

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YAVRU GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss*)'NDA GÖRÜLEN SOĞUKSU HASTALIĞININ KONTROLÜ İÇİN PROBİYOTİKLERİN KULLANILMASI

Yasemin CAN

Danışman: Prof. Dr. Öznur DİLER

**DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ TEMEL BİLİMLER ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2011**

TEZ ONAYI

Yasemin CAN tarafından hazırlanan “Yavru Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)' nda Görülen Soğuksu Hastalığının Kontrolü İçin Probiyotiklerin Kullanılması”adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Öznur DİLER
Süleyman Demirel Üniversitesi,
(İmza)
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Ömer Osman ERTAN
Süleyman Demirel Üniversitesi,
(İmza)
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Temel Bilimler Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
Süleyman Demirel Üniversitesi,
(İmza)
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Abdullah DİLER
Süleyman Demirel Üniversitesi,
(İmza)
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı

Doç. Dr. Soner ALTUN
(Uludağ Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi,
(İmza)
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mustafa KUŞCU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Soğuk Su Hastalığı.....	3
2.1.1. Hastalığın tarihçesi.....	3
2.1.2. Etken özellikleri.....	3
2.1.3. Duyarlı balık türleri ve mortalite.....	5
2.1.4. Epizootiyoloji.....	5
2.1.4. Hastalık belirtileri.....	6
2.1.5. Tedavi ve korunma.....	7
2.2. Probiyotik Bakteriler.....	8
2.2.1. Probiyotik bakterinin tanımı.....	8
2.2.2. Probiyotik bakterilerin özellikleri.....	9
2.2.3. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları.....	10
2.3. Balık Mikrofloralarında Bakteriyel Dağılım ve Mikroflora- Probiyotik Bakteri İlişkisi.....	12
2.4. Balıklarda Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi.....	15
2.5. Ülkemizde Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Bakterilerin kullanımıyla İlgili Yapılmış Olan Çalışmalar.....	17
2.6. Gökkuşacağı Alabalıklarında (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Probiyotik Bakteri Uygulamaları İle İlgili Yapılmış Olan Çalışmalar.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Araştırmada kullanılan balık ve uygulama yeri.....	24
3.1.2. Araştırmada kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi.....	24
3.1.3. Araştırmada kullanılan probiyotik bakteriler.....	24

3.2.Yöntem.....	24
3.2.1. Potansiyel probiyotik bakteri (<i>Pseudomonas sp. GS</i>) uygulamasında izlenen yollar	24
3.2.1.1. Potansiyel probiyotik bakterinin (<i>Pseudomonas sp. GS</i>) izolasyonu	25
3.2.1.2. Potansiyel probiyotik bakterinin antagonistik etkisinin belirlenmesi.....	25
3.2.1.3. Bakterilerin identifikasyonu.....	26
3.2.1.4. Potansiyel probiyotik bakteri (<i>Pseudomonas sp. GS</i>)' nin gökkuşığı alabalıkları üzerindeki patojenitesinin tesbiti.....	26
3.2.1.5. Gökkuşığı alabalığı yavrularına potansiyel probiyotik bakterinin uygulaması.....	27
3.2.1.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotik bakterileri ile potansiyel probiyotik bakteri suşu (<i>Pseudomonas sp. GS</i>)' nin etkinliğinin değerlendirilmesi.....	27
3.2.2. Örneklem günleri.....	28
3.2.3. Gökkuşığı alabalıklarında probiyotik bakterilerin spesifik olmayan bağışıklık sistemi ve kan hücreleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi.....	29
3.2.3.1. NBT-pozitif nötrofillerin sayımı.....	29
3.2.3.2. Eritrosit ve total lökosit sayımı.....	29
3.2.3.3. Hematokrit değerinin saptanması.....	29
3.2.3.4. Serum lizozim aktivitesinin belirlenmesi.....	30
3.2.4 . Probiyotik uygulamalarının gökkuşığı alabalığının spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan deneysel enfeksiyon uygulamaları.....	30
3.2.4.1. Probiyotik bakterilerin 60 günlük uygulama sonrası spesifik olmayan olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkisini tespit etmek amacıyla <i>Vibrio anguillarum</i> test bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması.....	30
3.2.4.2. 15 günlük süreyle probiyotik uygulanmış balık gruplarında <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ile deneysel enfeksiyon çalışmaları.....	31
3.2.5. Yaşama oranı yüzdesinin hesaplanması.....	31
3.2.6. Spesifik büyüme oranları ve kondüsyon faktörünün belirlenmesi.....	32
3.2.7. İstatiksel analizler	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33

4.1. <i>Pseudomonas sp.</i> GS (Potansiyel Probiyotik Olarak İdentife Edilmiş Bakteri Suşu)'nun <i>in vitro</i> Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi İle İlgili Bulgular.....	33
4.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'a Karşı <i>in vitro</i> Antogonistik Etkileri Belirlenen Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Fenotipik ve Biyokimyasal Karakteristikleri.....	33
4.3. Probiyotik Uygulamasının Gökkuşığı Alabalıklarının Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemine ve Kan Hücrelerine Etkileri İle İlgili Bulgular.....	35
4.3.1. NBT testi bulguları.....	35
4.3.2. Serum lizozim enzimi bulguları.....	36
4.3.3. Lökosit sayım bulguları.....	37
4.3.4. Eritrosit sayım bulguları.....	39
4.3.5. Hematokrit değer bulguları.....	40
4.4. Probiyotik Uygulamalarının Gökkuşığı Alabalığının Spesifik olmayan Bağışıklık Sistemine Olan Etkilerini Araştırmak Amacıyla Yapılan Deneysel Enfeksiyon Uygulamaları ile İlgili Bulgular.....	41
4.4.2. <i>Vibrio anguillarum</i> (Probiyotik bakterilerin spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla kullanılan test bakterisi) ile deneysel enfeksiyon uygulaması bulguları.....	43
4.5. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> bakterisinin fenotipik özellikleriyle ilgili bulgular.....	43
4.6. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması bulguları.....	44
4.7. Probiyotik Uygulamasının Gökkuşığı Alabalıklarının Büyüme Parametreleri Üzerine Olan Etkileri ile İlgili Bulgular.....	47
4.7.1. Ağırlık ölçümleriyle ilgili bulgular.....	47
4.7.2. Uzunluk ölçümleriyle ilgili bulgular.....	48
4.7.3. Kondisyon faktörü bulguları.....	49
4.7.4. Spesifik büyüme oranları bulguları.....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6. KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ÖZET

Doktora Tezi

YAVRU GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss*)'NDA GÖRÜLEN SOĞUK SU HASTALIĞININ KONTROLÜ İÇİN PROBİYOTİKLERİN KULLANILMASI

Yasemin CAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Öznur DİLER

Bu çalışmada Bioplus 2B ve Lactiferm adlı 2 farklı ticari probiyotik bakteriyel ürün ve gökkuşağı alabalığının yaşadığı sudan izole edilmiş olan *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun yavru gökkuşağı alabalığının bağışlık sistemi ile büyüme ve gelişme parametreleri üzerine olan etkileri ile *Flavobacterium psychrophilum* patojenine karşı göstermiş oldukları potansiyel koruma etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla ortalama ağırlıkları $7 \pm 0,9$ gram olan 800 adet gökkuşağı alabalığı 60 gün süreyle Bioplus 2B, Lactiferm ticari probiyotiklerini ve *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu sırasıyla 0,8 mg/kg, 0,4 mg/kg ve $5,4 \times 10^7$ kob/ml oranlarında içeren yemlerle beslenmiştir. Çalışmanın 7, 14, 21 ve 28. günlerinde balıklardan kan örnekleri alınarak NBT (+) nötrofil, serum lizozim, lökosit, eritrosit ve hematokrit değerleri incelenmiştir. Probiyotik bakterilerin gökkuşağı alabalığının gelişimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 60 gün süren besleme çalışmasında on beşer günlük periyotlarla balıkların ağırlık ve boyları ölçülmüştür.

Diğer taraftan ortalama ağırlıkları $2 \pm 0,5$ gram olan 400 adet gökkuşağı alabalığı 15 gün süreyle yine Bioplus 2B, Lactiferm ticari probiyotiklerini ve *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu sırasıyla 0,8 mg/kg, 0,4 mg/kg ve $5,4 \times 10^7$

kob/ml oranlarında içeren yemlerle beslenmiştir. 15. günün sonunda *Flavobacterium psychrophilum* patojen bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması yapılmıştır.

Sonuçta Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu gökkuşağı alabalıklarının NBT (+) nötrofil, serum lizozim ve lökosit değerleri ile büyüme parametrelerinde artışa neden olmuşlardır ($p<0,05$). *Flavobacterium psychrophilum* ile deneysel enfeksiyon sonrasında Bioplus 2B, Lactiferm probiyotik bakterileri ve *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakterili yemlerle beslenen gruplarda RPS (Yaşama Oranı Yüzdeleri) sırasıyla; % 47, % 39 ve % 18 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0,05$).

Gökkuşağı alabalıklarını korumada *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu, Bioplus 2B ve Lactiferm gibi etkinlik sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, bağışıklık, *Flavobacterium psychrophilum*, probiyotik, soğuk su hastalığı.

2011, 75 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

USE OF PROBIOTICS TO CONTROL COLD WATER DISEASE IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) FRY

Yasemin CAN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Basic Sciences**

Supervisor: Prof. Dr.Öznur DİLER

In this study, the effects of two different commercial probiotics Bioplus 2B, Lactiferm and the potential probiotic strain *Pseudomonas sp.* GA on the immune system and growth parameters of rainbow trout and the potential prevention they had exhibited against the pathogenic bacteria *Flavobacterium psychrophilum* which causes Cold Water Disease in rainbow trout fry, were searched.

For this purpose a total of 800 rainbow trout weighting $7 \pm 0,9$ grams had been fed for 60 days by adding the commercial probiotic bacterias Bioplus 2B, Lactiferm and the potential probiotic bacteria strain *Pseudomonas sp.* GA at a ratio of 0,8 mg/kg, 0,4 mg/kg ve $5,4 \times 10^7$ kob/ml respectively to the diet. Blood samples were taken on the 7., 14., 21. and 28. days of study and NBT (Nitra Blue Tetrazolium) (+) neutrophil, serum lysozyme, leukocyte, haematocrit and erythrocyte levels were examined.

To examine the effects of probiotics on the growth of rainbow trout, the mass and the lenght of fishes were measured every 15 days during the 60 days of feeding.

On the other hand a total of 400 rainbow trout weighting $2 \pm 0,5$ grams had been fed for 15 days by adding the commercial probiotic bacterias Bioplus 2B, Lactiferm and the potential probiotic bacteria strain *Pseudomonas sp.* GA at ratio of 0,8 mg/kg, 0,4 mg/kg and $5,4 \times 10^7$ kob/ml respectively to the diet.

Fish were challenged with pathogenic bacteria *Flavobacterium psychrophilum* at the day 15.

As a result, probiotic bacteria caused an increase on the NBT (+) neutrophil, serum lysozyme, leucosit levels and growth parameters ($p < 0,05$).

When the rainbow trout fed with the probiotics such as, Bioplus 2B, Lactiferm and potential probiotic strain *Pseudomonas sp.* GA and the control group were challenged with the pathogen bacteria *Flavobacterium psychrophilum*, RPS (Relative Percentage of Survival) value was calculated; 47 %, 39 %, 18 % respectively. There was a significant difference between the groups statistically.

The potential probiotic bacteria strain *Pseudomonas sp.* GA was effective on protecting rainbow trout against *Flavobacterium psychrophilum*, causing cold water disease such as the commercial probiotics Bioplus 2B and Lactiferm.

Key Words: Rainbow trout, immunity, *Flavobacterium psychrophilum*, probiotic, cold water disease.

2011, 75 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ülkemizde ve dünyada hızlı bir gelişim gösteren su ürünleri yetiştiriciliğinde zaman zaman bazı hastalıkların ortaya çıkması ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotik ve bazı kimyasallar; çevre kirliliğine neden olmaları, balıklarda rezidü oluşturmaları ve antibiyotiklere dirençli bakterilerin gelişimine zemin hazırlamaları, hatta bu balıkların insanlar tarafından tüketilmesi sonucunda bakterilerin oluşturdukları direnç genlerinin ve yine bazı kimyasalların insanlara aktarılması gibi olumsuz durumlar yaratmaları sonucunda ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedirler. Bu sebeplerden ötürü son zamanlarda hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde biyolojik mücadele yöntemlerine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu araştırmada Bioplus 2B ve Lactiferm adlı ticari ticari probiyotikler ile gökkuşağı alabalığının yaşadığı sudan izole edilen *Pseudomonas sp.* GS adlı potansiyel probiyotik bakterinin gökkuşağı alabalığının immun sistemi ve gelişme parametreleri üzerine olan etkileri, yavru gökkuşağı alabalıklarında görülen soğuk su hastalığının kontrolündeki yeri ve önemi incelenmiştir.

