | Bilgenur Harmansa Yilmaz<sup>1</sup> | Mevlut Aktas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Department of Fisheries and Aquaculture Engineering, Ankara University, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tasliciftlik, Tokat, Turkey

<sup>3</sup>Marine Science and Technology Faculty, Department of Aquaculture, Iskenderun Technical University, Iskenderun, Hatay, Turkey

<sup>4</sup>Department of Aquaculture, Armutlu Vocational College, Yalova University, Yalova, Turkey

### Correspondence

Dogukan Kaya, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Tokat Gaziosmanpaşa University, 60010 Tasliciftlik, Tokat, Turkey.  
 Email: dogukan.kaya@gop.edu.tr

### Funding information

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Grant/Award Number: 121O713

### Abstract

In this study, a biofloc technology (BFT) based 90-day feeding trial was performed to estimate the effects of four different dietary protein levels (290, 320, 350 and 380 g protein kg<sup>-1</sup> diet; 29P, 32P, 35P, and 38P, respectively) on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, whole-body proximate and fatty acid composition and intestinal microbiota of *Farfantepenaeus aztecus*. Final weight, weight gain, and specific growth rate improved with protein levels up to 35P per kg of diet, below which decreased significantly. Significant differences were observed in total hemocyte count, acid phosphatase, respiratory burst, glutathione, alkaline phosphatase, and total antioxidant capacity indices of shrimp fed different dietary protein levels. Protease, lipase, and amylase activities of shrimp were also affected by dietary protein levels. Proteobacteria was the most abundant bacteria among the groups. Overall, this study revealed that using 35% dietary protein is optimal in

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.  
 © 2023 The Authors. *Journal of the World Aquaculture Society* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of World Aquaculture Society.

*J World Aquac Soc.* 2023;1–19.

[wileyonlinelibrary.com/journal/jwas](https://wileyonlinelibrary.com/journal/jwas) | 1

*F. aztecus* culture under environmentally friendly BFT conditions. Furthermore, these results provide a theoretical basis for future research on the evaluation of functional ingredients in diet for more economical production of *F. aztecus* at optimal protein levels.

#### KEYWORDS

dietary protein, digestive enzyme activity, immune response, microbiota, shrimp culture

## 1 | INTRODUCTION

The consumption capacity of diversified and nutritious foods has increased with the significant contributions made to aquaculture production in the last two decades (Ahmed & Ahmad, 2020). The demand for aquatic products for human consumption has dramatically enhanced as a result of the increasing population and public awareness (FAO, 2020). To meet the increasing demand, nutritionally balanced ingredients for the species must be formulated at the lowest cost, ensuring optimal growth performance (Jia et al., 2022). Protein is the primary ingredient of the diet for growth in cultured species. Dietary protein directly affects healthy growth, feed intake, and feed costs in aquaculture and is the most expensive nutrient in the diet (Sivaramakrishnan et al., 2022). Fishmeal is the primary source of protein in aquaculture feed and has high percentages in aquaculture formulations (Wang et al., 2022). This is as a result of its high protein content, balanced amino acid composition, and fatty acid profile (Tacon & Metlan, 2015). However, reducing the amount of fishmeal in the diet may cause changes in gut microbiota (J. X. Liu et al., 2022; Yang et al., 2022) and digestive enzyme activity, antioxidant activity, and immune response of cultured species may also be negatively affected, resulting in reduced growth performance (Chaklader et al., 2020). In this context, exploring new approaches to support healthy growth is vital to minimize the potential impacts of increasing fishmeal shortages in aquaculture. Biofloc technology (BFT) is an innovative technique in aquaculture that maintains water quality with minimal or no water changes, increases growth performance, and improves the feed conversion ratio (Avnimelech, 2015; Mansour et al., 2022). Biofloc in the rearing water is consumed by cultured species as extra food and can replace a considerable part of dietary protein (Sharawy et al., 2022; Yun et al., 2016). Khanjani (2015) concluded that approximately 30% of the daily nutrient intake in *Litopenaeus vannamei* could be supplied by biofloc. Megahed and Mohamed (2014) also stated that dietary protein levels could be reduced from 45% to 25% in the BFT without affecting growth in *Fenneropenaeus indicus* culture. Through the biochemical composition of biofloc, essential nutrients such as protein can be provided for the cultured species (Khanjani & Sharifinia, 2020).

Penaeid shrimps are the most valuable resource among crustaceans in the aquaculture industry (FAO, 2020; Kaya et al., 2020). Brown shrimp, *Farfantepenaeus aztecus* (also known as *Penaeus aztecus*) of western Atlantic origin, is regarded as one of the most important commercial species in the Atlantic Coast United States and the Gulf of Mexico (Al-Badran et al., 2019). The first record of brown shrimp in the Mediterranean was reported in 2009 from the Antalya coast (Deval et al., 2010) and then from the coastal regions from Finike to Iskenderun (Eastern Mediterranean coast, Turkey) (Gökoğlu & Özvarol, 2013; Stergiou et al., 2014). Evaluation of culture conditions and optimization of dietary protein requirement in BFT of brown shrimp is unknown and this knowledge is necessary to develop a species-specific nutritionally balanced diet (Chen et al., 2023; Klett & Watson, 2020). For this reason, we aimed to reveal the aquaculture performance of this species, which can be an alternative/candidate for crustacean culture. In this study, the effects of feeding brown shrimp juveniles feed with different protein levels in the BFT system on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, and gut microbiota profile were evaluated for the first time.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study location and shrimp supply

The experiment was carried out at the Fisheries Research and Application Unit, Faculty of Agriculture, Ankara University, Ankara, Turkey. In the study, juvenile brown shrimp was used. Production of shrimps was performed at the Research Unit, Faculty of Marine Sciences, Iskenderun Technical University, Hatay, Turkey. After the spawning of brown shrimp broodstock, the incubation period and the hatching of eggs were accomplished. Until the juvenile stage, feeding of larvae and postlarvae was applied with algae, *Artemia*, and micro diet. Juvenile shrimps (<1 g) were transported to the Fisheries Research and Application Unit in a plastic tank (200 L) under aeration conditions 15 days before the experiment.

### 2.2 | Feed formulation and preparation of experimental diets

The main protein sources were fish meal, soy protein concentrate, soybean meal, wheat gluten, corn gluten, and pea protein. Fish oil and soybean oil were used as the primary lipid sources. The protein level of the prepared shrimp diet is within the range recommended for shrimp by the National Research Council (2011). Four experimental diets were formulated to contain different levels (38%, 35%, 32%, and 29%) of dietary protein with a lipid level of 10.4%. The ingredients and nutritional composition of the diets are listed in Table 1. Dry mixing ingredients with fish oil manufactured diets

TABLE 1 Formulation and proximate composition of experimental diets.

Ingredients	P38	P35	P32	P29
Fish meal	30	24.2	19	14.2
Soy protein concentrate	4	4	4	4
Soybean meal	8	8	8	8
Wheat gluten	1	1	1	1
Corn gluten	12	12	12	12
Pea protein concentrate	2	2	2	2
Wheat flour	27.8	33.4	38.3	42.7
Wheat middlings	5	5	5	5
Fish oil:soy oil (1:1)	6	6.2	6.5	6.9
Vitamins premix	0.5	0.5	0.5	0.5
Minerals premix	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin C	0.1	0.1	0.1	0.1
Guar gum	3	3	3	3
Cholesterol	0.4	0.4	0.4	0.4
Total (-)	100	100	100	100
Proximate composition (%) <sup>a</sup>				
Crude protein	37.94 ± 0.26	35.09 ± 0.31	32.24 ± 0.28	28.76 ± 0.39
Crude fat	10.33 ± 0.64	10.37 ± 0.48	10.42 ± 0.60	10.44 ± 0.44
Ash	7.76 ± 0.19	7.42 ± 0.18	7.36 ± 0.44	7.33 ± 0.27
Crude cellulose	1.87 ± 0.24	1.99 ± 0.19	2.14 ± 0.33	2.3 ± 0.17
Moisture	11.18 ± 0.53	11.12 ± 0.48	11.17 ± 0.44	11.18 ± 0.48

<sup>a</sup>Results are given as mean (±SD).