Çalışmamda karşılaştığım zorlukları aşmamda bana yardımcı olan engin tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Öznur DİLER'e, en kıymetli vakitlerini ayırarak tüm çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Su Ürünleri Mühendisi Dr. Seçil EKİCİ'ye, aday probiyotik bakteriyi temin etmemde bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN'e, tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşim Ersen CAN'a, anneme ve babama sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

1988-D-09 No' lu Proje ile tezimi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Yasemin CAN
Isparta, 2011

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Cytophaga agarda üreyen *Flavobacterium psychrophilum* kolonileri.....4
- Şekil 2.2. *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin mikroskopik görüntüsü.....4
- Şekil 4.1. Potansiyel probiyotik bakteri *Pseudomonas sp.* GS' nin *Flavobacterium psychrophilum*'a karşı Anacker-Ordal Agarda oluşturduğu inhibisyon zonu.....33
- Şekil 4.2. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında NBT (+) nötrofil sayıları.....36
- Şekil 4.3. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında serum lizozim aktiviteleri (Unit/ml).....37
- Şekil 4.4. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında toplam lökosit sayıları ($\times 10^5/\mu\text{l}$).....38
- Şekil 4.5. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında eritrosit değerleri ($\times 10^6/\mu\text{l}$).....39
- Şekil 4.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında hematokrit değerleri (%).....40
- Şekil 4.7. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda *Vibrio anguillarum* ile eprüvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları.....42
- Şekil 4.8. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen Balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda *Vibrio anguillarum* ile eprüvasyon testi uygulaması sonrasında görülen yaşama oranı yüzdeleri.....43
- Şekil 4.9. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen Balıklarda ve kontrol grubu balıklarında $0,9 \times 10^7$ hücre/ml dozunda *F.*

<i>psychrophilum</i> ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%).....	46
Şekil 4.10. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakterisini içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında $0,9 \times 10^7$ hücre/ml dozunda <i>F. psychrophilum</i> ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında balıklarda görülen yaşama oranı yüzdeleri.....	46
Şekil 4.11. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan yapılan ağırlık ölçüm sonuçları (g).....	48
Şekil 4.12. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan uzunluk ölçüm sonuçları (cm).....	49
Şekil 4.13. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında kondüsyon faktörü bulguları (g/cm^3).....	50
Şekil 4.14. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında spesifik büyüme oranları (%).....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı bakteri türleri	11
Çizelge 2.2. 14 gün boyunca farklı probiyotik bakteri türleriyle beslenen gökkuşağı alabalıklarında <i>Aeromonas salmonicida</i> bakterisi ile intraperitoneal yoldan yapılan epruvasyon testi sonucundaki mortaliteler.....	22
Çizelge 2.3.14 gün boyunca farklı probiyotik türleriyle beslenen gökkuşağı alabalıklarında <i>Aeromonas salmonicida</i> bakterisi ile immersiyon yöntemiyle yapılan epruvasyon testi sonucundaki mortaliteler.....	23
Çizelge 4.1. Potansiyel probiyotik bakterinin biyokimyasal özellikleri.....	34
Çizelge 4.2. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında NBT (+) nötrofil sayıları.....	35
Çizelge 4.3. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında serum lizozim aktiviteleri (unit/ml).....	37
Çizelge 4.4. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında toplam lökosit sayıları ($\times 10^6/\mu\text{l}$).....	38
Çizelge 4.5. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında eritrosit değerleri ($\times 10^6/\mu\text{l}$).....	39
Çizelge 4.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında hematokrit değerleri (%).....	40
Çizelge 4.7. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda <i>Vibrio anguillarum</i> ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%).....	41
Çizelge 4.8. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> bakterisinin fenotipik özellikleri.....	44
Çizelge 4.9. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i>	

GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 0.9×10^7 hücre/ml dozunda <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ile eprüvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%).....	45
Çizelge 4.10. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan ağırlık ölçüm sonuçları (g).....	47
Çizelge 4.11. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan uzunluk ölçüm sonuçları (cm).....	48
Çizelge 4.12. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında kondüsyon faktörü bulguları.....	50
(g/cm ³)	
Çizelge 4.13. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile <i>Pseudomonas sp.</i> GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında spesifik büyüme oranları (%).....	52

1. GİRİŞ

Ülkemizde 1970'li yıllarda başlayan su ürünleri yetiştiriciliği son yıllarda hızla gelişen bir endüstriyel alan haline gelmiştir. Bu alanda ülkemizde yetiştiricilik için en çok tercih edilen balık türü gökkuşacağı alabalığıdır. Gökkuşacağı alabalığı, yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması, kuluçka dönemlerinin kısa olması gibi nedenlerden dolayı tercih sebebidir. Başlangıçta sadece tüketim amaçlı yetiştirilen gökkuşacağı alabalığı günümüzde yurtdışına da ihraç edilmektedir. Ülkemizde yılda yaklaşık 75000 ton civarı alabalık üretilmektedir (TUIK, 2009).

Ancak yetiştiricilikte ortaya çıkan bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklar ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Akuakültürde hastalıklarla mücadelede, antibiyotikler ve diğer kimyasal maddeler kullanılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır (Benbrook, 2002; Hernández, 2005). Fakat bu uygulamaların bazı olumsuz etkileri bulunmaktadır. Antibiyotik maddeler kullanıldıkları ortamın tabanında ölü bir tabaka oluşturmakta, dolayısıyla çevre kirliliğine yol açmaktadır. Sürekli ve yoğun olarak kullanıldıklarında da antibiyotiklere dirençli patojen bakterilerin gelişmesine neden olabilmektedir. Ayrıca balıkların tüketilmesi yoluyla antibiyotiklere dirençli bakteri genlerinin insanlara aktarılması da söz konusu olmaktadır. Yoğun antibiyotik kullanımı hem bağırsaktaki faydalı mikrobiyal flora popülasyonunun azalmasına, hem de normal bağırsak mikroflora dağılımının bozulmasına yol açabilmektedir (Cabello, 2006; Gomez vd., 2000). Bu sebeplerden ötürü son zamanlarda dünyada hayvan yetiştiriciliği alanlarında antibiyotik kullanımında bir azalma gözlenmeye başlanmıştır.

Akuakültürde hastalıklarla mücadele koruyucu olarak aşılama uygulamaları yapılmaktadır. Ancak balıkların erken gelişme evrelerinde aşılamanın etkinliği azalmaktadır (Holt, 1987). Aşı uygulamalarını olumsuz kılan bir diğer unsur ise maliyet artışıdır.

Bu nedenle akuakültürde balıkların patojen bakterilere karşı korunmasında ve tedavisinde son zamanlarda aşı uygulamalarına ve antibiyotiklere alternatif olarak

medikal bitkiler, immunostimulantlar, çeşitli vitaminler ve probiyotikler gibi yem katkı maddelerinin kullanımıyla ilgili çalışmalar gündeme gelmiştir (Siwicki vd., 1994; Verlhac vd., 1998; Dügenci, 2003). Son on beş yıl içerisinde su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik bakterilerin kullanımı ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (Gatesoupe, 1994; Gibson vd, 1998; Gram vd., 2001; Sharifuzzaman ve Austin 2010).

Probiyotik bakteriler balıkların bağışıklık sistemi parametrelerine etki ederek onları olumsuz çevre şartlarına karşı daha dayanıklı kılmakta ve patojen bakterilere karşı korumakta, ayrıca büyüme ve gelişmelerini desteklemektedirler (Merrifield vd., 2010; Sharifuzzaman ve Austin, 2010; Bagheri vd., 2008).

Yetiştiricilikte karşılaştığımız ve gökkuşağı alabalıklarında görülen *Flavobacterium psychrophilum* patojen bakterisinin neden olduğu 'Soğuk Su Hastalığı' diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalığı larvalarında ve yavrularında ciddi ölümlerin ve hastalıkların başlıca sebeplerinden biridir. Araştırmacılar; Ege, Marmara, Akdeniz, Karadeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden *F. psychrophilum* izole ettiklerini bildirmişlerdir (Çağırğan vd., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler vd., 2003; İspir vd., 2004; Yıldırım ve Özer, 2010).

Bu araştırmada yavru gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda görülen soğuksu hastalığının kontrolü için probiyotiklerin etkisini ortaya koymak amacıyla ticari probiyotiklerden Bioplus 2B ve Lactiferm ile potansiyel probiyotik bakteri suşu *Pseudomonas sp.* GS' nin balıkların bağışıklık sistemi ile büyüme ve gelişme parametreleri üzerine olan etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Soğuksu Hastalığı

2.1.1. Hastalığın tarihçesi

Avrupa kıtasında ve ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan Soğuk su hastalığı ilk defa 1941 yılında A.B.D.'nin Batı Virjinya eyaletinde gökkuşağı alabalıklarında ortaya çıkmış, daha sonra 1946 yılında Davis tarafından, pedinkül ve yüzgeç bölgelerinde oluşan lezyonlara bağlı olarak 'Pedinkül Hastalığı' olarak tanımlanmıştır (Davis, 1946; Nemotollahi vd., 2003).

Hastalığa yakalanan balıkların sırt kısımlarında içeriye doğru bir oyuk oluştuğu için 'Eyer Hastalığı' olarak da adlandırılmaktadır.

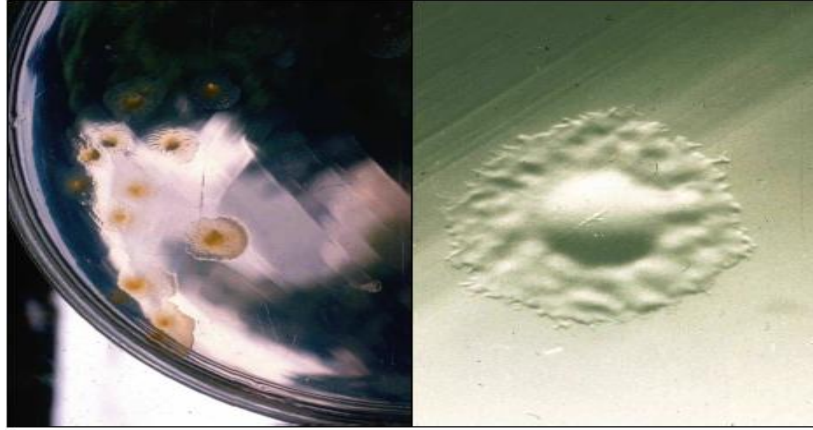
Hastalık etkeni ise ilk kez 1948 yılında Borg tarafından Coho salmonlarından (*Oncorhynchus kisutch*) izole edilmiştir ve hastalık düşük su sıcaklıklarında ortaya çıktığı için 'Soğuk Su Hastalığı' olarak adlandırılmıştır (Borg, 1948 ve Wood, 1974). Son yıllarda bir çok Avrupa ülkesinde 'Yavru Gökkuşağı Alabalıkları Sendromu' olarak da bilinmektedir (Santos vd., 1992).

2.1.2. Etken özellikleri

Soğuk su hastalığının etkeni olan *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin ilk etapta Myxobacteriler grubuna dahil olduğu düşünülmüştür ve Borg (1948) tarafından *Cytophaga psychrophila* şeklinde adlandırılmıştır. Daha sonraları *C. psychrophila*, sporakarp üretmediği ve kompleks polisakkaritleri indirgeyemediği için *Flexibacter* genusu içinde sınıflandırılmasının daha doğru olacağı düşünüülülerek *Flexibacter psychrophilus* şeklinde sınıflandırılmıştır. (Leadbetter, 1974, Bernardet and Grimont, 1989). Ancak bu bakterinin %32-33 mol G+C olan DNA kompozisyonunun, *Flexibacter* genusu içerisinde bulunan % 48 mol G+C DNA kompozisyonuna sahip diğer bakteri türleriyle örtüşmediği gözlenmiştir (Reichenbach ve Dworkin, 1981).

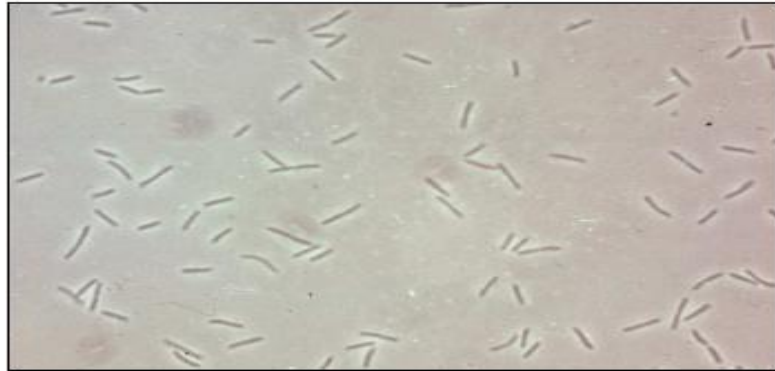
Bernardet vd. (1996), bu bakterinin DNA kompozisyonunu göz önünde bulundurarak *Flavobacterium* genusu içerisinde incelenmesi gerektiğini savunmuşlar ve *Flavobacterium psychrophilum* olarak adlandırmışlardır.

F. psychrophilum, Anacker ve Ordal tarafından geliştirilen, Cytophaga agar olarak da bilinen düşük nutrient içeren besiyerinde sarı renkli ve çapı 3 mm' den fazla olmayan koloniler oluşturmasıyla karakteristiktir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Cytophaga agarda üreyen *Flavobacterium psychrophilum* kolonileri
(Cipriano ve Holt, 2005)

Gr (-), 0.3-0,5 µm genişliğinde ve 1,5-7,5 µm uzunluğundadır (Dalsgaard, 1993).
(Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin mikroskopik görüntüsü
(Cipriano ve Holt, 2005)

O/F testine göre glukoz kullanmaz ancak aktif olarak proteolitikdir (Anacker ve Ordal, 1959; Lorenzen, 1993; Madsen ve Dalsgaard, 1999).