TABLE 2 The profiles of amino acids in the experimental diets ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Amino acids	38P	35P	32P	29P
Methionine	0.79	0.76	0.75	0.73
Cystine	0.49	0.47	0.46	0.42
Lysine	2.23	2.21	2.20	2.17
Tryptophan	0.28	0.26	0.26	0.21
Threonine	1.12	1.10	1.09	1.07
Isoleucine	1.41	1.40	1.40	1.40
Histidine	0.97	0.95	0.95	0.94
Valine	1.56	1.54	1.52	1.51
Leucine	3.04	3.02	3.01	3.00
Arginine	1.73	1.72	1.72	1.70
Phenylalanine	2.42	2.41	2.40	2.38

before utilizing a laboratory food mixer. The mixing was continued until a homogenous blend was obtained. The resulting paste was extruded through a cold press extruder (PTM P6 Extruder System) using a 1 mm aperture die. All diets were subsequently dried in a dehumidifying oven for 24 h at 40°C and then stored in plastic bags at -18°C until required.

The profiles of amino acids and fatty acids in the diets are detailed in Tables 2 and 3.

### 2.3 | Experimental setup and culture conditions

A 90-day experiment was conducted in four indoor recirculating aquaculture systems (RAS) with 3 fiberglass tanks each (45 L, 20 cm water depth) with a bottom area of 0.24 m<sup>2</sup> and 4 L min<sup>-1</sup> water flow per tank. The RAS was set up before the experiment (34 ± 1 ppt, 28 ± 1°C) using artificial seawater (Caledonia Reef Salt, Reeflowers, Istanbul, Turkey) with produced biofloc with an optimal C:N ratio of 15:1 (Avnimelech, 2012). The C:N ratio of the feed utilized was 8.19, and daily additions of 601.4 g sugar beet molasses as a commonly available carbon source (procured from Ankara Sugar Company, Turkey, 50% carbon content) were made per 1 kg feed to achieve a C:N ratio of 15:1. The experiment commenced once the biofloc volume reached 10 mL L<sup>-1</sup>. To maintain the ideal C:N ratio, molasses was added throughout the trial after feeding. During the trial period, the biofloc volume was measured daily using the Imhoff cone.

The shrimp were acclimated (15 min, 1 ppt) in a fiberglass tank (250 L water volume) filled with aerated artificial seawater (34 ± 1 g L<sup>-1</sup> and 28 ± 1°C) for 15 days before the beginning of the experiment. The shrimp were fed thrice daily with the control diet (38% CP) during the acclimation period.

A total of 240 healthy juveniles of *F. aztecus* (weighing 0.840 ± 0.41 g) were randomly stocked in 12 experimental units, each containing 20 shrimp (83 shrimps m<sup>-2</sup>). The 12 experimental units were divided into four treatments with three replicates. In the experiment, 12 h of light and 12 h of dark photoperiod were applied using a timer, and feeding was performed three times daily at 08.00, 13.00, and 18.00 h. Feeding was started at 6% of body weight and gradually reduced by 0.6% every 15 days to 3%. A refractometer was utilized to monitor the optimal salinity daily (34 ppt). In addition, high-quality freshwater (obtained via a reverse osmosis system) was used in the RAS to balance out any salinity increase as a result of evaporation losses.

### 2.4 | Water quality

During the experiment, water temperature, salinity, pH, and dissolved oxygen values (YSI® 556, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) were measured daily to maintain optimum levels. Daily follow-up was performed using an

TABLE 3 The profiles of fatty acids in the experimental diets ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Fatty acids	38P	35P	32P	29P
12:0	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02
13:0	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02
14:0	1.70 ± 0.03	1.51 ± 0.06	1.58 ± 0.02	1.57 ± 0.02
15:0	0.78 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.65 ± 0.05	0.64 ± 0.01
16:0	13.03 ± 0.45	11.70 ± 0.46	11.30 ± 1.01	13.19 ± 0.12
17:0	1.15 ± 0.14	1.24 ± 0.12	1.08 ± 0.14	1.13 ± 0.13
18:0	8.38 ± 0.08	8.09 ± 0.11	8.08 ± 0.01	8.29 ± 0.08
20:0	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.03
21:0	0.07 ± 0.06	0.09 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.14 ± 0.04
22:0	0.98 ± 0.06	0.95 ± 0.06	0.83 ± 0.09	1.02 ± 0.01
23:0	0.60 ± 0.04	0.44 ± 0.02	0.45 ± 0.06	0.57 ± 0.03
24:0	0.82 ± 0.09	0.81 ± 0.07	0.84 ± 0.06	0.79 ± 0.03
∑SFA	27.73	27.88	25.72	25.05
14:1n-9	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
15:1n-9	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01
16:1n-7	6.11 ± 0.09	5.66 ± 0.37	5.13 ± 0.16	6.03 ± 0.04
17:1n-9	0.40 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.45 ± 0.03
18:1n-9t	0.33 ± 0.07	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.40 ± 0.02
18:1n-9c	10.61 ± 0.13	10.37 ± 0.04	10.37 ± 0.04	11.03 ± 0.04
20:1n-9	0.72 ± 0.02	0.68 ± 0.04	0.69 ± 0.08	0.74 ± 0.01
22:1n-9	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.35 ± 0.01
24:1n-9	2.00 ± 0.10	2.08 ± 0.17	1.97 ± 0.10	2.05 ± 0.16
∑MUFA	21.07	20.49	19.77	19.06
18:2n-6t <sup>a</sup>	0.80 ± 0.03	0.89 ± 0.04	0.82 ± 0.02	0.88 ± 0.05
18:2n-6c <sup>a</sup>	1.24 ± 0.05	1.13 ± 0.04	1.17 ± 0.02	1.27 ± 0.04
18:3n-6 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.69 ± 0.02
20:2n-6 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.03	0.66 ± 0.04	0.62 ± 0.01	0.72 ± 0.02
20:4n-6	6.40 ± 0.05	6.36 ± 0.03	6.25 ± 0.03	6.42 ± 0.02
∑n-6	9.98	9.81	9.57	9.37
18:3n-3 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.34 ± 0.02
20:3n-3 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.07	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.02	1.56 ± 0.03
20:5n-3 <sup>a</sup>	11.12 ± 0.03	11.08 ± 0.01	11.01 ± 0.01	11.23 ± 0.07
22:6n-3 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.03	7.64 ± 0.01	7.52 ± 0.01	7.91 ± 0.04
∑n-3	21.04	20.69	20.49	20.30
∑PUFA	31.02	30.50	30.06	29.67
n-3/n-6	2.11	2.11	2.14	2.17

Abbreviations: ∑MUFA: monounsaturated fatty acid; ∑PUFA: polyunsaturated fatty acid; ∑SFA: saturated fatty acid.  
<sup>a</sup>∑PUFA: 18:2n-6t, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6t, 20:2n-6c, 20:4n-6, 20:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3. Results are given as mean (±SD).

Imhoff cone to keep the amount of suspended biofloc within the recommended range of 10–20 mL L<sup>-1</sup> for the systems. In addition, total ammonia, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, alkalinity, and phosphate levels were determined in water samples taken at five-day intervals (Iris Visible Spectrophotometer, HI801-01 model, Hanna Instruments, USA).

## 2.5 | Sampling procedures and growth performance calculations

At the beginning of the experiment, the posterior digestive contents of five shrimps were sampled following the protocol for the molecular analysis of bacterial diversity. Also, the shrimp samples were taken for bacterial diversity analyses on the 45th ( $n = 6$ ) and 90th ( $n = 6$ ) days of the trials. For proximate analysis, at the beginning (20 shrimps) and end of the experiment ( $n = 18$ ) shrimps were sampled. For digestive enzyme activity, non-specific immune parameters, and antioxidant enzyme activity analyses, at the beginning of the trial (20 shrimps) and at the end of the trial ( $n = 24$ ) shrimps were sampled. At the end of the experiment, proximate analysis was also carried out from the biofloc water (50  $\mu$ m plankton mesh).

Following the experiment, the growth parameters were calculated using the formulas below.

$$\text{Weight gain (WG; g/shrimp)} = \text{Final weight (g)} - \text{Initial weight (g)},$$

$$\text{Daily weight gain (DWG; g/shrimp)} = (\text{Final weight (g)} - \text{Initial weight (g)})/\text{days},$$

$$\text{Weekly weight gain (WWG; g/shrimp)} = (\text{Final weight (g)} - \text{Initial weight (g)})/\text{weeks},$$

$$\text{Weight gain (WG; \%)} = 100 \times (\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)})/\text{initial weight (g)},$$

$$\text{Feed conversion ratio (FCR)} = \text{Total feed given (g)}/\text{Weight gain (g)},$$

$$\text{Specific growth rate (SGR; \% /day)} = ((\ln (\text{final weight}) - \ln (\text{initial weight}))/\text{days}) \times 100,$$

$$\text{Protein efficiency ratio (PER)} = \text{Weight gain (g)}/\text{Protein intake (g)},$$

$$\text{Feed conversion ratio (FCR; \%)} = \text{Feed intake (g)}/\text{Weight gain (g)},$$

$$\text{Survival rate (SR; \%)} = (\text{Shrimp final number} - \text{shrimp initial number}) \times 100.$$

## 2.6 | Proximate compositions

Experimental diet, biofloc, and shrimp were analyzed for the dry matter and crude ash levels (AOAC, 2000). The Kjeldahl method was employed to determine crude protein levels by measuring nitrogen (Nx6.25). An automated extraction method ANKOM XT-15 (Macedon, NY) was utilized to determine crude lipid levels.

The total lipid extraction of experimental diets and the whole-body shrimp were performed by chloroform/methanol method for fatty acid analysis. The lipid was methanolized using boron trifluoride (BF<sub>3</sub>) after adding methanol to the sample. 1–2 mL of the upper heptane phase was taken with a micropipette and transferred to a test tube. Fatty acid methyl esters were separated and identified by gas chromatography using a 30 m  $\times$  0.25 mm capillary column. Hydrogen was used as the carrier gas, and the temperature reached 200°C in 20 min and 220°C in

10 min, respectively. The peaks were defined according to standards (Supelco, fatty acid methyl esters, and fish oil) (AOAC, 2000).

Hydrolysis of the samples was carried out according to the hydrolysis method of an amino acid analyzer according to AOAC (2000). The sample containing 30 mg of protein was weighed and transferred to the hydrolysis tube. 10 mL of 6 N HCl was added, and the oxygen in the tube was removed by passing nitrogen gas. In the filtered sample, HCl was evaporated at 60°C under a high vacuum in the evaporator. The remaining residue was diluted with sodium citrate buffer solution with a pH of 2.2 to the desired volume and made ready for analysis.

## 2.7 | Digestive enzyme activity

To evaluate enzymatic activity, the hepatopancreas samples were homogenized in ice-cold water at a ratio of 1:9 (w/v) and subsequently centrifuged at 1800g for 30 min at 4°C. The resulting supernatant from the cold hepatopancreas was used for analysis (Shao et al., 2018). The enzymatic activities of trypsin,  $\alpha$ -amylase, and lipase were determined using the commercial kits (Elabscience, USA).

## 2.8 | Non-specific immune parameters

Hemolymph was withdrawn from the basement of the second pereopods of the shrimp and pooled using sterile syringes. The shrimp was washed with sterile seawater before hemolymph puncture. After collection, the hemolymph was refrigerated at 4°C for 24 h to induce coagulation. Next, the sample was subjected to -20°C for 10 min and allowed to thaw shortly after. This process was repeated three times in succession. Subsequently, the sample was centrifuged three times at 15000g for 15 min. The resulting serum was collected, transferred to an Eppendorf tube, and stored at -20°C until analysis (Sabry Neto & Nunes, 2015).

Phenoloxidase (PO) was determined by the spectrophotometric method based on the measurement of L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) formation (Hernández-López, 1996). The total hemocyte count (THC) was estimated by an optical microscope using a Neubauer hemocytometer chamber. The production of superoxide anions was measured by determining the respiratory burst activity (RB) of the hemocytes, which involved reducing nitro blue tetrazolium (NBT) to formazan (Song & Hsieh, 1994). For the measurements of activities of the total anti-oxidative capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), glutathione, alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP) in serum, the kits (Sigma-Aldrich) were used according to the manufacturer's protocols.

## 2.9 | Analysis of microbial diversity in shrimp gut

The posterior digestive contents of shrimps were suspended in 2 mL Fix RNA (EuRx) solution in a sterile tube. DNA extraction from posterior digestive contents was performed directly from feces using the EuRx Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (EuRx) according to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of extracted DNA were measured with the SPECTROstar Nano Spectrometer device. 16S Universal bacterial primers encoded 16S Forward and 16S Reverse were utilized to enrich each sample's 16S rDNA V3 and V4 regions. Amplification of 16S rDNA genes was performed with the following primers: 16sV3F (ACTCCTACGGGAGGCGAGCAGT) and 16sV3R (ACCGCGCTGCTGGCAC).

The primer set offering the highest efficacy was selected for use in the experiment (Çelik & Keskin, 2022). PCR was performed with a primary heating step for 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 45 s at 53°C, and extension for 25 s at 72°C, then followed by a final extension step for 5 min at 72°C. Each 10  $\mu$ L reaction mixture contained 2  $\mu$ L of 5 $\times$  Promega Colorless GoTaq Flexi buffer, 0.5  $\mu$ L DNA,

1.5  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.8  $\mu\text{L}$  of 3.2  $\mu\text{M}$  dNTP, 0.5  $\mu\text{L}$  of each primer (5 pmol/mL), 0.05  $\mu\text{L}$  of Taq DNA polymerase, and sterile water to a final volume of 10  $\mu\text{L}$ .

Sequencing libraries were generated using Nextera DNA Prep Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations, and index codes were added. The samples were then sequenced bidirectionally ( $2 \times 150\text{bp}$ ) on an Illumina iSeq 100 platform. ".fastq" files that obtained from the iSeq 100 device were analyzed using the "ObiTools" package (Boyer et al., 2016). After reads including taxonomic profiling, alignment, and identification were completed the visualization, analysis, and identification of OTU groups in each sample and reporting of the resulting data were applied using Geneious Prime and SILVAngs (Kaya et al., 2020; Quast et al., 2012).

## 2.10 | Data analysis

Analyses were performed on the data sets using the SPSS 17 (Chicago, IL, USA) statistical package program. Before analysis (analysis of variance, Duncan), assumptions were tested. First, the skewness and kurtosis statistics were taken into account for all groups and were examined in terms of normality assumptions, and the homogeneity of the variances was evaluated with the Levene test. All data were given as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance was regarded as  $p < 0.05$ . The broken-line model was used to determine protein requirements. Estimating the optimum dietary protein requirement was predicted from a segmented regression model of the SGR against the dietary protein level using broken-line model analysis (Oosterbaan, 1994).

## 3 | RESULTS

Water quality parameters of the biofloc rearing mediums are summarized in Table 4. All water quality parameters remained desired ranges for BFT and there were no significant differences among the groups.

Increasing dietary protein levels significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced FW, WG, and SGR indices, as presented in Table 5. FW was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the 38P and 35P than in other treatments. 38P had an intermediate effect on WG and SGR parameters which indicated they were similar to 35P and 32P treatments ( $p > 0.05$ ). PER of shrimp was improved in decreasing protein levels, with the highest in the 29P group ( $p < 0.05$ ). However, FCR and SR were not affected by different dietary protein levels ( $p > 0.05$ ).

TABLE 4 Water quality parameters of rearing waters at 90 days culture period.

Parameters	38P	35P	32P	29P	N
Water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	28.24 $\pm$ 0.26	28.29 $\pm$ 0.29	28.24 $\pm$ 0.31	28.24 $\pm$ 0.20	90
Dissolved oxygen ( $\text{mg L}^{-1}$ )	6.56 $\pm$ 0.23	6.42 $\pm$ 0.28	6.46 $\pm$ 0.32	6.45 $\pm$ 0.35	90
pH	8.07 $\pm$ 0.17	7.99 $\pm$ 0.11	8.02 $\pm$ 0.13	7.96 $\pm$ 0.19	90
Nitrite ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.36 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	18
Nitrate ( $\text{mg L}^{-1}$ )	10.98 $\pm$ 0.88	10.92 $\pm$ 0.75	10.66 $\pm$ 0.63	10.75 $\pm$ 0.64	18
Ammonia ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.42 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	18
Alkalinity ( $\text{mg L}^{-1}$ )	104.06 $\pm$ 4.93	105.11 $\pm$ 5.55	104.33 $\pm$ 5.74	104.78 $\pm$ 5.33	18
Phosphate ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.70 $\pm$ 0.04	0.70 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.03	18
Biofloc volume ( $\text{ml L}^{-1}$ )	13.50 $\pm$ 1.20	13.35 $\pm$ 1.33	13.52 $\pm$ 1.41	13.10 $\pm$ 1.45	90

Note: N: sampling number.