Katalaz, sitokrom oksidaz testleri ve flexirubin pigment yönünden pozitif, jelatin hidrolizi (+) olan ve nişastayı hidrolize edemeyen bir bakteridir (Austin ve Austin, 1999; Kubilay, 2009).

Zayıf kayma hareketleri yapar, mikrokist ve sporakarp üretmez (Borg, 1960; Pacha, 1968).

2.1.3. Duyarlı balık türleri ve mortalite

Bu hastalık daha çok salmonid cinsi balıkların özellikle yavrularında ortaya çıkmakla birlikte, etken bakteri bazı sazan balıklarından ve diğer başka bazı balık türlerinden de izole edilmiştir (Cipriano ve Holt, 2005).

Hastalık etkeninin yayıldığı balık çiftliklerinde ölüm oranları %30-90 arasında değişmektedir (Holt vd., 1993; Lorenzen vd., 1991; İspir vd., 2004).

2.1.4. Epizootiyoloji

Myxobakteriler, doğadaki tatlı su ve deniz suyunda doğal olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla sağlıklı salmonidlerin solungaçlarından izole edilebilmektedirler (Pacha ve Porter, 1968). *F. psychrophilum* bakterisinin neden olduğu soğuksu hastalığı çoğunlukla yemlemenin başladığı ilk 2 ay içerisinde ortaya çıkmaktadır.

Hastalık horizontal olarak balıktan balığa geçebilmektedir. Deri üzerindeki bazı yaralar ve lezyonlar bulunması halinde horizontal yolla bulaşma daha sıklıkla görülmektedir (Madsen ve Dalsgaard 1999; Madetoja vd., 2000).

Hastalık etkeninin vertikal yolla (Anaç balıklardan yavrulara) taşınması da söz konusu olup, erişkin balıkların yumurtalık ve seminal sıvılarından ve yumurta yüzeylerinden izole edilebilmektedir (Holt vd., 1993; Rangdale vd., 1996).

Soğuk su hastalığı epizootikleri sıklıkla 4-10° C arasındaki su sıcaklıklarında ortaya çıkarlar (Borg, 1960). Fakat su sıcaklığı 15-18 ° C' ye ulaştığında mortalitelere

düşüş görülür (Holt vd., 1989; Santos vd., 1992). Hastalığa 0,5-5 gram ağırlığındaki balıklar daha duyarlıdır.

Çeşitli salmonid türlerinde viral, bakteriyel ve parazitik patojenlerle birlikte görülebilir. Evensen ve Lorenzen (1997) tarafından gökkuşağı alabalıklarında İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis virüsü ile birlikte eş zamanlı olarak kaydedilmiştir. Amerika'nın Pacific Northwest Bölgesinde gökkuşağı alabalıklarında *F. psychrophilum* bakterisi sıklıkla İnfeksiyöz Hematopietik Nekrozis Virüs (IHNV) ile birlikte görülmektedir (La Frenz vd., 2004).

Yine Amerikannın Oregon eyaletinde *Oncorhynchus nerka* balıklarında IHNV, soğuk su hastalığı etkeni ve eksternal mantar epizootikleri aynı anda birkaç kış boyunca gözlenmiştir. (Engelking ve Kaufman, 1994). *F. psychrophilum*' un Chinook salmonlarda Bakteriyel Böbrek Hastalığı ve Furunkolizosle birlikte görüldüğü de kaydedilmiştir. (Cipriano vd., 1996; Hansen, 1990). Gökkuşağı alabalıklarında *F. psychrophilum*' a bağlı mortalitelerin bir ektoparazit olan *Gyrodactylus derjavini* ile birlikte artış gösterdiği de tespit edilmiştir (Busch vd., 2003).

Flavobacterium psychrophilum bakterisi sudan ve nehir kenarlarını kaplayan alglerden izole edilebilmekte ve 15 °C steril tatlı su içerisinde 300 gün kadar canlılığını yitirmeden kalabilmektedir (Amita vd., 2000; Madetoja vd., 2003).

2.1.5. Hastalık belirtileri

F. psychrophilum' un neden olduğu soğuk su hastalığının şiddeti ve belirtileri salmonidlerin gelişim basamaklarına göre değişkenlik göstermektedir. Hastalığa öncelikli olarak yavru balıklar duyarlıdır. Bakteri, gökkuşağı alabalığı frylarında % 50-90 oranında mortalite ve anemi ile birlikte genel bir septisemiye ve kansızlığa neden olmaktadır (Lorenzen vd., 1991). Hastalığa yakalanan gökkuşağı alabalığı frylarında görülen bir diğer karakteristik özellik ise karın duvarı boyunca genişlemiş bir dalaktır. Letarji, yem alımında azalma, deri renginde koyulaşma ve karında sıvı birikimi diğer hastalık belirtilerindendir (Dalsgaard, 1993).

Solungaçlar ve iç organlar solgun ve anemiktir. Eritrosit sayılarında belirgin bir düşüş vardır (Lorenzen vd., 1991). İnfekte frylarda bağırsak incelmıştır, kaudal bölgede yangı reaksiyonlarına bağlı kızarıklıklar oluşur. Arka böbrekte hipertrofi, ön

böbrekte atrofi ve iskelet deformasyonları hastalığın diğer belirtileri arasındadır (Bernardet ve Kerouault, 1989; Bruno, 1992; Evensen ve Lorenzen, 1996; Madsen vd., 2001).

2.1.6. Tedavi ve korunma

Flavobacterium psychrophilum enfeksiyonları antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir. Oksitetrasiklin hastalığın tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak Dalsgaard ve Madsen (2000), *F. psychrophilum* izolatlarıyla yaptıkları bir çalışmada bu antibiyotiğe karşı direnç seviyesinin, çalışmanın yapıldığı tarih itibariyle son iki yıl içerisinde %52' den %76'ya yükseldiğini göstermişlerdir. Danimarka' da akuakültürde kullanımı lisanslı olan trimetoprim/sulfadiazin ve oksolinik asit balık çiftliklerinde uygulandıklarında *F. psychrophilum*'a karşı etkili olmuşlardır. Fakat Bruun vd. (2000), 397 adet *F. psychrophilum* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada 8 tanesi hariç diğer izolatların tümünün trimetoprim/sulfadiazine karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Dalsgaard ve Madsen (2000) tarafından yapılan bir diğer çalışmada izolatların %50' si oksolinik aside karşı direnç gösterirken amoksisiline karşı tümü duyarlılık göstermiştir.

Antibiyotik tedavilerine alternatif olarak Lorenzen (1994), su sıcaklığının yükseltilmesi suretiyle hastalığın tedavi edilebileceğini öne sürmüştür. Bu amaçla 12°C su sıcaklığında yaşayan ve ortalama ağırlıkları 30,6 gram olan gökkuşağı alabalıklarını deneysel olarak enfekte etmiş, mortaliteler en yüksek seviyedeyken daha sonra su sıcaklığını 22°C' ye çıkarmıştır. 10 gün sonra su sıcaklığını tekrar 12°C' ye düşürdüğünde mortalitelerin tekrar ortaya çıkmadığını tespit etmiştir. Danimarka Alabalık Yetiştiriciliği Merkezi tarafından yapılan bir araştırmada ortalama 0,5 ağırlığındaki enfekte frylar su sıcaklığı 15 ve 22 °C olan tanklara transfer edildiklerinde mortalitelerde küçük bir miktar düşüş gözlenmiştir. Ancak bu yöntemin olumsuz bir tarafı, Holt (1989) tarafından da araştırıldığı üzere, yüksek su sıcaklığının başka bakteriyel ve mantar hastalıklarına zemin hazırlayabilmesidir.

Flavobacterium psychrophilum'a karşı profilaktif bir yaklaşım ise aşı uygulamalarıdır. Ancak hastalığa karşı henüz ticari bir aşı geliştirilmemiştir. Aşı çalışmaları tüm bakteri hücrelerinin öldürülmesi suretiyle yapılmış ve çeşitli sonuçlar ortaya çıkmıştır (Holt, 1987; Obach ve Baudin-Lurencin, 1991; Lorenzen, 1994).

Obach ve Baudin-Lurencin (1991), 0,5 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalığı yavrularının banyo yöntemiyle aşılmasının, intraperitonel aşılama ve kontrol grubuna oranla daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık Lorenzen (1994), 1 gram ağırlığındaki balıklarda intraperitonel yolla aşılamanın banyo yöntemiyle aşılama göre daha iyi sonuçlar verdiğini, ancak 1 gramdan daha küçük balıklarda aşı uygulamalarının koruma sağlamadığını öne sürmüştür. Holt (1987), yaptığı aşı çalışmalarında banyo yöntemiyle yapılan aşı uygulamalarının etkili olabilmesi için balıkların en az 1 gram olması gerektiğini tespit etmiştir.

Yine *F. psychrophilum*'a karşı koruyucu tedbirler olarak aşırı stoklamadan kaçınılmalı, optimum su kalitesi sağlanmalı ve hijyen kurallarına dikkat edilmelidir. Yumurtalara belirli aralıklarla iyodofor ve hidrojen peroksit uygulamaları yapılmalıdır (USFWS 1995; Branson 1995).

2.2. Probiyotik Bakteriler

2.2.1. Probiyotik bakterinin tanımı

Probiyotik kelimesi Latince “pro” ve “bios” köklerinden türetilmiş ve ‘Yaşam için’ anlamına gelmektedir (Işıdan, 2009). Probiyotik kelimesinin tanımı ilk defa Lilly ve Stillwell (1965) tarafından ‘Bir mikroorganizma tarafından sentezlenen ve bir diğer mikroorganizmanın büyümesini uyaran maddeler’ şeklinde tanımlanmıştır. Sperti (1971) ise bu terimi ‘Mikrobiyal üremeyi teşvik eden doku ekstraktları’ için kullanmıştır. Probiyotik kelimesi günümüzde kullanıldığı anlamıyla ilk kez Parker (1974) tarafından ‘İntestinal kanaldaki mikrobiyal dengeyi sağlamada katkısı olan organizma ve maddeler’ olarak tanımlanmıştır. Fuller (1989) yılında Parker’ın tanımını geliştirerek ‘Konakçı hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek yararlı etki sağlayan canlı mikrobiyal katkı maddeleri’ şeklinde tanımlamıştır. Bu tanımda hem güçlü bir probiyotik etki için canlı hücre varlığı, hem de konakçısına sağladığı yarar özellikle vurgulanmıştır. Havenaar vd. (1992), bu tanımı daha da

genişletmişler ve probiyotikler için ‘İnsan veya hayvanlara uygulandığında yararlı mikrofloranın etkisini artıran tek ya da karışık canlı mikroorganizma kültürü’ tanımını yapmışlardır. 1995 yılında Avrupa birliğinin girişimi ile Brüksel’ de probiyotik konulu uzmanlar toplantısı yapılmış, bu çerçevede probiyotikler; sağlığı artırıcı etki gösteren beslenme fizyolojisinin ana sistemleri üzerinde etkili, canlı, belirli mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Vural, 2000).

2.2.2. Probiyotik bakterilerin zellikleri

Probiyotik bakterilerin olumlu etkileri bir çok çalışmada gösterilmiş olsa da bu bakterilerin bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu zellikleri kısaca şöyle özetleyebiliriz (Fuller, 1989; Dunne vd., 2001; Fernndez vd., 2003; nal vd., 2005):

1) Asit ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdırlar.

Probiyotik bakterilerinde ilk aranan özellik asite karşı dirençli olmalarıdır. Ağız yoluyla alınan probiyotiklerin bağırsağa ulaşmadan önce midenin asit ortamından canlı olarak geçebilmeleri gerekmektedir. Bu yüzden de asit toleranslarının yüksek olması gerekmektedir.

2) Bağırsak yüzeyine tutunabilmelidirler.

Probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışması, patojenlerin kolonizasyonunu azalttığı, immün sistemi modüle ettiği için ve zarar gören mukozanın iyileşmesini artırdığı için önemli olabilmektedir. Ayrıca probiyotik kültürlerin bağırsağa ulaşması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine yapışması gerekmektedir. Bağırsak mukozasına probiyotik mikroorganizmaların yapışması, kolonizasyon ve enteropatojenlere karşı antagonistik etki gösterebilmesi açısından önemli bir unsurdur.

3) Probiyotik bakteri güvenli olmalıdır. Kullanılacak probiyotiklerle ilgili yeteri kadar klinik çalışma yapılmış olması gerekir. Bu bakterilerin konakısına herhangi bir yan etkisinin bulunmaması gerekmektedir. Kullanılan bakterilerin etkili oldukları minimum dozlar belirlenmiş olmalıdır.

4) Probiyotik olarak kullanılacak bakteriler canlı hücrelerden oluşmalıdırlar.

5) Antimikrobiyal etkiye sahip olmalıdırlar.

Probiyotik bakteriler antimikrobiyal etkileri ile patojenleri etki altına alırlar. Laktik asit, hidrojenperoksit gibi maddeler üreterek patojenleri etkisiz hale getirirler.

- 6) Probiyotik üretiminde kullanılan suşlar aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemelidir
- 7) Antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdırlar.

2.2.3. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları

Probiyotiklerin etki mekanizmalarını açıklamak için günümüze kadar çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Bu teoriler üç ana başlık altında toplanmıştır

1) Antimikrobiyal etkileri

- a) Bazı probiyotikler fermantasyon sırasında laktik asit, bütrik asit ve asetik asit ortaya çıkarmakta ve dolayısıyla bağırsakta luminal pH' ın düşmesine neden olarak, oluşan asidik ortam sayesinde bazı patojen bakteriler için elverişsiz yaşam koşulları oluşturmaktadır (Naidau vd., 1999).
- b) Bağırsak yüzeyinde epitel hücrelere yapışabilmek için patojen bakterilerle rekabete girmektedirler (Salminen, 1998)
- c) Bağırsakta hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal bileşikler salgılayarak patojenlerin üremesini inhibe etmektedirler (Dahiya ve Speck, 1968).
- d) Bağırsakta mukus salgısı artışına neden olarak bağırsağın bariyer fonksiyonunu arttırarak bakteri ve antijenlerin geçişini engeller (Yan ve Polk, 2002).

2) Bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri

- a) Bağırsak yüzeyinde antikor (IgA) salgısını arttırırlar (Kaila vd., 1992).
- b) Fagositik aktiviteyi ve doğal öldürücü hücrelerin etkinliğini arttırırlar (Olivares vd., 2006).

3) Vitamin metabolizmasında rol oynarlar (Madhu vd., 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda probiyotiklerin antikanserojen etkileri de gösterilmiştir.

İntestinal kanalda mevcut olan β -glukuronidaz ve azoredüktaz gibi enzimlerin prokarsinojenleri karsinojen maddelere dönüştürdükleri bilinmektedir (Goldin ve Gorbach, 1984). İnsanlarda yapılan bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus*

bakterisinin oral uygulamasından sonra bağırsakta β -glukuronidaz enzim konsantrasyonunda düşüş olduğu gözlenmiştir (Salminen vd., 1998).

Bazı laktik asit bakterileri gıdalarda bulunan mutajenik maddelerin etkilerini azaltabilmektedirler. Yapılan bir çalışmada, birkaç çeşit probiyotik katılarak fermente edilen sütün, tek bir çeşit laktik asit bakterisi katılarak fermente edilen süte göre daha çok mutajenik etkiyi azalttığı gözlenmiştir (Tamai, 1995).

Laktik asit bakterileri kolon kanserine karşı da etki gösterirler. Malhotra (1977) ve Peters vd. (1992), yaptıkları araştırmalarda düzenli olarak fermente süt ürünleriyle beslenen insanlarda kolon kanserinin görülme insidansının azaldığını göstermişlerdir. Probiyotiklerin stres ve depresyon etkilerini azaltıcı etkileri de vardır. Probiyotiklerin oksidatif stresi azalttığı ve sitokin salınımını düzenlediği öne sürülmektedir (Logan ve Katzman, 2005; Desboonet vd., 2005).

Probiyotik olarak kullanılan bazı bakteri türleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Yılsoy ve Kurdal, 2000).

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı bakteri türleri (Yılsoy ve Kurdal, 2000)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. bulgaricus, L. cellebiosis, L. delbrueckii, L. lactis, L. acidophilus, L. reuteri, L. brevis, L. casei, L. curvatus, L. fermentum, L. plantarum, L. johnsonii, L. rhamnosus, L. helveticus, L. salivarius, L. gasseri, L. crispatus</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>B. adolescentis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>B. subtilis, B. pumilus, B. lentus, B. licheniformis, B. coagulans, B. cereus</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>P. cerevisiae, P. acidilactici, P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>S. cremoris, S. thermophilus, S. intermedius, S. lactis, S. diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>B. capillus, B. suis, B. ruminicola, B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>P. shermanii, P. freudenreichi</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Enterococcus</i> türleri	<i>E. faecium</i>
Mantarlar	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces Boulardii, Candida torulopsis</i>

2.3. Balık Mikrofloralarında Bakteriyel Dağılım ve Mikroflora- Probiyotik Bakteri İlişkisi

Balıklarda bakteriyel floranın bilinmesi, potansiyel olarak hastalık oluşturma yeteneğindeki fırsatçı patojen bakterilerin varlığını belirleme imkanı sağlar. Eğer balıklar stres içindeyse ve yaşadıkları ortamda uygun olmayan bir sıcaklık ve oksijen konsantrasyonu söz konusu ise suyun bakteriyel yükü önemli ölçüde artarak hastalık oluşturacak şartlar ortaya çıkar. Yani balıkların doğal mikroflorasında az sayıda bulunan ve zararlı etki göstermeyen bazı bakteri türleri stres faktörlerinin etkisiyle fırsatçı patojen haline gelebilmektedir. Havuzlardaki balık stoklarının yaşadığı sudaki bakteriyel patojenlerin bilinmesi, bakteriyel hastalıklar nedeniyle ortaya çıkabilecek kayıpları azaltmakta yarar sağlayabilir (Diler vd., 2000).

Örneğin motil *Aeromonas*' lar özellikle tatlı su balıklarında doğal mikrofloranın dominant unsurlarından olup, fırsatçı patojen karakterleriyle balıklarda hemorajik septisemiye neden olabilmektedirler (Bulduklu ve Özer, 2007).

Balıkların bakterilerle ilk tanışması daha henüz yumurta dönemindeyken başlar. Yumurta yüzeyine bakteriyel adezyon ve kolonizasyon, döllenmeden birkaç saat sonra meydana gelir. Larvaların yumurtadan çıkmasıyla birlikte yem alımı ve suyla doğrudan temas olur ve larvaların mikroflorası yem ve suyun mikroflorasıyla paralel olarak gelişmeye devam eder (Hansen ve Olafsen, 1999).

Gastrointestinal kanalın en karakteristik özelliklerinden biri de yüzeyindeki epitel doku ile kommensal bakteriler arasında sürekli bir ilişki olmasıdır. Bu ilişki bağırsak mukozasındaki dengenin sağlanabilmesi açısından önemlidir (Yan ve Polk, 2004).

Balıkların bağırsak florasının su ve yemlerde bulunan bakteriyel türlerin bir yansıması olduğu belirtilmiştir (Blanch vd., 1997).

Balıklarda mikrobiyal flora üzerinde yapılan çalışmalarda bazı balık türlerinde spesifik bir bakteriyel flora olduğu görüşü hakimdir. Hatta sindirim kanalının anatomik özellikleri ve kompleksliğine göre bağırsak mikroflorası değişebilmektedir (Huss, 1988; Cahil, 1990).

Balıkların mikroflorası; yaşadığı suya, mevsime ve gelişim dönemine göre de farklılık gösterir (İnal, 1992). Austin (1987), genellikle balıklardan izole edilen bakteri cinslerinin dağılımının, balıkların yaşadıkları akuatik habitat ile bağlantılı olup söz konusu habitatın tuzluluğu ve suyun bakteriyel yükü gibi faktörlerden etkilendiğini bildirmektedir.

Açık denizlerin suyu çok az miktarlarda bakteri içerirken, kıyı bölgelerde kirlenmenin daha fazla olması nedeniyle mikrofloradaki bakteri sayısı artmaktadır (Gökoğlu, 2002).

Yetiştiricilik yolu ile üretilen balık türlerinin yanı sıra doğada yaşayan tatlısu ve deniz balıklarının, bakteriyel florası üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan incelemelerde tatlı su balıklarının bakteriyel florasının deniz balıklarından önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir. Tatlı sularda yaşayan balıkların florasında *Aeromonas* ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler baskın olarak görülürken, Deniz sularında yaşayan balıklarda *Enterobacteria cinsi* bakteriler hakim durumdadır (Nieto vd., 1984).

Hamid vd. (1978), çalışmalarında kefal balıklarını önce tatlı su bulunan ortamda, daha sonra deniz suyu bulunan bir ortamda muhafaza edip balıkların mikrofloralarını incelemişlerdir. Balıklar tatlı suda iken *Enterobacter*, *Bacillus* ve *Micrococcus* türleri baskın olarak görülürken tuzlu suya (Deniz suyuna) alındıklarında *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri baskın olarak görülmüştür.

Tilapia balıklarında yapılan bir araştırmada tatlı su ortamında bulunan tilapialarda baskın türler *Aeromonas* ve *Pseudomonas* olarak belirlenirken, deniz suyu ortamında bulunan baskın türler *Vibrio* ve *Aeromonas* olarak belirlenmiştir (Sakata vd., 1980)

Sarıeyyüpoğlu (1984) tarafından 100 adet gökkuşağı alabalığı mide ve bağırsak floraları ile 24 su ve 8 yem örneği aerobik mikroorganizmalar açısından incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda alabalıkların mide ve bağırsak florasından %28,0 *Enterobacter*, %13,6 *Aeromonas*, %11,0 *Bacillus*, %8,3 *Streptococcus*, %7,4 *Pseudomonas*, %7,0 *Micrococcus*, %5,8 *Vibrio*, %5,0

Escherichia coli, %3,8 *Acinetobacter*, %3,4 *Flavobacterium*, %2,3 *Achromobacter*, %1,1 *Corynebacterium*, %1,0 *Staphylococcus*, %1,0 *Salmonella*, %0,7 *Shigella*, %0,5 *Alcaligenes* ve %0,1 *Proteus* türü izole ettiğini bildirmiştir.

Diler vd., (2000) iki farklı işletmeden aldıkları gökkuşuğu alabalıklarının bağırsak, deri, solungaç, karaciğer dalak, böbreklerinde mikrofloranın tespiti ile ilgili araştırmaları sonucunda *Coryneform* grup, *Aeromonas*, Gram pozitif kok ve Enterobacteriaceae ailesinden olan bakterilerin baskın olduklarını görmüşlerdir.

Nieto vd., (1984) iki farklı balık çiftliğinden temin ettikleri gökkuşuğu alabalıklarının mikrofloralarını incelemişlerdir. Sonuçta her iki balık çiftliğinden alınana balıklarda *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Enterobacteria* cinsi bakterilerin mikroflorada dominant olarak bulduklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca florada *Vibrio*, *Corynebacteria*, *Flavobacterium* ve *Acinetobacter* cinsi bakterileri de tespit edilmiştir.

Kapetanovic vd. (2005), gökkuşuğu alabalığının solungaç, kalp ve böbrek mikroflorasını incelemişlerdir. Gökkuşuğu alabalığı fryları inkübatörde iken izolatların %64,7'si gram (+) olan *Corynebacterium aquaticum*, *Lactobacillus spp.*, *Renibacterium salmoninarum* bakterilerinden, %35,3 ü ise gram (-) olan *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Yersinia sp.* bakterinden oluşmakta iken fryların havuzlara transferinden sonra toplam mikroflora gram (-) bakteriler açısından artış göstermiştir. Gr (-) bakterilerin oranı % 97'ye çıkarken Gr (+) bakterilerin oranı % 2,93'e düşmüştür. Bu % 97'lik oranın % 28,45'ini *Aeromonas spp.*, % 25, 94'lük oranını *Pseudomonas spp.*, bakterileri oluşturarak mikrofloranın baskın türleri olmuşlardır.

Sousa vd. (2001), brezilyadaki bir ırmaktan temin ettiği 14 farklı balık türünün mikroflorasını incelemiş ve *Aeromonas* cinsi bakteriler başta olmak üzere *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacteria* cinsi bakterilerin mikroflorada baskın olarak yer aldıklarını tespit etmişlerdir

Antibiyotik ve diğ er ilaçların kullanımı, çevre kirliliğ i, stres, geç irilen hastalıklar sonucunda immun sistemin baskılanması ve yaş lanma gibi faktörlerin etkisiyle balıkların mikrofloral dengesi bozulabilmektedir (Holzapfel vd., 1998).

İşte bu noktada probiyotik bakteriler devreye girer ve bozulan mikrofloral dengeyi yeniden kurarlar.

Probiyotik bakteriler konakç ı türlerine göre özgünlük göstermektedirler. O yüzden kullanım için seç ilcek olan probiyotik bakteri türü, o canlının mikroflorasından izole edilmiş bir bakteri türü ise çok daha olumlu sonuçlar vermektedir (Duangjitcharoen vd., 2008). Bu yüzden probiyotik bakterilerin seçiminde konakç ı canlının mikroflorasının iyi tanınmış olması çok önemli bir faktördür.

2.4. Balıklarda Spesifik Olmayan Bağ ışıklık Sistemi

Spesifik olmayan bağ ışıklık sistemi, enfeksiyonları önleme, yayılmalarını kontrol etme ve doku hasarını azaltmaya yönelik birçok işlevi içerir. Balıklarda non-spesifik savunma reaksiyonları, immun sistemin hem humoral hem de lenfoid olmayan hücresel komponentleri tarafından oluşturulur. İmmunolojik olmayan bir çok humoral madde ve hücresel salgılar, balıkların patojenik ve infeksiyöz etkenlere karşı gösterdiğ i doğal dirençte rol oynarlar. Bunlar arasında transferin, toksinler, lektinler (Ig yapısında olmayan aglutininler) C- reaktif proteini, çeşitli litik enzimler (Lizozim gibi) interferon, enzimatik olmayan lizinler, enzim inhibitörleri ve komplementler bulunmaktadır (Magnadottir vd., 2005; Ocak, 2006).