TABLE 5 Growth performance of *Farfantepenaeus aztecus* fed diets with decreasing protein levels.

Parameters	38P	35P	32P	29P
IW (g)	0.841 ± 0.032	0.840 ± 0.038	0.839 ± 0.054	0.839 ± 0.044
FW (g)	10.016 ± 0.489 <sup>b</sup>	10.010 ± 0.665 <sup>b</sup>	9.702 ± 0.269 <sup>a</sup>	9.357 ± 0.320 <sup>a</sup>
WG (g)	9.088 ± 0.219 <sup>bc</sup>	9.270 ± 0.075 <sup>c</sup>	8.863 ± 0.077 <sup>b</sup>	8.518 ± 0.053 <sup>a</sup>
DWG (g)	0.101 ± 0.002 <sup>bc</sup>	0.103 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.098 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.095 ± 0.001 <sup>a</sup>
WWG (g)	0.707 ± 0.017 <sup>bc</sup>	0.721 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.689 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.662 ± 0.004 <sup>a</sup>
WG (%)	1081.216 ± 26.897 <sup>bc</sup>	1103.205 ± 6.393 <sup>c</sup>	1056.989 ± 8.908 <sup>b</sup>	1015.060 ± 7.229 <sup>a</sup>
SGR (% day <sup>-1</sup> )	2.743 ± 0.025 <sup>bc</sup>	2.764 ± 0.006 <sup>c</sup>	2.720 ± 0.009 <sup>b</sup>	2.679 ± 0.007 <sup>a</sup>
PER	1.930 ± 0.068 <sup>a</sup>	2.103 ± 0.075 <sup>b</sup>	2.282 ± 0.057 <sup>c</sup>	2.411 ± 0.045 <sup>d</sup>
FCR	1.365 ± 0.048 <sup>a</sup>	1.360 ± 0.049 <sup>a</sup>	1.370 ± 0.034 <sup>a</sup>	1.431 ± 0.027 <sup>a</sup>
SR (%)	88.333 ± 7.638 <sup>a</sup>	86.667 ± 7.638 <sup>a</sup>	85.000 ± 5.000 <sup>a</sup>	85.000 ± 5.000 <sup>a</sup>

Note: Results are given as mean (±SD). Values in the same row with different superscripts indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

Abbreviations: DWG, Daily weight gain; FCR, feed conversion ratio; FW, final weight; IW, initial weight; PER, protein efficiency ratio; SGR, specific growth rate; SR, survival rate; WG, weight gain; WWG, weekly weight gain.

Broken-line analysis of the SGR showed that 34.40% dietary protein had the optimum effect on shrimp's specific growth rate under the BFT culture conditions. The yield reduced after this threshold (breakpoint, knot) (Figure 1).

On the other hand, no breakpoint was observed in the segmented regression analysis for the optimum protein levels in the feed for the highest protein efficiency ratio. In other words, as shown in Figure 2, the model suggests  $BPx = X_{min}$ . In this equation, BPx stands for the breakpoint on the x-axis and  $X_{min}$  represents the minimum value of the independent variable. The results suggest that the breakpoint (BPx) equals the minimum value of the dietary protein level (%). This implies that the segmented regression model has no breakpoint and the highest protein efficiency rate is located at the minimum value of the dietary protein level with 29%.

The proximate composition of the crude protein was different in the 38P and 35P treatments, indicating that whole-body crude protein was affected by different dietary protein levels in BFT ( $p < 0.05$ ). However, crude lipids showed no significant difference among the groups ( $p > 0.05$ ) (Table 6).

Proximate analysis of biofloc is shown in Table 7. The filtered bioflocs of the rearing waters showed no differences among the groups.

Whole-body fatty acid analysis of the shrimp fed with different dietary protein levels is presented in Table 8. An apparent increase in SFA and MUFA compositions was noticed in shrimp fed at 38% and 35% crude protein levels ( $p < 0.05$ ). Total n-6 fatty acids in the whole body increased trend when the diet contained a 35% crude protein level ( $p < 0.05$ ). PUFA and total n-3 fatty acids had the highest amounts in the shrimp fed with 35% crude protein in the diet ( $p < 0.05$ ).

As shown in Table 9, THC and ACP indices were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the 38P and 35P than in the 32P and 29P treatments. 38P showed the highest RB and Glutathione activities of all treatments ( $p < 0.05$ ). The highest ALP activities were observed in the 32P group, and there was a statistical difference compared to the 38P group ( $p < 0.05$ ). However, PO and SOD activities did not indicate any statistical difference among the treatments ( $p > 0.05$ ). While the highest T-AOC activities were recorded in 38P, 35P had an intermediate effect on T-AOC activities which stated there were similar compared to other treatments ( $p > 0.05$ ).

Dietary protein levels significantly ( $p < 0.05$ ) affected the protease activity of shrimp, with the highest value in the 38P treatment. 32P had an intermediate effect on protease activities with the 35P and 29P groups

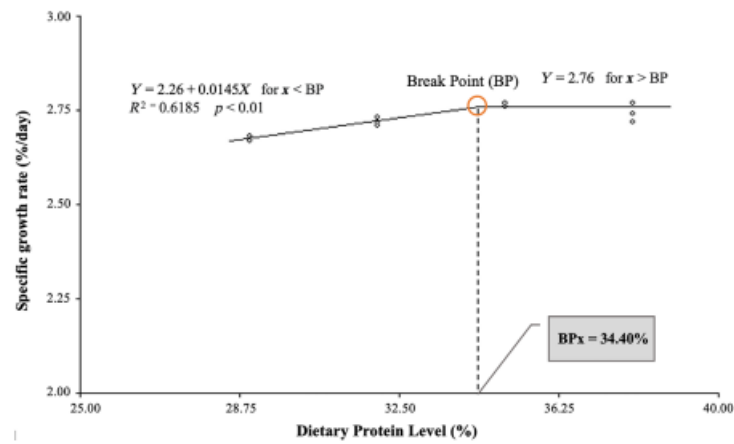


FIGURE 1 Relationship between dietary protein level and specific growth rate of shrimp fed the experimental diets.

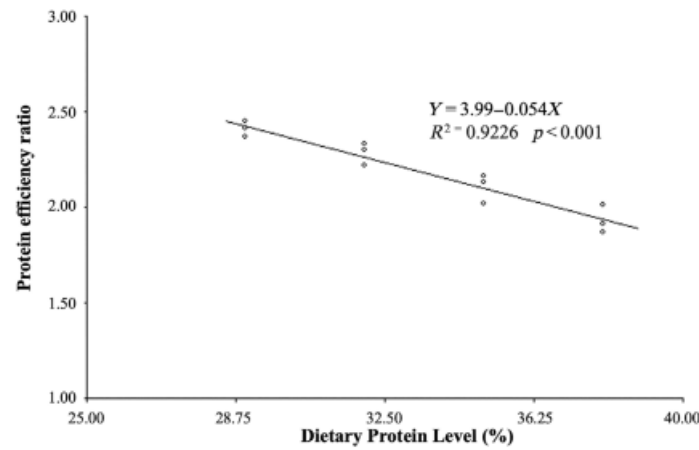


FIGURE 2 Relationship between dietary protein level and protein efficiency ratio of shrimp fed the experimental diets.

( $p > 0.05$ ). 38P and 35P groups were higher than the 32P and 29P groups in terms of amylase activities ( $p < 0.05$ ). The lipase activity was significantly ( $p < 0.05$ ) increased in the 38P, 35P, and 32P, whereas the 29P was lower (Table 10).

TABLE 6 Whole body composition of *Farfantepenaeus aztecus* fed diets with decreasing protein levels (% dry weight).