Humoral bağ ışıklık, lizozim, komplement, C-reaktif protein, transferin, lektin ve hemolizin gibi komponentler içerir. (Yano, 1996).

Hücresel olan doğal bağ ışıklık ise, balıkları vücuda girebilecek bakterilerden; mukus, deri yüzeyini kaplayan epitel hücreleri ve solungaçlar gibi fiziksel bariyerlerle ve monosit/makrofaj, granülosit ve non-spesifik sitotoksik hücrelerle ve non sitotoksik toksinlerle korur (Aoki vd., 2006).

Patojenleri karşılayan ilk bariyer olarak mukus ve deri, balıkların savunma sisteminde oldukça önemli bir rol oynamaktadırlar. Mukus sıvısı balıklarda goblet

hücreleri tarafından salgılanır ve immunoglobulin, komplement, kreaktif protein (CRP), lektin, lizozim, proteolitik enzimler, alkalın fosfataz ve esteraz, antimikrobiyal peptitler ve hemolizin içerir (Yano, 1996).

Lizozim enzimi anti bakteriyel özelliğinden dolayı bakteriyel hastalıklara karşı balıkların korunmasında önemli bir rol oynar (Mitra vd., 2003).

Lizozim, *Micrococcus lysodeicticus* hücrelerinin lizisine sebep olan, kitinle kaplanmış selüloz tarafından hazır bir şekilde absorbe edilen, düşük moleküler ağırlıklı bir proteindir. Ayrıca yüksek sıcaklığa, asidik pH'a dayanıklı olan fakat alkali koşullarda inaktive olan bir enzimdir (Iwama ve Nakanishi, 1996).

Balıklarda spesifik olmayan bağışıklık sisteminin önemli bir ögesi olan lizozim enzimi, bakteriyel invazyonun yüksek derecede görüldüğü ve lökosit miktarınca zengin deri, solungaç ve yumurtlarda bol miktarda bulunmaktadır (Grinde vd., 1988; Fletcher ve White, 1973).

Memelilerde sadece gram pozitif bakterilere karşı etki eden lizozim enziminin balıklarda komplement yokluğunda gram negatif bakterilere karşı da etkili olduğu kaydedilmiştir (Grinde, 1989).

Coho salmon yumurtalarından elde edilen 700µg/ml konsantrasyonundaki lizozim enziminin *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* ve *Carnobacterium piscicola* patojenlerine karşı bakterisidal etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Monositlerin farklılaşmasıyla oluşan makrofajlar, yüksek fagositoz yeteneğine sahip hücrelerdir ve balıklarda karaciğer, dalak gibi lenfoid organlarda çok sayıda bulunmaktadır (Agius ve Roberts, 2003).

Spesifik olmayan bağışıklık sisteminin bir diğer unsuru olan granüositler balıklarda da memelilerde olduğu gibi nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Ancak bütün balık türlerinde her üç granulosit tipine rastlanmaz. Örneğin benekli yayında sadece nötrofiller bulunurken, sazan türlerinde her üç granulosit tipi bulunmaktadır.

Balık nötrofilleri birçok durumda fagositik özellik gösterir. İzole edilen balık nötrofillerinin fonksiyonları arasında fagositozun yanı sıra kemotaksis ve respiratorik

yıkım aracılığı ile bakterisidal aktivite de bulunmaktadır (Olafsen, 1995; Ocak, 2006).

2.5. Ülkemizde Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Bakterilerin kullanımıyla İlgili Yapılmış Olan Çalışmalar

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik bakterilerin kullanımıyla ilgili dünyada bir çok çalışma yer alırken, ülkemizde konuyla ilgili çok az sayıda yapılmış çalışma vardır.

Çapkın ve Altınok (2009), gökkuşağı alabalıklarından izole ettikleri *Enterobacter cloacae* ve *Bacillus mojavensis* bakterilerini 1×10^8 hücre/gram dozunda yeme ilave etmek suretiyle balıkları 60 gün boyunca beslenmişler ve 60. günün sonunda *Yersinia ruckeri* bakterisi ile eprüvasyon testi uygulamışlardır. Sonuçta hayatta kalma oranları kontrol grubunda % 35 iken test grubunda % 99 olmuştur. Ayrıca bu probiyotik bakteriler, balıkların kan parametrelerinde ve ağırlık artışlarında olumlu yönde etkilere neden olmuşlardır. Buradaki % 99'luk koruma potansiyeli oldukça önemlidir. Kullanılan probiyotikler aşı uygulaması kadar etkili olmuşlardır.

Süzer vd. (2008), yaptıkları bir çalışmada; *Lactobacillus spp.* bakterisini içeren ticari probiyotik çipura balıklarının gelişme parametreleri ve sindirim enzimleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Deneylerini probiyotik bakterinin veriliş yoluna göre 3 grup altında yapmışlardır. Birinci grupta probiyotik bakteriyi sadece canlı yeme, ikinci grupta hem canlı yeme hem suya, üçüncü grupta ise sadece suya ilave etmişlerdir. Ayrıca probiyotik verilmeyen bir kontrol grubu da oluşturmuşlardır. Sonuçta birinci ve ikinci gruplarda probiyotik bakteriler çipura balıklarının sindirim enzimlerinin aktivitesini yükseltmiş, ağırlık ortalamalarında artışa neden olmuştur. Probiyotik bakterinin sadece suya ilave edilmesinin balıkların sindirim enzimlerinin aktivitesi ya da gelişme parametreleri üzerine etkisi olmamıştır.

Öztürk (2007) ise bir firmadan elde ettiği ticari bir probiyotik olan *Lactobacillus rhamnosus* bakterisininin larva, yavru ve yetişkin levrek balıkları üzerine olan etkisini araştırmıştır. Larvaların kafeslere aktarılmadan önce kontrol grubu da dahil

olmak üzere üç deneme grubunun deformasyon oranları tespit edilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda larvalarda deformasyon oranları yetiştirme suyu+toz yemine (Deneme 1) probiyotik ilave edilenlerde % 5, canlı yem+ toz yemine (Deneme 2) probiyotik ilave edilen larvalarda %2 ve kontrol grubundaki larvalarda % 7 olarak tespit edilmiştir. Larval ve yavru dönemde probiyotik kullanımının ağırlık artışına etkisi olmadığı gözlenmiştir. Yumurtadan çıkan larvaların tanklara aktarılması sonrasındaki yaşama oranı bulgularında ise istatistiksel açıdan önemli sonuçlar elde edilmiştir. larval yaşama oranı deneme grubunda % 27,4 iken kontrol grubunda % 18,9 olarak belirlenmiştir. Yavru dönemindeki balıkların kafeslere aktarılması sonrasında ise yaşama oranlarında herhangi bir fark gözlenmemiştir.

Yiğit ve arkadaşları (2009), Bactocell (*Pediococcus acidilactici*)'in melek balıklarının büyümesi üzerine olan etkileri araştırmışlar ve bu probiyotiğin balıkların gelişmesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Kaya (2007), yaptığı çalışmada Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) adlı ticari probiyotiği gökkuşağı alabalıkları üzerindeki etkilerini incelemiş ve hem bağışıklık sistemini uyardığını, hem de balıklardaki büyüme oranlarını arttırdığını göstermiştir.

Dulluç (2010), Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) ticari probiyotiğini tilapia (*Oreochromis niloticus*) ve aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarının yemine ilave etmek suretiyle uygulamış ve bu probiyotik bakterini balıkların yem değerlendirmelerine ve besin maddelerinin sindirilebilirliğine olumlu yönde etki ettiğini ortaya koymuştur.

2.6. Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Probiyotik Bakteri Uygulamaları İle İlgili Yapılmış Olan Çalışmalar

Raida ve arkadaşları (2003), BioPlus2B (*Bacillus subtilis* ve *B. licheniformis*) adlı ticari probiyotiği ve Ergosan adlı deniz alglerinden ekstrakte edilen alg bazlı bir bağışıklık sistemi güçlendiricisi olarak kullanılan ticari bileşimi balıklarda kızılbaş hastalığına neden olan *Yersinia ruckeri* bakterisine karşı denemişlerdir. Çalışmalarında iki paralel grup kullanmışlardır. 42 gün süren besleme çalışmasının

sonunda test bakterisi ile epruvasyon testi uygulandığında mortaliteler; kontrol grubunda %83,3 - %91,7, Ergosan içeren yemle beslenen grupta %91,7 - %61,7, Bioplus 2B içeren yemle beslenen grupta ise %58,3 - %58,3 olarak tespit etmişlerdir. Kan parametreleri incelendiğinde hematokrit, plazma protein ve lenfosit seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmezken Bioplus 2B ile beslenen grupta yüksek antikor seviyeleri gözlenmiştir. Bu alışmada Bioplus 2B, balıkların gelişimleri üzerine de etkili olmuştur.

Gökkuşağı alabalıkları zerine Bioplus 2B adlı ticari probiyotiğin etkileriyle ilgili bir çalışma da Bagheri vd. (2008) tarafından yapılmıştır. alışmalarında ortalama ağırlıkları 120 gram olan balıklar 2 ay boyunca Bioplus 2B' nin farklı dozlarını içeren yemlerle beslenmişlerdir. Birinci deneme grubuna: $4,8 \times 10^8$ cfu/g, ikinci deneme grubuna; $1,2 \times 10^9$ cfu/g nc deneme grubuna; $2,01 \times 10^9$ cfu/g, dördüncü deneme grubuna $3,8 \times 10^9$ cfu/g ve beşinci deneme grubuna ; $6,1 \times 10^9$ cfu/g dozunda probiyotik uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada probiyotik bakteriler, balıkların hem büyüme miktarları hem de hayatta kalma oranları üzerinde etkili olmuştur. Farklı probiyotik dozlarının uygulandığı bu çalışmada balıkların büyüme miktarları ve yaşama oranlarında en yüksek etkiyi $3,8 \times 10^9$ dozunda probiyotik uygulanan grup göstermiştir. Bu çalışmada probiyotik bakterilerin etkili oldukları belli kritik doz seviyeleri olduğu ve bu seviyenin daha üstündeki dozlarda probiyotik uygulamasının, beraberinde daha yüksek gelişme oranları getirmediği ortaya konmuştur.

Probiyotik bakterilerin furunkulozis hastalığına karşı etkileri de incelenmiştir (Ali, 2000). Ticari bir probiyotik karışımı olan Add-B (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Rhodomicrobium vannielii*), 6 hafta boyunca gökkuşağı alabalıklarının suyuna ilave edilmiştir. *Aeromonas salmonicida* bakterisi ile epruvasyon testi yapıldığında, kontrol grubundaki ölümler %55,8 iken test grubundaki ölümler %40,4 olarak tespit edilmiştir.

Gökkuşağı alabalıklarında görülen *Aeromonas salmonicida* enfeksiyonlarına karşı bir çalışma daha yapılmıştır (Brunt ve Austin, 2005). Gökkuşağı alabalığının sindirim

kanalından izole edilen *Aeromonas sobria* adlı bakteri potansiyel probiyotik olarak balıkların yemine ilave edilmiş ve bu şekilde ortalama ağırlıklar 25 gram olan balıklar 14 gün süreyle beslenmiştir. Bu sürenin sonunda *Aeromonas salmonicida* ile test edildiklerinde kontrol grubunda mortaliteler %75- 100 iken, probiyotikle beslenen gruplarda %0- 6 olarak kaydedilmiştir. Balıkların kan parametreleri incelendiğinde respiratory burst aktivitelerinde, fagositik aktivitede ve lökosit miktarlarında önemli değişiklikler bulunmuştur.

Probiyotik bakterilerin etki süreleriyle ilgili bir çalışma Sharifuzzaman ve Austin (2010) tarafından yapılmıştır. 10-15 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıkları 2 hafta boyunca Kocuria SM1 ticari probiyotiği ile beslenmiş, 2. haftanın sonunda yeme probiyotik ilavesi kaldırılmış ve 5 hafta boyunca birer hafta aralıklarla balıklara *Vibrio anguillarum* patojeni verilmiştir. Kontrol grubundaki ölüm oranları birinci haftadan 5. haftaya doğru sırasıyla; %79- %92- %76- %78- %78 iken, test grubundaki ölüm oranları sırasıyla; %10- %27- %24- %28- %50 şeklinde oluşmuştur. Kocuria SM1 ticari probiyotiği en yüksek etkiyi 1. haftada göstermiştir.

Sharifuzzaman ve Austin (2009), Probiyotik bakterinin uygulama süreleriyle ilgili bir çalışma da yapmışlardır. Bunun için gökkuşağı alabalıklarını yine Kocuria SM1 ticari probiyotiği ile 4 hafta boyunca beslemişler ve başlangıçtan itibaren her haftanın sonunda *Vibrio anguillarum* bakterisi ile test etmişlerdir. 4 hafta boyunca haftalık periyotlarla yapılan eprüvasyon sonucunda kontrol grubundaki ölümler %70 -90 arasında değişirken, Kocuria SM1 ile beslenen gruplara test bakterisi uygulandığında 1. haftadan 4. haftaya doğru ölüm oranları sırasıyla %62- %16- %30- %22 şeklinde olmuştur. Kocuria SM1 probiyotiği *Vibrio anguillarum*'a karşı en yüksek koruyucu etkiyi 2 haftalık probiyotik bakterilerle beslenme periyodu sonucunda göstermiştir.