	Initial	38P	35P	32P	29P
Dry matter	21.01 ± 0.61	24.22 ± 0.99 <sup>a</sup>	25.22 ± 0.63 <sup>a</sup>	24.82 ± 1.19 <sup>a</sup>	23.45 ± 0.55 <sup>a</sup>
Crude ash	10.59 ± 0.18	14.92 ± 0.17 <sup>a</sup>	14.93 ± 0.14 <sup>a</sup>	15.41 ± 0.44 <sup>ab</sup>	15.84 ± 0.43 <sup>b</sup>
Crude lipid	2.78 ± 0.17	3.58 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.93 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.06 <sup>a</sup>
Crude protein	70.87 ± 0.36	76.24 ± 0.37 <sup>b</sup>	76.52 ± 0.51 <sup>b</sup>	74.95 ± 0.51 <sup>a</sup>	74.72 ± 0.44 <sup>a</sup>

Note: Results are given as mean (±SD). Values in the same row with different superscripts indicate significant differences except for the initial column ( $p < 0.05$ ).

TABLE 7 Proximate composition of biofloc (%).

	38P	35P	32P	29P
Crude ash	48.33 ± 0.21	48.23 ± 0.32	48.37 ± 0.40	48.37 ± 0.40
Crude lipid	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.02
Crude protein	23.53 ± 0.31	23.47 ± 0.32	23.47 ± 0.35	23.47 ± 0.40

The bacterial composition in the shrimp gut microbiota is presented in Figure 3. The most abundant phyla in the initial gut microbiota of shrimp were determined as Proteobacteria (54%), Firmicutes (22%), Bacteroidota (10%), Actinobacteria (7%), Verrucomicrobiota (2%), respectively. In the mid of the experiment (45 days), Proteobacteria showed the most intensity among the groups, and Bacteroidota was the second most abundant phylum in the 38P, 35P, and 29P groups, while Firmicutes was the second most abundant phylum in the 32P group. At the end of the experiment, Proteobacteria remained the most abundant bacteria in the 38P, 35P, 32P, and 29P groups, 83, 68, 73, and 76%, respectively. Firmicutes was the second most common bacteria in the 38P (5%) and 35P (17%) groups, while Bacteroidota was the second most common in the 32P (12%) and 29P (13%) groups.

The species-level bacterial density (>1%) of the shrimp gut microbiota at the initial, mid, and end of the experiment is presented in Figure 4. Initial shrimp gut microbiota composed most intensity with *Cribrihabitans pelagius* (16.69%), *Spongilmonas flava* (10.22%), *Ruegeria marisrubri* (6.12%), *Vibrio hyugaensis* (5.73%), *Ruegeria meonggei* (3.65%), *Pararhizobium haloflavum* (3.60%), *Vibrio alginolyticus* (2.19%), *Vibrio hangzhouensis* (2.02%), *Amylibacter lutimaris* (1.80%), *Tritonibacter multivorans* (1.80%), *Demequina litorisediminis* (1.80%), *Vibrio tapetis* (1.57%), *Microvirga massiliensis* (1.35%), *Vibrio barjoei* (1.01%), and *Litorisediminivivens gilvus* (1.01%). In the 38P group, *Cribrihabitans pelagius*, *Spongilmonas flava*, and *Ruegeria marisrubri* densities decreased at the end of the trial, while *Vibrio hyugaensis* (19.91%), *Vibrio barjoei* (12.44%), and *Vibrio jasicida* (11.51%) were the most common bacteria. Similarly, in the 35P and 32P groups, *Vibrio hyugaensis* (20.49% and 17.63%), *Vibrio barjoei* (14.71% and 10.64%), and *Vibrio jasicida* (13.62% and 9.54%) were the most common bacteria at the end of the trial. In the 29P group, the most common bacteria were determined as *Vibrio hyugaensis* (10.81%), *Vibrio tapetis* (9.04%), and *Vibrio jasicida* (6.67%).

#### 4 | DISCUSSION

Previous studies have reported that reduction of dietary protein content under BFT conditions can be achieved in shrimp without negatively affecting growth. It has been reported that BFT conditions can reduce the protein content of the diet by at least 5% in the culture of *L. vannamei* (Olier et al., 2020). In our study, shrimp fed 3% less crude protein (5.8% less fish meal) with BFT conditions showed similar growth performance to shrimp cultured on a 38% protein diet. Furthermore, broken line regression analysis of SGR data indicated that the optimal dietary protein level

TABLE 8 Whole body fatty acid composition of *Farfantepenaeus aztecus* fed diets with decreasing protein levels ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

Fatty acid	Initial	38P	35P	32P	29P
12:0	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>
13:0	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>
14:0	1.49 ± 0.04	1.53 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.44 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.03 <sup>b</sup>
15:0	0.69 ± 0.02	0.61 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.54 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>b</sup>
16:0	12.33 ± 0.61	13.12 ± 0.13 <sup>b</sup>	13.03 ± 0.48 <sup>b</sup>	11.65 ± 0.44 <sup>a</sup>	11.25 ± 1.00 <sup>a</sup>
17:0	0.95 ± 0.17	1.01 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.18 <sup>a</sup>
18:0	6.16 ± 0.06	8.26 ± 0.08 <sup>b</sup>	8.31 ± 0.10 <sup>b</sup>	8.05 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.03 ± 0.03 <sup>a</sup>
20:0	0.00	0.08 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.03 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>a</sup>
21:0	0.00	0.06 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.02 <sup>a</sup>
22:0	0.73 ± 0.06	0.81 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.14 <sup>a</sup>
23:0	0.38 ± 0.02	0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.07 <sup>a</sup>
24:0	0.79 ± 0.04	0.78 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.08 <sup>a</sup>
∑SFA	23.63 ± 0.46	26.94 ± 0.31 <sup>b</sup>	27.16 ± 0.61 <sup>b</sup>	25.16 ± 0.49 <sup>a</sup>	24.57 ± 0.75 <sup>a</sup>
14:1n-9	0.00	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
15:1n-9	0.00	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
16:1n-7	5.35 ± 0.13	5.94 ± 0.05 <sup>c</sup>	6.05 ± 0.05 <sup>c</sup>	5.38 ± 0.19 <sup>b</sup>	5.05 ± 0.20 <sup>a</sup>
17:1n-9	0.29 ± 0.07	0.38 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>a</sup>
18:1n-9t	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>a</sup>
18:1n-9c	10.26 ± 0.09	10.55 ± 0.02 <sup>b</sup>	10.49 ± 0.06 <sup>b</sup>	10.30 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.33 ± 0.05 <sup>a</sup>
20:1n-9	0.57 ± 0.02	0.66 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.09 <sup>a</sup>
22:1n-9	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>
24:1n-9	1.82 ± 0.03	1.90 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.16 <sup>a</sup>
∑MUFA	18.84 ± 0.13	20.03 ± 0.05 <sup>b</sup>	20.10 ± 0.13 <sup>b</sup>	19.05 ± 0.14 <sup>a</sup>	18.84 ± 0.39 <sup>a</sup>
18:2n-6t <sup>a</sup>	0.56 ± 0.03	0.65 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.06 <sup>a</sup>
18:2n-6c <sup>a</sup>	0.93 ± 0.06	1.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.14 ± 0.02 <sup>bc</sup>
18:3n-6 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.01	0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>
20:2n-6 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.03	0.63 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>a</sup>
20:4n-6	6.23 ± 0.13	6.33 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.37 ± 0.06 <sup>b</sup>	6.25 ± 0.08 <sup>ab</sup>	6.20 ± 0.03 <sup>a</sup>
∑n-6	8.50 ± 0.14	9.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.38 ± 0.09 <sup>b</sup>	9.07 ± 0.16 <sup>a</sup>	9.04 ± 0.15 <sup>a</sup>
18:3n-3 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>
20:3n-3 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.03	1.46 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>a</sup>
20:5n-3 <sup>a</sup>	10.69 ± 0.02	11.00 ± 0.09 <sup>b</sup>	11.04 ± 0.07 <sup>b</sup>	10.94 ± 0.07 <sup>b</sup>	10.55 ± 0.07 <sup>a</sup>
22:6n-3 <sup>a</sup>	7.65 ± 0.04	7.58 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.51 ± 0.06 <sup>ab</sup>	7.52 ± 0.06 <sup>ab</sup>	7.44 ± 0.04 <sup>a</sup>
∑n-3	19.92 ± 0.06	20.30 ± 0.11 <sup>bc</sup>	20.31 ± 0.04 <sup>c</sup>	20.15 ± 0.10 <sup>b</sup>	19.67 ± 0.06 <sup>a</sup>
∑PUFA	28.42 ± 0.21	29.44 ± 0.14 <sup>b</sup>	29.69 ± 0.07 <sup>c</sup>	29.22 ± 0.09 <sup>b</sup>	28.71 ± 0.18 <sup>a</sup>
n-3/n-6	2.34 ± 0.42	2.22 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.03 <sup>a</sup>

Note: Results are given as mean (±SD). Values in the same row with different superscripts indicate significant differences except for the initial column ( $p < 0.05$ ).