Bioplus 2B'nin gökkuşağı alabalığı larvalarının gelişimleri üzerine olan etkilerinin incelendiği bir araştırmada, 36 gün süresince probiyotikli yemlerle beslenen 400 mg ağırlığındaki larvalarda büyüme ve hayatta kalma oranlarında artış kaydedilmiştir. (Morteza, 2010).

Gökkuşığı alabalığının bağırsak florasından izole edilen *Bacillus subtilis* AB1 suşu 10^7 hücre/g dozunda yeme ilave edilmiş ve balıklar bu yemlerle 14 gün beslenmişlerdir. Sonuçta bu probiyotiğin balıkları *Aeromonas* enfeksiyonlarına karşı koruduğu ayrıca balıkların lizozim aktivitelerine, fagositik hücrelerine, lenfosit miktarlarına, respiratory burst aktivitelerine etki ettikleri gözlenmiştir (Fyzul vd., 2007).

Merrifield vd. (2010), gökkuşığı alabalıklarının probiyotik (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* ve *Enterococcus faecium*) içeren yemlerle 10 hafta süreyle beslenmişlerdir. Sonuçta bu probiyotiklerin balıkların büyüme ve gelişmeleri üzerine herhangi bir etki göstermediklerini kaydetmişlerdir. Ancak bağışıklık sistem parametreleri incelendiğinde *Bacillus* probiyotikleriyle beslenen gruplarda serum lizozim aktivitelerinde ve lökosit seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Carnobacterium maltaromaticum ve *C. divergens* probiyotik bakterilerinin kullanıldığı bir çalışmada *C. maltaromaticum* bakterisiyle beslenen gökkuşığı alabalıklarında fagositik aktivite ile makrofaj ve serum lizozim aktivitesinde artış görülürken, her iki probiyotik bakteriyle beslenen gruplarda mukozal lizozim aktivitesinde artış meydana gelmiştir (Kim ve Austin, 2006).

Laktik asit bakterileriyle yapılan bir çalışmada ise *Lactobacillus rhamnosus*, ortalama 75 gram ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarının yemine ilave edilmiştir. Deneme çalışması 30 gün sürmüştür. 10- 20 ve 30. günlerde balıkların serum lizozim ve lökositlerin fagositik aktivitelerinde önemli oranda artış tespit edilmiştir (Panigrahi vd., 2004).

Probiyotiklerin balık patojenlerine karşı etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ortama 12 gram ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarına 2 hafta boyunca *Bacillus sp.* ve *Aeromonas sobria* içeren yemler verilmiş ve *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *Yersinia ruckeri* bakterileriyle test edilmişlerdir. *A. sobria* probiyotiği ile beslenen gruplar *A. salmonicida*, *L. garvieae*, *S. iniae*, *V. ordalii* patojen bakterileriyle test edildiklerinde

hiç ölüm (%0) gözlenmezken, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri* ile test edildiğinde sadece %6 oranında ölüm gözlenmiştir. Kontrol grubunda ise % 80-92 ölüm oranı kaydedilmiştir. *Bacillus sp.* probiyotiği ile beslenen gruplar *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *V. anguillarum*, *V. ordalii* ve *Yersinia ruckeri* bakterileriyle test edildiklerinde kontrol gruplarında % 80-100 arasında ölüm oranları gözlenirken, *V. anguillarum* ile test edilen grupta %13 oranında, diğer patojenlerin kullanıldığı gruplarda % 0 oranında ölüm gözlenmiştir. *Bacillus sp.* ve *Aeromonas sobria* probiyotikleri yukarıda adı geçen patojen bakterilere karşı oldukça yüksek bir koruma potansiyeli göstermişlerdir. Aynı çalışmada respiratory burst aktivite, total protein ve lizozim aktivitesi probiyotik uygulanan balıklarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur (Brunt vd., 2007).

Aeromonas salmonicida patojen bakterisine karşı probiyotik bakterilerin kullanıldığı başka bir çalışmada ortalama ağırlıkları 2,5 gram frylara ve ortalama ağırlıkları 12 gram olan fingerlinklere *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Carnobacterium sp. probiyotikleri* ile tanımlanamayan bir başka probiyotik türü 14 gün yeme ilave edilmek suretiyle balıklara uygulanmış, 14. günün sonunda *A. salmonicida* ile intraperitoneal yoldan eprüvasyon testi uygulanmış ve çizelge 2.2' deki sonuçlar elde edilmiştir (Irianto ve Austin, 2002).

Çizelge 2.2. 14 gün boyunca farklı probiyotik bakteri türleriyle beslenen gökkuşağı alabalıklarında *Aeromonas salmonicida* bakterisi ile intraperitoneal yoldan yapılan eprüvasyon testi sonucundaki mortaliteler (Irianto ve Austin, 2002).

Probiyotik Bakteri	Frylardaki Mortaliteler	Fingerlinklerdeki Mortaliteler
Tanımlanamayan gram(+) coccus	% 16	% 0
<i>Vibrio fluvialis</i>	% 0	% 80
<i>Aeromonas hydrophila</i>	% 12	% 0
<i>Carnobacterium sp.</i>	% 4	% 10
Kontrol grubu	% 94	% 90

Aeromonas salmonicida patojeni ortalama ağırlıkları 1,5 gram olan ve yine yukarıda adı geçen probiyotik bakterilerle beslenen balıklara bu kez immersiyon yöntemiyle uygulandığında ise çizelge 2.3.' te bulunan sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 2.3.14 gün boyunca farklı probiyotik türleriyle beslenen gökkuşağı alabalıklarında *Aeromonas salmonicida* bakterisi ile immersiyon yöntemiyle yapılan epruvasyon testi sonucundaki mortaliteler (Irianto ve Austin, 2002).

Probiyotik Bakteriler	Tanımı Yapılamayan Gram(+) coccus	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>	Kontrol grubu
Mortalite	% 0	% 6	% 16	% 18	% 76

Bu çalışmada 4 farklı probiyotik bakteri türü de *Aeromonas salmonicida*' ya karşı etkin performans göstermişlerdir (Irianto ve Austin, 2002).

Gram vd. (1999), bir tatlı su balığı olan Nil levreği (*Lates niloticus*)' nden izole ettikleri *Pseudomonas fluorescens* adlı bakteriyi probiyotik olarak ortalama ağırlıkları 40 gram olan gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* adlı patojen bakteriye karşı uygulamışlardır. *P. fluorescens* bakterisini balıkların suyuna ilave etmek suretiyle 5 gün boyunca tankların içine uygulamışlardır (Uzun dönem probiyotik uygulaması). 5. gün balıkları *V. anguillarum* ile test ederken, *P. fluorescens* ile muamele görmemiş başka bir grup gökkuşağı alabalıklarına sadece epruvasyondan 1 saat önce *P. fluorescens* bakterisini banyo yöntemiyle uygulamışlardır. (Kısa dönem probiyotik uygulaması). Sonuçta, kontrol grubunda %50 mortalite görülürken; Uzun dönem (5 Gün) *P. fluorescens* uygulanan grupta % 44 oranında, kısa dönem (1 saat) *P. fluorescens* uygulanan grupta % 35 mortalite kaydedilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan balık ve uygulama yeri

Araştırmada kullanılan gökkuşuğu alabalıkları Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesindeki havuzlardan temin edilip, söz konusu fakültenin kuluçkahane ünitesine nakledilmiştir. Araştırmada ortalama $7 \pm 0,9$ gram ve $2 \pm 0,5$ gram ağırlığındaki toplam 1200 adet sağlıklı gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır. Araştırma süresince balıklar $0,6 \text{ m}^3$ hacimli, içerisinde 400 l su bulunan 8 adet yuvarlak fiberglas tanklara yerleştirilmiştir. Deneysel enfeksiyon uygulamaları ise Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi hastalık ünitesinde yapılmıştır.

3.1.2. Araştırmada kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi

Araştırmada kullanılan artezyen suyunun debisi 12 l/dak, tanklardaki suyun ortalama pH'sı 7.2, oksijeni 7.4 ppm ve sıcaklığı 12°C olarak ölçülmüştür.

3.1.3. Araştırmada kullanılan probiyotik bakteriler

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiricilik Ünitesindeki gökkuşuğu alabalıklarının yaşadığı sudan izole edilen *Pseudomonas sp.* GS adlı potansiyel probiyotik bakteri suşu ile Chr. Hansen adlı firmadan temin edilen Bioplus 2B® (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*) ve Lactiferm® (*Enterococcus faecium*) adlı ticari probiyotikler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Potansiyel probiyotik bakteri (*Pseudomonas sp.* GS) uygulamasında izlenen yollar

3.2.1.1. Potansiyel probiyotik bakterinin (*Pseudomonas sp.* GS) izolasyonu

Araştırma süresince, bakteriyolojik incelemeler SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Potansiyel probiyotik bakteri olarak kullanılan (*Pseudomonas sp.* GS suşu), SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Araştırmada potansiyel probiyotik bakterilerin etkinliğini belirlemek için kullanılan *Flavobacterium psychrophilum*, Fethiye bölgesinde çıkan hastalık salgınından izole edilmiştir.

3.2.1.2. Potansiyel probiyotik bakterinin antagonistik etkisinin belirlenmesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen ve gökkuşuğu alabalığının yaşadığı sudan izole edilmiş olan *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun *F. psychrophilum*'a karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Well Diffüzyon Agar testi kullanılmıştır. Bunun için;

1. TSA'da üretilmiş potansiyel probiyotik bakteriler Triptic Soy Broth'a alınarak, 25°C'de 48 saatlik bakteri kültürleri elde edilmiştir.
2. *F. psychrophilum* suşu Cytophaga (Anacker Ordal) broth'a alınarak, 18°C'de 3 günlük bakteri kültürleri elde edilmiştir.
3. Otoklavda steril edilerek 45-50° C döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş Anacker Ordal's agara 50µl/lt miktarında *F. psychrophilum* bakterisi ilave edilerek besi yeri hazırlanmıştır.
4. *F. psychrophilum* ilave edilmiş Anacker Ordal's agarın dökümü yapıldıktan sonra besiyerinin katılaşması için 15 dakika beklenmiştir. Katılaşma sonrası steril durham tüpleri ile besiyeri üzerinde yaklaşık 3 mm çapında çukurlar açılmıştır.
5. Besiyeri üzerinde açılan çukurlara, potansiyel probiyotik bakteri kültürlerinden (TSB besiyerine ekimleri yapılmış 48 saatlik kültürlerden) 25'er µl ilave edilmiş ve 18°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. Inkübasyon sonrası, çukurların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü yapılmıştır (Hjelm vd., 2004).

Potansiyel probiyotik bakterinin etkinliğini test etmek amacıyla *Vibrio anguillarum* patojen bakterisine karşı antagonistik etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla:

1. TSA'da üretilmiş potansiyel probiyotik bakteriler Tryptic Soy Broth'a alınarak, 25°C'de 48 saatlik bakteri kültürleri elde edilmiştir.
2. T-TSA'de (%1 NaCl içeren TSB) üretilen *Vibrio anguillarum* bakterileri T-TSB'ye alınarak 22°C'de 48 saat inkübe edilmiştir
3. *Vibrio anguillarum* kültüründen 50 µl/l alınarak otoklavda sterilizasyondan sonra döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş T-TSA'ya ilave edilerek besiyerinde homojen dağılımı için karıştırılmıştır.
4. *Vibrio anguillarum* ilave edilmiş T-TSA'nın dökümü yapıldıktan sonra besiyerinin katılaşması için 15 dakika beklenmiştir. Katılaşma sonrası steril durham tüpleri ile besiyeri üzerinde yaklaşık 3 mm çapında çukurlar açılmıştır.
5. Besiyeri üzerinde açılan çukurlara, potansiyel probiyotik bakteri kültürlerinden (sıvı besiyerine ekimi yapılmış 48 saatlik kültürler) 25'er µl ilave edilmiş ve 22°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası, çukurların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü yapılmıştır (Hjelm vd., 2004).

3.2.1.3. Bakterilerin identifikasyonu

Bakterilerin, identifikasyonunda gram boyama, sitokrom oksidaz, katalaz, O/F, hareket muayenesi testi vb. geleneksel teşhis metotları ile birlikte API 20 NE hızlı teşhis kiti kullanılmıştır (Holt vd., 1994; Austin ve Austin, 1999).

3.2.1.4. Potansiyel probiyotik bakteri (*Pseudomonas sp. GS*)' nin gökkuşağı alabalıkları üzerindeki patojenitesinin tespiti

Potansiyel probiyotik bakterilerin gökkuşağı alabalığı yavruları üzerine patojenik etkisinin araştırmak için bakterilerin 25°C'de Tryptic Soy Broth'da 24 saatlik kültürleri geliştirilmiştir. Bakteri kültürü, 4°C'de 5000 devirde 15 dak santrifüj edilmiştir ve santrifüj tüpünde toplanan bakteri hücreleri kültürdeki sıvı besiyerine

eşit hacimdeki PBS (fosfat buffer saline) ile tekrar süspanse edilmiştir. Elde edilen bakteri süspanسیونundaki bakteri sayısı Seyreltme Plak Metodu ile sayılarak süspanسیونdaki bakteri sayısı spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçümü yapılarak standardize edilmiştir (Alavandi vd., 2004; Vijayan vd., 2006; Balcazar vd., 2007).