Abbreviations: ∑MUFA: monounsaturated fatty acid; ∑PUFA: polyunsaturated fatty acid; ∑SFA: saturated fatty acid. <sup>a</sup>∑PUFA: 18:2n-6t, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:2n-6t, 20:2n-6c, 20:4n-6, 20:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3.

TABLE 9 Non-specific immune parameters and antioxidant enzyme activities of *Farfantepenaeus aztecus* fed diets with decreasing protein levels.

	Initial	38P	35P	32P	29P
THC ( $\times 10^6$ cells $\text{mL}^{-1}$ )	2.07 $\pm$ 0.38	2.60 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	2.57 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.79 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
PO (U $\text{mL}^{-1}$ )	0.13 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
RB (10 $\mu\text{L}^{-1}$ )	0.29 $\pm$ 0.01	0.73 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
ALP (U 100 $\text{mL}^{-1}$ )	3.80 $\pm$ 0.20	4.28 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	4.50 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	4.70 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	4.57 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
ACP (U 100 $\text{mL}^{-1}$ )	10.83 $\pm$ 0.06	12.37 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	12.40 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	11.02 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	11.17 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
SOD (U $\text{mL}^{-1}$ )	30.67 $\pm$ 1.15	32.33 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	30.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	30.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	30.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
T-AOC (IU $\text{mL}^{-1}$ )	8.33 $\pm$ 0.58	10.33 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	9.67 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>	8.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	8.67 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
Glutathione (IU $\text{mL}^{-1}$ )	1.20 $\pm$ 0.10	1.43 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	1.27 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.03 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>

Note: Results are given as mean ( $\pm$ SD). Values in the same row with different superscripts indicate significant differences except for the initial column ( $p < 0.05$ ).

Abbreviations: ACP, acid phosphatase; ALP, alkaline phosphatase; PO, phenoloxidase activity; RB, respiratory burst activity; SOD, superoxide dismutase; T-AOC, total antioxidant capacity; THC, total hemocyte count.

TABLE 10 Digestive enzyme activity of *Farfantepenaeus aztecus* fed diets with decreasing protein levels (U/g).

Parameters	Initial	38P	35P	32P	29P
Protease	409.67 $\pm$ 29.14	477.33 $\pm$ 6.43 <sup>c</sup>	466.67 $\pm$ 5.78 <sup>b</sup>	460.33 $\pm$ 5.51 <sup>ab</sup>	454.67 $\pm$ 4.51 <sup>a</sup>
Amylase	212.33 $\pm$ 9.29	275.67 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	276.67 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	230.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	229.33 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
Lipase	249.33 $\pm$ 2.08	289.33 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	286.67 $\pm$ 5.77 <sup>b</sup>	283.33 $\pm$ 5.77 <sup>b</sup>	273.33 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>

Note: Results are given as mean ( $\pm$ SD). Values in the same row with different superscripts indicate significant differences except for the initial column ( $p < 0.05$ ).

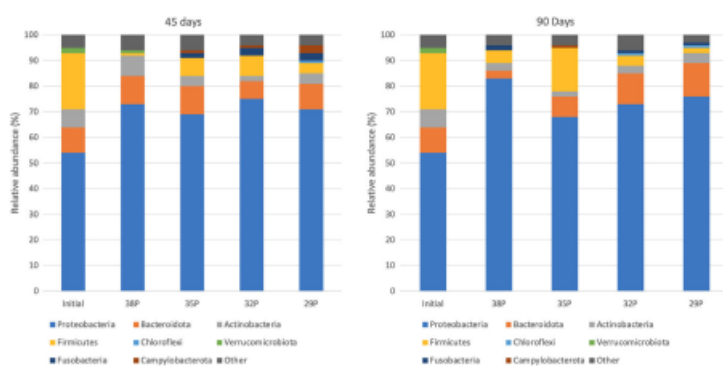


FIGURE 3 Relative abundance of most frequently identified bacterial phylum (>1% of total sequences) in shrimp guts at different dietary protein levels in biofloc technology.

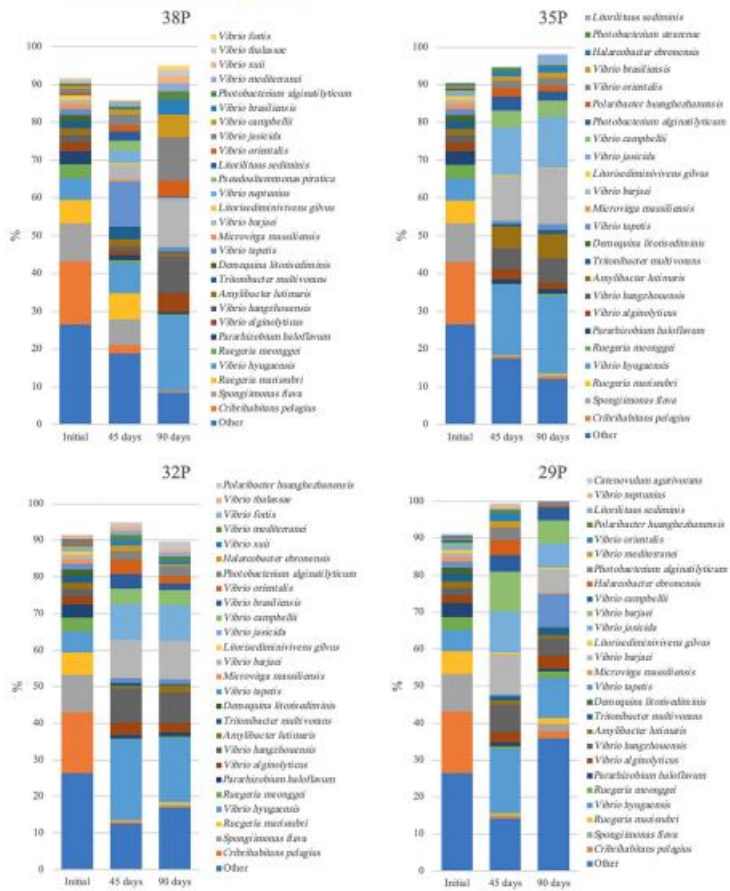


FIGURE 4 Relative abundance of most frequently identified bacterial species (>1% of total sequences) in shrimp guts at different dietary protein levels in biofloc technology.

for the shrimp was 34.40%, in agreement with the growth performance data. However, 6% and 9% less protein content in the diet negatively affected shrimp growth performance in BFT culture conditions. Similarly, in a study conducted by Pinho and Emerenciano (2021), the production performances of *L. vannamei* were significantly reduced as a result of a 10% reduction in dietary protein, with the group treated with the highest protein level (35% of CP)

10.1002/2475-2875.12111 | https://doi.org/10.1002/2475-2875.12111 | Accepted for publication 11 October 2023

having higher values than shrimp fed with 25% CP. It was also reported that the growth performance of *P. monodon* fed with 32% protein in the diet under BFT conditions (with molasses as a carbon source) decreased compared to shrimp fed with 40% protein (Kumar et al., 2017). In the current study, biofloc as an extra food was probably insufficient to make up for the dietary protein difference below 35%. The optimal dietary protein level in BFT conditions may vary depending on the species, carbon source used, biofloc composition, and water quality. In our study, all water quality parameters remained in the desired ranges for BFT and shrimp culture conditions (Avnimelech, 2015).

This study provides the first information on the effect of different dietary protein levels on shrimp's whole-body fatty acids composition in BFT. Whole body fatty acid composition depends on the fatty acid profile of the diet (Tazikeh et al., 2020). Our data demonstrated no considerable differences in the whole-body fatty acid contents including MUFA, PUFA and SFA of *F. aztecus* fed with different dietary protein levels in the diet.

Like other crustaceans, shrimps rely on non-specific immunity because of not have an adaptive immune system (Bachère, 2000). Circulating hemocytes and PO activity have a critical role in the defense mechanism of shrimp (Rodríguez & Le Moullac, 2000), while antioxidant enzymes protect cells from oxidative stress in host-pathogen interplay (Holmblad & Söderhäll, 1999). The present study showed that increasing protein contents in the diet had a better immune response concerning THC and ACP indices, and the diet with the highest protein content improved RB and Glutathione activities. This indicates that achieving enhanced immunity in the shrimp by consuming the microbial floc in situ could require a high-protein diet for these parameters. But reducing the dietary protein level from 38% to 29% did not negatively affect PO, ALP and SOD activities in the present study. Reducing the protein in the diet from 40% to 24% in *L. vannamei* had a negative effect on the immune response (Panigrahi et al., 2019). On the contrary, in a study conducted by Xu and Pan (2014) the THC and immune responses of *L. vannamei* were not affected by decreasing the dietary protein levels from 35% to 20% under BFT, while decreasing trends in the T-AOC in both the plasma and the hepatopancreas were found as dietary protein levels decreased. The bioactive components in biofloc may affect the health status of shrimps, especially on immune and antioxidant indices with the differential dietary protein levels. Therefore, optimization of dietary protein content is essential for maintaining immunity.

Digestive enzymes are critical for nutrient digestion, and the digestive capacity, nutritional status, and growth performance of the cultured species are directly affected by their activities. Protein and lipid contents of the diet can affect the endogenous enzymes of the species (Méndez-Martínez et al., 2018). As a food supplement, biofloc can improve the utilization of the feed and growth by stimulating digestive enzyme activity (G Liu et al., 2017). The present study generally revealed that dietary protein levels influenced protease, amylase, and lipase activities in the diet under BFT conditions. However, except for protease, amylase, and lipase activities of the shrimp were not negatively affected in the diet with 3% lower protein content compared to 38% protein. This may explain why similar growth was achieved in the 38P and 35P groups. Previously, it has been shown that the level of protein in the diet has effects on the digestive enzyme activity of shrimp (Talukdar et al., 2021; Xia et al., 2010) but more work is needed to fully clarify the effects of the dietary protein levels on the digestive enzyme activities with BFT.

As with the fish gut microbiome, the shrimp gut microbiome similarly contains about 90% Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria (Ghanbari et al., 2015). However, the gut microbiome of shrimp varies depending on certain factors which may be as a result of variations in species, developmental stage, water temperature, and diet (Rajeev et al., 2021). Our study demonstrated that the most common phylum of the shrimp gut microbiota in all groups was distributed in Proteobacteria, followed by Firmicutes for 38P and 35P groups and by Bacteroidetes for 32P and 29P groups. Qiao et al. (2017) pointed out that the abundance of Firmicutes in the shrimp gut microbiota was sensitive to carbohydrates in the diet. This may explain how increasing carbohydrate contents in the diet affected Firmicutes abundance in the current study.

Although there are pathogenic strains, most *Vibrio* spp. are known to be non-pathogenic for the host (Yu et al., 2018). The virulence of *Vibrio* species may vary depending on culture conditions or induced quorum-sensing regulation (Zhang et al., 2017). Our study data showed a significant increase of *Vibrio* in the shrimp gut under BFT conditions. Similar to our study, *Vibrio* enrichment was also reported in the *L. vannamei* gut microbiota under biofloc

conditions (Tepaamordech et al., 2020). Gustilatov et al. (2022) stated that BFT induced a decrease in the pathogenicity of *V. parahaemolyticus*, regardless of density. Thus, the positive roles of biofloc with gut microbiome may be reflected in the healthy growth of shrimp throughout the culture period.

## 5 | CONCLUSION

The results of the present study showed that with a biofloc system, reducing the protein levels in the diet to a certain extent may be effective. However, biofloc may not be a substitute for suboptimal protein levels in the diet. In the present study, we suggested that for brown shrimp culture in a biofloc system, dietary protein levels could be reduced from 380 to 350 g kg<sup>-1</sup> without negatively affecting healthy growth. With optimum protein levels in the diet, approaches that can improve the efficiency of the biofloc and healthy rearing of brown shrimp is also a matter of further research.

### ACKNOWLEDGMENTS

This research was part of a project funded by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, Grant No. 121O713). The authors would like to thank Dr Selin Sayin and Mursal Abdulkadir Hersi (MS) for their assistance.

### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

### ORCID

Dagukan Kaya  <https://orcid.org/0000-0002-8832-5496>

Derya Guray  <https://orcid.org/0000-0002-8254-1403>

### REFERENCES

- Ahmed, I., & Ahmad, I. (2020). Effect of dietary protein levels on growth performance, hematological profile and biochemical composition of fingerlings rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* reared in Indian himalayan region. *Aquaculture Reports*, 16, 100268. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100268>
- Al-Badran, A. A., Fujiwara, M., & Mora, M. A. (2019). Effects of insecticides, fipronil and imidacloprid, on the growth, survival and behavior of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus*. *PLoS One*, 14(10), e0223641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223641>
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of Association of Analytical Chemist* (15th ed.). AOAC.
- Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc technology a practical guide book*. The World Aquaculture Society.
- Avnimelech, Y. (2015). *Biofloc technology: A practical hand book*. World Aquaculture Society.
- Bachère, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191(1-3), 3-11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00413-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00413-0)
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). Obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176-182. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Çelik, I., & Keskin, E. (2022). Revealing the microbiome of four different thermal springs in Turkey with environmental DNA metabarcoding. *Biology*, 11(7), 998. <https://doi.org/10.3390/biology11070998>
- Chaklader, M. R., Siddik, M. A., & Fotedar, R. (2020). Total replacement of fishmeal with poultry by-product meal affected the growth, muscle quality, histological structure, antioxidant capacity and immune response of juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *PLoS One*, 15(11), e0242079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242079>
- Chen, Y., Mitra, A., Rahimnejad, S., Chi, S., Kumar, V., Tan, B., Niu, J., & Xie, S. (2023). Retrospect of fish meal substitution in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed: Alternatives, limitations and future prospects. *Reviews in Aquaculture*, 1-28. <https://doi.org/10.1111/raq.12843>

- Deval, M. C., Kaya, Y., Güven, O., Gökoglu, M., & Frogia, C. (2010). An unexpected find of the western Atlantic shrimp, *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) (Decapoda, Penaeidae) in Antalya Bay, Eastern Mediterranean Sea. *Crustaceana*, 83(12), 1531–1537. <https://doi.org/10.1163/001121610X538859>
- FAO. (2020). *The state of world fisheries and aquaculture*. FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>
- Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Gökoglu, M., & Özvarol, Y. (2013). Biogeographic expansion of *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) (Decapoda, Penaeidae) in the eastern Mediterranean. *Mediterranean Marine Science*, 14(2), 463–480. <https://doi.org/10.12681/mms.676>
- Gustilatov, M., Ekasari, J., & Pande, G. S. J. (2022). Protective effects of the biofloc system in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture against pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 124, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.03.037>
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., & Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0)
- Holmblad, T., & Söderhäll, K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1–2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00446-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00446-3)
- Jia, S., Li, X., He, W., & Wu, G. (2022). Protein-sourced feedstuffs for aquatic animals in nutrition research and aquaculture. In *Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism* (pp. 237–261). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85686-1>
- Kaya, D., Genc, E., Genc, M. A., Aktas, M., Eroldogan, O. T., & Gurro, D. (2020). Biofloc technology in recirculating aquaculture system as a culture model for green tiger shrimp, *Penaeus semisulcatus*: Effects of different feeding rates and stocking densities. *Aquaculture*, 528, 735526. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735526>
- Khanjani, M. (2015). *The effect of different feeding levels in biofloc system on water quality, growth performance and carcass composition of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei Boone, 1931)* [Doctoral dissertation, PhD thesis]. Hormozgan University.
- Khanjani, M. H., & Sharifinia, M. (2020). Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1836–1850. <https://doi.org/10.1111/raq.12412>
- Klett, D. A., & Watson, A. M. (2020). Nutritional performance of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) fed various fish, shrimp, and squid diets. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 13. <https://doi.org/10.1155/2022/4333227>
- Kumar, S., Anand, P. S. S., De, D., Deo, A. D., Ghoshal, T. K., Sundaray, J. K., Ponniah, A. G., Jithendran, K. P., Raja, R. A., Biswas, G., & Lalitha, N. (2017). Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquaculture Research*, 48(3), 1168–1182. <https://doi.org/10.1111/are.12958>
- Liu, G., Zhu, S., Liu, D., Guo, X., & Ye, Z. (2017). Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.038>
- Liu, J. X., Zhu, K. C., Guo, H. Y., Liu, B. S., Zhang, N., & Zhang, D. C. (2022). Effects of cysteine addition to low-fishmeal diets on the growth, anti-oxidative stress, intestine immunity, and *Streptococcus agalactiae* resistance in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Frontiers in Immunology*, 13, 1066936. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1066936>
- Mansour, A. T., Ashry, O. A., Ashour, M., Alsaqufi, A. S., Ramadan, K. M., & Sharawy, Z. Z. (2022). The optimization of dietary protein level and carbon sources on biofloc nutritive values, bacterial abundance, and growth performances of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Life*, 12(6), 888. <https://doi.org/10.3390/life12060888>
- Megahed, M. E., & Mohamed, K. (2014). Sustainable growth of shrimp aquaculture through biofloc production as alternative to fishmeal in shrimp feeds. *Journal of Agricultural Science*, 6(6), 176. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n6p176>
- Méndez-Martínez, Y., García-Guerrero, M. U., Arcos-Ortega, F. G., Martínez-Córdova, L. R., Yamasaki-Granados, S., Pérez-Rodríguez, J. C., & Cortés-Jacinto, E. (2018). Effect of different ratios of dietary protein-energy on growth, body proximal composition, digestive enzyme activity, and hepatopancreas histology in *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868) prawn juveniles. *Aquaculture*, 485, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.012>
- National Research Council. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. The National Academies Press.
- Olier, B. S., Tubin, J. S. B., de Mello, G. L., Martínez-Porchas, M., & Emerenciano, M. G. C. (2020). Does vertical substrate could influence the dietary protein level and zootechnical performance of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system. *Aquaculture International*, 28, 1227–1241. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00521-4>
- Oosterbaan, R. J. (1994). Frequency and regression analysis. *Drainage Principles and Applications*, 16, 175–224.
- Panigrahi, A., Sundaram, M., Saranya, C., Kumar, R. S., Dayal, J. S., Saraswathy, R., Otta, S. K., Shyne Anand, P. S., Nile Rekha, P., & Gopal, C. (2019). Influence of differential protein levels of feed on production performance and immune response of pacific white leg shrimp in a biofloc-based system. *Aquaculture*, 503, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.036>

- Pinho, S. M., & Emerenciano, M. G. C. (2021). Sensorial attributes and growth performance of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured in biofloc technology with varying water salinity and dietary protein content. *Aquaculture*, 540, 736727. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736727>
- Qiao, F., Liu, Y. K., Sun, Y. H., Wang, X. D., Chen, K. Li, T. Y., Li, E. C., & Zhang, M. L. (2017). Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 444–452. <https://doi.org/10.1111/anu.12412>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rajeev, R., Adithya, K. K., Kiran, G. S., & Selvin, J. (2021). Healthy microbiome: A key to successful and sustainable shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 238–258. <https://doi.org/10.1111/raq.12471>
- Rodríguez, J., & Le Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191(1–3), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00421-X)
- Sabry Neto, H., & Nunes, A. J. P. (2015). Performance and immunological resistance of *Litopenaeus vannamei* fed a  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan-supplemented diet after per os challenge with the infectious myonecrosis virus (IMNV). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 44, 165–173. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902015000500001>
- Shao, J., Zhao, W., Liu, X., & Wang, L. (2018). Growth performance, digestive enzymes, and TOR signaling pathway of *Litopenaeus vannamei* are not significantly affected by dietary protein hydrolysates in practical conditions. *Frontiers in Physiology*, 9, 998. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00998>
- Sharawy, Z. Z., Abbas, E. M., Abdelkhalik, N. K., Ashry, O. A., Abd El-Fattah, L. S., El-Sawy, M. A., Helal, M. F., & El-Haroun, E. (2022). Effect of organic carbon source and stocking densities on growth indices, water microflora, and immune-related genes expression of *Litopenaeus vannamei* larvae in intensive culture. *Aquaculture*, 546, 737397. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737397>
- Song, Y.-L., & Hsieh, Y.-T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*, 18(3), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0145-305x(94)90012-4)
- Sivaramkrishnan, T., Ambasankar, K., Kumar, T. S., Sandeep, K. P., Thomas, D., Raja, R. A., Vasagam, K. P. K., Dayal, J. S., & Kailasam, M. (2022). Influence of dietary protein levels on growth, feed utilization, body indices and serum profile of silver moony *Monodactylus argenteus*. *Aquaculture*, 549, 737823. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737823>
- Stergiou, K. I., Bobori, D. C., Ekmekçi, F. G., Gökçöglü, M., Karachle, P. K., Minos, G., Ozvarol, Y., Salvarina, I., Tarkan, A. S., & Vilizzi, L. (2014). New fisheries-related data from the Mediterranean Sea (April 2014). *Mediterranean Marine Science*, 15, 213–224. <https://doi.org/10.12681/mms.738>
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2015). Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Talukdar, A., Dharmendra Deo, A., Prasad Sahu, N., Sardar, P., Aklakur, M., Harikrishna, V., Prakash, S., Shamna, N., & Jana, P. (2021). Effects of different levels of dietary protein on the growth performance, nutrient utilization, digestive enzymes and physiological status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* juveniles reared in inland saline water. *Aquaculture Nutrition*, 27(1), 77–90. <https://doi.org/10.1111/anu.13166>
- Tazikheh, T., Abedian Kenari, A., & Esmaeili, M. (2020). Effects of fish meal replacement by meat and bone meal supplemented with garlic (*Allium sativum*) powder on biological indices, feeding, muscle composition, fatty acid and amino acid profiles of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 51(2), 674–686. <https://doi.org/10.1111/are.14416>
- Tepaamordech, S., Nookaew, I., Higdon, S. M., Santiyonont, P., Phromson, M., Chantarasakha, K., Mhuantong, W., Plengvidhya, V., & Visessanguan, W. (2020). Metagenomics in bioflocs and their effects on gut microbiome and immune responses in Pacific white shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.042>
- Wang, T., Wang, X., Shehata, A. I., Wang, R., Yang, H., Wang, Y., & Zhang, Z. (2022). Growth performance, physiological and antioxidant capacity responses to dietary fish meal replacement with insect meals for aquaculture: A case study in red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture Research*, 53(10), 3853–3864. <https://doi.org/10.1111/are.15892>
- Xia, S., Li, Y., Wang, W., Rajkumar, M., Kumaraguru Vasagam, K. P., & Wang, H. (2010). Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*, 41(12), 1845–1854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02585.x>
- Xu, W. J., & Pan, L. Q. (2014). Evaluation of dietary protein level on selected parameters of immune and antioxidant systems, and growth performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* reared in zero-water exchange biofloc-based culture tanks. *Aquaculture*, 426, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.003>
- Yang, H., Bian, Y., Huang, L., Lan, Q., Ma, L., Li, X., & Leng, X. (2022). Effects of replacing fish meal with fermented soybean meal on the growth performance, intestinal microbiota, morphology and disease resistance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Reports*, 22, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100954>

- Yu, W., Wu, J. H., Zhang, J., Yang, W., Chen, J., & Xiong, J. (2018). A meta-analysis reveals universal gut bacterial signatures for diagnosing the incidence of shrimp disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(10), fy147. <https://doi.org/10.1093/femsec/fy147>
- Yun, H., Shahkar, E., Katya, K., Jang, I. K., Kim, S. K., & Bai, S. C. (2016). Effects of bioflocs on dietary protein requirement in juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47(10), 3203–3214. <https://doi.org/10.1111/are.12772>
- Zhang, S., Liu, N., Liang, W., Han, Q., Zhang, W., & Li, C. (2017). Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3371–3378. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8009-3>

**How to cite this article:** Genc, E., Kaya, D., Genc, M. A., Keskin, E., Yavuzcan, H., Guroy, D., Gurler, A., Yaras, K. U., Pipilos, A., Ozbek, B. F., Yilmaz, B. H., & Aktas, M. (2023). Effect of biofloc technology in *Farfantepenaeus aztecus* culture: The optimization of dietary protein level on growth performance, digestive enzyme activity, non-specific immune response, and intestinal microbiota. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1–19. <https://doi.org/10.1111/jwas.13041>