PBS içerisindeki bakteri süspanسیونları son konsantrasyonu yaklaşık $0,54 \times 10^7$ hücre/ml olacak şekilde 50 adet gökkuşığı alabalığı yavrusuna 45 dk. süreyle banyo şeklinde eprüvasyon uygulaması yapılmıştır (Austin vd., 1995). Balıklar 15 gün süreyle takip edilmiştir.

3.2.1.5. Gökkuşığı alabalığı yavrularına potansiyel probiyotik bakterinin uygulaması

Çalışma her grupta 100'er balık olacak şekilde 4 ana grupta yapılmıştır. Balıklar iki hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Adaptasyon periyodu boyunca gökkuşığı alabalıkları ağırlıklarının %2'si oranında ticari pelet yemiyle sabah, öğle, akşam olmak üzere günde üç kez besleme yapılmıştır. Denemeye başlamadan önce balıklar iki gün aç bırakılmıştır.

Adaptasyon sürecinin ardından 1. grup probiyotik içermeyen yemle, 2. grup ticari probiyotik Bioplus 2B içeren yemle, 3. grup yine ticari bir probiyotik olan Lactiferm içeren yemle, dördüncü grup ise *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşu içeren yemlerle 60 gün boyunca beslenmişlerdir. Çalışma 2 paralel olarak yürütülmüştür.

Bioplus2B 800g/ton yem, Lactiferm 400g/ton, *Pseudomonas sp. GS*' nin PBS'de hazırlanan süspanسیونu $5,4 \times 10^7$ kob/g yem oranında olacak şekilde ilave edilerek günlük olarak verilmiştir (Alavandi vd., 2004).

3.2.1.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotik bakterileri ile potansiyel probiyotik bakteri suşu (*Pseudomonas sp. GS*)' nin etkinliğinin değerlendirilmesi

Yavru gökkuşığı alabalıklarında probiyotik uygulamasını takiben etkinliğinin

değerlendirilmesi amacıyla:

Balıklarda probiyotik bakterilerin sağladığı spesifik olmayan bağışıklık seviyesi ;

- a) Probiyotik uygulamasını sırasında deneme çalışmasının 7. 14. 21. ve 28. günlerinde alınan kan örneklerinde NBT (+) nötrofil sayıları, serum lizozim aktiviteleri, hematokrit değerleri ile lökosit ve eritrosit miktarları incelenerek,
- b) Deneysel enfeksiyon uygulamaları ile değerlendirilmiştir.

Probiyotik bakterilerin spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine etkilerini test etmek amacıyla probiyotik bakterilerin yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen $7 \pm 0,9$ gram ağırlığındaki balıklara 60. gününde *V. anguillarum* patojen bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması yapılmıştır.

Probiyotik bakterilerin *F. psychrophilum* patojen bakterisine karşı etkinliğini araştırmak üzere 15 gün süreyle probiyotik bakterilerin yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen $2 \pm 0,5$ gram ağırlığındaki balıklara ve kontrol grubu balıklarına 15. günün sonunda deneysel enfeksiyon uygulaması yapılmıştır.

Probiyotik bakterilerin balıkların gelişimleri üzerine etkisi 60 gün boyunca her 15 günlük periyodun sonunda

- a) Balıkların boy ölçümleri yapılarak
- b) Balıkların ağırlık ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Örneklem günleri

Probiyotik uygulamasının 7., 14., 21., ve 28. günlerinde her gruptan 5'er balığa 2-Fenoksietanol ile 0,3 ml/l dozunda anestezi uygulaması yapıldıktan sonra kuyruk bölgelerinden kesilerek kan örnekleri alınmıştır (Garcia vd., 2000). Aynı gün içerisinde balıkların lökosit ve eritrosit sayımları yapılmıştır. Hematokrit seviyeleri ile lizozim aktiviteleri belirlenmiştir. Nötrofil aktivitesini tespit etmek için Nitroblue tetrazolium (NBT) testleri yapılmıştır.

Balıklarda ağırlık artışı ve büyüme miktarlarını ölçmek amacıyla 1, 15, 30, 45 ve 60. günlerde anestezi ile sakinleştirilerek ağırlık tartımı ve boy ölçümü yapılmıştır.

3.2.3. Probiyotik bakterilerin spesifik olmayan başışıklık sistemi ve kan hücreleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi

3.2.3.1. NBT-pozitif nötrofillerin sayısı

NBT-pozitif hücrelerin sayımında Anderson vd., (1992) tarafından tanımlanan metot kullanılmıştır. Buna göre, % 0,2 oranındaki Nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma, N-6876) solüsyonu, steril % 0,9'lik tuzlu su ile taze olarak hazırlanmıştır. Lamel üzerine 50 µl kan konulduktan sonra petri kutularında 25°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kırmızı kan hücrelerini uzaklaştırmak için, pH 7'ye ayarlanmış fizyolojik tuzlu su ile lamel nazik bir şekilde yıkanmıştır. Daha sonra bir damla NBT solüsyonu damlatılmış lam üzerine kırmızı kan hücrelerinden arındırılmış lamel kapatılmış ve nemli petri kutularında 25°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Pozitif koyu mavi boyanmış hücreler mikroskopta x40 büyütmede her lamelde 5 farklı alanda sayılıp, ortalamaları alınmıştır.

3.2.3.2. Eritrosit ve total lökosit sayısı

Heparinize şırınga ile alınan kan örneği Natt-Herick eriyiği ile eritrosit sulandırma pipeti aracılığıyla 100 kat sulandırılarak Thoma lamında eritrosit ve total lökosit sayımı yapılmıştır (Kocabatmaz vd., 1982; Hoffman ve Lomel, 1984).

3.2.3.3. Hematokrit değerinin saptanması

Hematokrit değer (%) mikrohematokrit yöntemiyle belirlenmiştir. Mikrohematokrit tüplerinin $\frac{3}{4}$ ü kan ile doldurulduktan sonra, tüpün kan olmayan ucu alevde yakılarak kapatılıp daha sonra Nüve marka hematokrit santrifüj cihazında (10500 devir/dakika) 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin sonrasında % hematokrit değer hematokrit ölçüm skalasında okunmuştur (Blaxhall, ve Daisley, 1973).

3.2.3.4. Serum lizozim aktivitesinin belirlenmesi

2 mg liyofilize *Micrococcus lysodeikticus* hücreleri (Sigma, M 3770, ATCC No. 4698), 10 ml 0.05 M sodyum fosfat buffer (pH 6.55) ile süspanse edilmiştir. Bu solüsyondan spektrofotometre hücrelerine 3 ml alınıp, üzerine 50 µl balık serumu eklenmiştir. Bu işlemi takiben 30 saniye ve 4,5 dakika sonra Shimadzu (UV-120-02) spektrofotometrede 540 nm’de iki ayrı ölçüm yapılmıştır. Bir unit lizozim aktivitesi, absorbansdaki 0.001/dak’lık azalma olarak tanımlanmıştır (Engstad vd., 1992).

3.2.4. Probiyotik uygulamalarının spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla yapılan deneysel enfeksiyon uygulamaları

3.2.4.1. Probiyotik bakterilerin 60 günlük uygulama sonrası spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkisini tespit etmek amacıyla *Vibrio anguillarum* test bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması

Gökkuşığı alabalıklarında probiyotik uygulamasının *V. anguillarum* patojen bakterisine karşı etkinliğini araştırmak amacıyla gökkuşığı alabalıkları 60 gün süreyle Bioplus 2B, Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu içeren yemlerle beslenmişler ve 60. günün sonunda deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur. Bunun için; *V. anguillarum* suşu stok kültürden alınarak T-TSA’ya ekimi yapılmıştır. T-TSA’da 25 °C’de 24 saat süreyle inkübe edilerek üreyen koloniler *V. anguillarum* yönünden kontrol edildikten sonra T-TSB’ye alınmıştır. T-TSB besiyerinde 25 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir (Ekici, 2010).

Bakteri kültürü, 4°C’de 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek santrifüj tüpünde toplanan bakteri hücreleri kültürdeki sıvı besiyerine eşit hacimdeki PBS (fosfat buffer saline) ile tekrar süspanse edilmiştir. Elde edilen bakteri süspansiyonundaki bakteri sayısı Seyreltme Plak Metodu ile sayılmıştır ve süspansiyondaki bakteri sayısı spektrofotometrede 600 nm’de absorbans ölçümü yapılarak standardize edilmiştir (Alavandi vd., 2004; Vijayan vd., 2006; Balcazar vd., 2007).

PBS içerisindeki bakteri süspansiyonları 1:9 oranında sulandırılarak son konsantrasyon yaklaşık 10^3 (LD 50) hücre/ml olacak şekilde, 40'ar adet gökkuşığı alabalığı yavrularına intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle verilmiştir (Austin vd., 1995). Daha sonra balıklar tanklara alınarak 15 gün süreyle takip edilmiş ve mortaliteler günlük olarak kaydedilmiştir.

3.2.4.2. 15 günlük süreyle probiyotik uygulanmış balık gruplarında *Flavobacterium psychrophilum* ile deneysel enfeksiyon çalışmaları

Gökkuşığı alabalıklarında probiyotik uygulamasının *F. psychrophilum* patojen bakterisine karşı etkinliğini araştırmak amacıyla gökkuşığı alabalıkları 15 gün süreyle Bioplus 2B, Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu içeren yemlerle beslenmişler ve 15. günün sonunda deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur. Bunun için *F. psychrophilum*'un 18°C'de Anacker-Ordal Broth'da 3 günlük kültürleri geliştirilmiştir. Bakteri kültürü, 4°C'de 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek santrifüj tüpünde tabanda çöken bakteri hücreleri süpernantanttan ayrılmıştır. Daha sonra bakteri hücreleri eşit hacimdeki PBS (fosfat buffer saline) ile tekrar süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyondaki bakteri sayısı 'Kob/ml' olarak belirlenebilmek için sayım yapılmış ve spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçümü yapılarak standardize edilmiştir (Alavandi vd., 2004; Vijayan vd., 2006; Balcazar vd., 2007).

PBS içerisindeki bakteri süspansiyonları 1:9 oranında sulandırılarak son konsantrasyon yaklaşık $0,9 \times 10^7$ hücre/ml olacak şekilde (LD 50), 30'ar adet gökkuşığı alabalığı yavrularına intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle verilmiştir (Austin vd., 1995; Garcia vd., 2000). Daha sonra balıklar tanklara aktarılmıştır. Gökkuşığı alabalığı yavruları 15 gün süreyle takip edilmiş ve mortaliteler günlük olarak kaydedilmiştir.

3.2.5. Yaşama oranı yüzdesinin hesaplanması

Probiyotik bakterilerle beslenen balıklardaki yaşama oranı yüzdeleri formül (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır (Ellis, 1988).

$$\text{RPS (Yaşama Oranı Yüzdesi)} = 1 - \left(\frac{\text{Probiyotik içeren yemlerle beslenen balıklardaki ölüm miktarı (\%)}}{\text{Kontrol grubu balıklarındaki ölüm miktarı (\%)}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.6. Spesifik büyüme oranları ve kondüsyon faktörünün belirlenmesi

60 gün süren probiyotik bakterilerle besleme çalışmasında 15'er günlük aralıklarla yapılan boy ve ağırlık ölçümleri sonucunda formül (3.2) ve formül (3.3) kullanılarak spesifik büyüme oranları ve kondüsyon faktörü hesaplanmıştır (Korkut vd., 2007).

$$\text{Spesifik Büyüme Oranı} = \text{SBO} = \frac{(\text{İlk Ağırlık} - \text{Son Ağırlık})}{\text{Süre (Gün)}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Kondüsyon Faktörü:} \quad K = \frac{(\text{Vücut ağırlığı})}{(\text{Balık Boyu})^3} \quad (3.3)$$

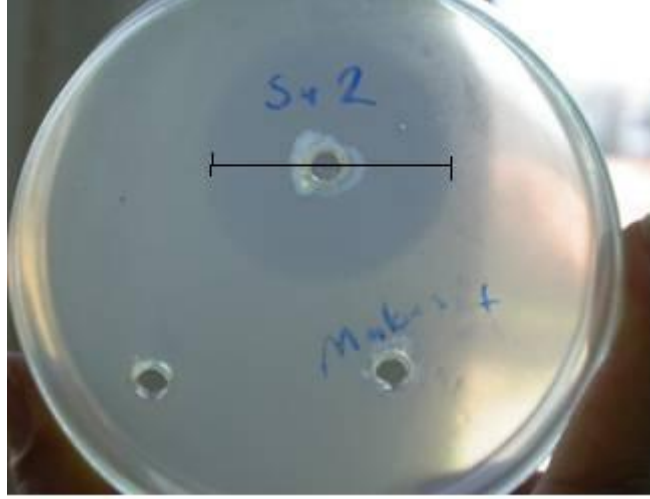
3.2.7. İstatiksel analizler

Gruplar arasındaki ayırım; gelişme ve kan parametrelerinde varyans analizi ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile, eprüvasyon uygulaması sonrası ölüm oranlarında ise ki kare testi ile belirlenmiştir (Castex vd., 2008). Bu hesaplamalar SPSS 16.00 istatistik programında yapılmıştır. Önem düzeyi olarak $p < 0.05$ seçilmiştir (Özdamar, 2001).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Pseudomonas sp.* GS (Potansiyel Probiyotik Olarak İdentife Edilmiş Bakteri Suşu)'nun *in vitro* Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi İle ilgili Bulgular

Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen ve gökkuşağı alabalığının yaşadığı sudan izole edilmiş olan potansiyel probiyotik bakteri suşu *Pseudomonas sp.* GS'nin, patojen bakteri *F. psychrophilum*'a karşı *in vitro* güçlü antagonistik etki (30 mm inhibisyon zonu) gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Potansiyel probiyotik bakteri *Pseudomonas sp.* GS' nin *Flavobacterium psychrophilum*'a karşı Anacker-Ordal Agarda oluşturduğu inhibisyon zonu

4.2. *Flavobacterium psychrophilum*'a Karşı *in vitro* Antagonistik Etkileri Belirlenen Potansiyel Probiyotik Bakterinin Fenotipik ve Biyokimyasal Karakteristikleri

Probiyotik bakterinin Gram (-) çubuk, Sitokram oksidaz, katalaz ve hareket yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. API 20 NE testi sonucuna ve Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology' ye göre bakterinin *Pseudomonas sp.* olduğu belirlenmiş ve *Pseudomonas sp.* GS olarak adlandırılmıştır (Holt vd., 1994; Austin ve Austin, 1999). (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Potansiyel probiyotik bakterinin fenotipik özellikleri

Gram boyama	-
Hareketlilik	+
Oksidaz	+
Katalaz	+
O/F	Oksidatif
NO ₃	+
İndol	-
Glukoz fermantasyonu	-
ONPG	-
Arginin dehidrolizi	+
Nişasta hidrolzi	+
Ornitin dekarboksilaz	-
Lizin dekarboksilaz	-
Sitrat	+
H ₂ S	-
Jelatin	+
Üreaz	-
β- Galaktosidaz	-
Glikoz	+
Arabinoz	+
Maltoz	-
Mannitol	+
Mannoz	-
N- asetil glikozamin	+
Potasyum glikonat	+
Kaprik asit	+
Adipik asit	-
Malat	+
Trisoyum sitrat	+
Fenil asetik asit	-
VP	-
MacConkey's agarda üreme	+
TSA'da üreme	+
4° C' de üreme	+
41° C' de üreme	-

4.3. Probiyotik Uygulamasının Gökkuşığı Alabalıklarının Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemine ve Kan Hücrelerine Etkileri ile İlgili Bulgular

60 gün süreyle probiyotik bakterilerin yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen balıkların kan örneklerine uygulanan testler sonucunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

4.3.1. NBT testi bulguları

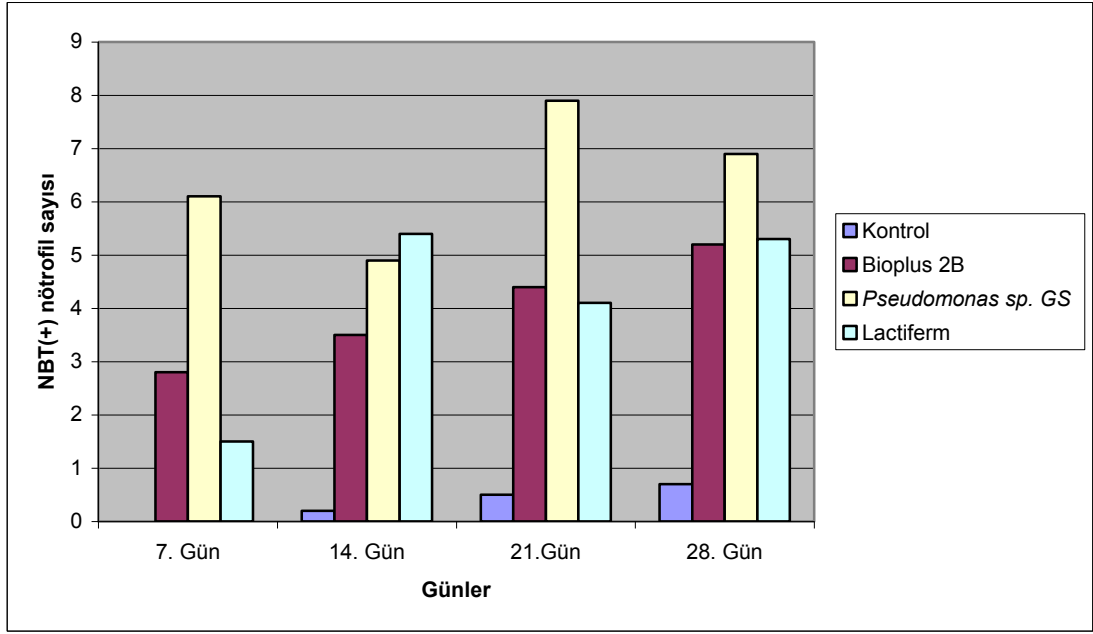
NBT testi sonuçlarına göre 7., 14., 21., ve 28. günlerde yapılan örnekleme çalışmalarında yeme probiyotik ilavesi yapılan tüm gruplarda çizelge 4.2. ve şekil 4.2.'de görüldüğü üzere, NBT (+) nötrofil sayılarında kontrol grubuna göre artış görülmüştür ($p < 0,05$).

En yüksek NBT (+) nötrofil sayısı 28. günde *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen gökkuşığı alabalıklarında tespit edilmiştir.

7. ve 21. günlerde yapılan örnekleme çalışmalarında da en yüksek NBT (+) nötrofil sayısı yine *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu ile beslenen gruplarda meydana gelmiştir.

Çizelge 4.2. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında NBT (+) nötrofil sayıları

Gruplar	Günler			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	0 ± 0^c	$0,2 \pm 0,4^b$	$0,5 \pm 0,6^c$	$0,7 \pm 0,6^c$
Bioplus 2B	$2,8 \pm 2,1^b$	$3,5 \pm 2,0^{ab}$	$4,4 \pm 2,8^b$	$5,2 \pm 0,7^b$
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	$6,1 \pm 3,3^a$	$4,9 \pm 3,2^a$	$7,9 \pm 1,3^a$	$6,9 \pm 1,8^a$
Lactiferm	$1,5 \pm 0,8^{bc}$	$5,4 \pm 4,3^a$	$4,1 \pm 1,0^b$	$5,3 \pm 1,4^b$



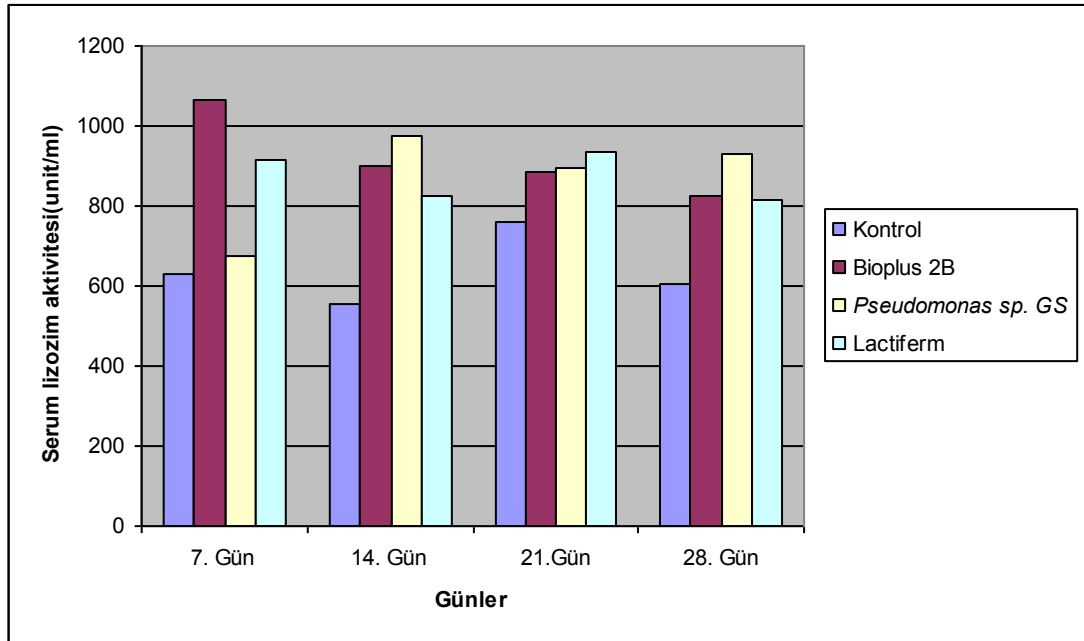
Şekil 4.2. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında NBT (+) nötrofil sayıları

4.3.2. Serum lizozim enzimi bulguları

Serum lizozim aktivitesinin tespitiyle ilgili yapılan çalışmalarda 7. günde balıklardan alınan kan örneklerinde Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balık gruplarında lizozim aktivitesi kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). 14. günde yapılan örnekleme çalışmasında ise Bioplus 2B ticari probiyotiğini ve *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen gruplarda lizozim enzimi aktivitesinde artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). 21. ve 28. gün yapılan çalışmalarda ise gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.). En yüksek serum lizozim aktivitesi, 7. günde yapılan örnekleme çalışmasında Bioplus2B adlı ticari probiyotiğin yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen gökkuşağı alabalıklarında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında serum lizozim aktiviteleri (unit/ml)

Gruplar	Günler			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	632 ± 70 ^c	556 ± 186 ^b	759 ± 4 ^a	606 ± 56 ^a
Bioplus 2B	1063 ± 140 ^a	898 ± 121 ^a	886 ± 12 ^a	827 ± 19 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	676 ± 84 ^{bc}	973 ± 63 ^a	896 ± 56 ^a	929 ± 80 ^a
Lactiferm	917 ± 77 ^{ab}	825 ± 131 ^{ab}	933 ± 97 ^a	817 ± 205 ^a



Şekil 4.3. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında serum lizozim aktiviteleri (Unit/ml)

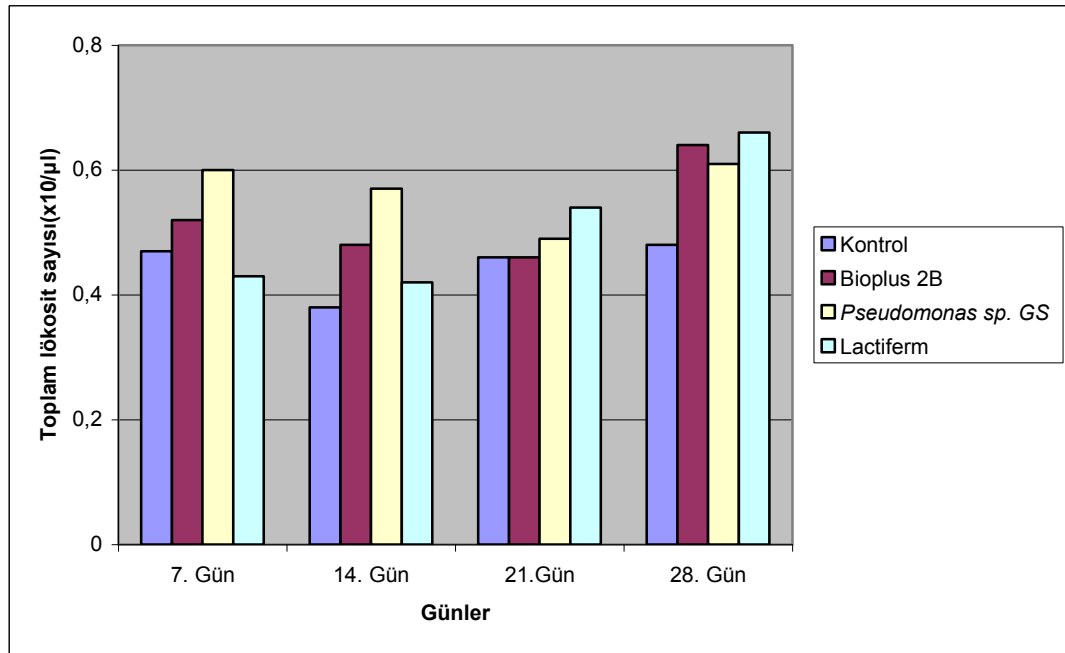
4.3.3. Lökosit sayım bulguları

14. günde yapılan sayımlarda Bioplus 2B ticari probiyotiğini ve *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotiğini içeren yemlerle beslenen balıklarda, 28. gün Bioplus 2B ve Lactiferm probiyotiklerini içeren yemlerle beslenen balıklarda toplam lökosit miktarlarında kontrol grubuna oranla artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). 7. günde yapılan

lökosit sayımlarında ise gruplar arasında bir fark gözlenememiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.4. ve Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında toplam lökosit sayıları ($\times 10^5/\mu\text{l}$)

Gruplar	Günler			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	$0,47 \pm 0,04^a$	$0,38 \pm 0,04^c$	$0,46 \pm 0,11^a$	$0,48 \pm 0,11^b$
Bioplus 2B	$0,52 \pm 0,13^a$	$0,48 \pm 0,09^{ab}$	$0,46 \pm 0,06^a$	$0,64 \pm 0,09^a$
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	$0,60 \pm 0,22^a$	$0,57 \pm 0,11^a$	$0,49 \pm 0,09^a$	$0,61 \pm 0,08^{ab}$
Lactiferm	$0,43 \pm 0,17^a$	$0,42 \pm 0,05^{bc}$	$0,54 \pm 0,08^a$	$0,66 \pm 0,11^a$



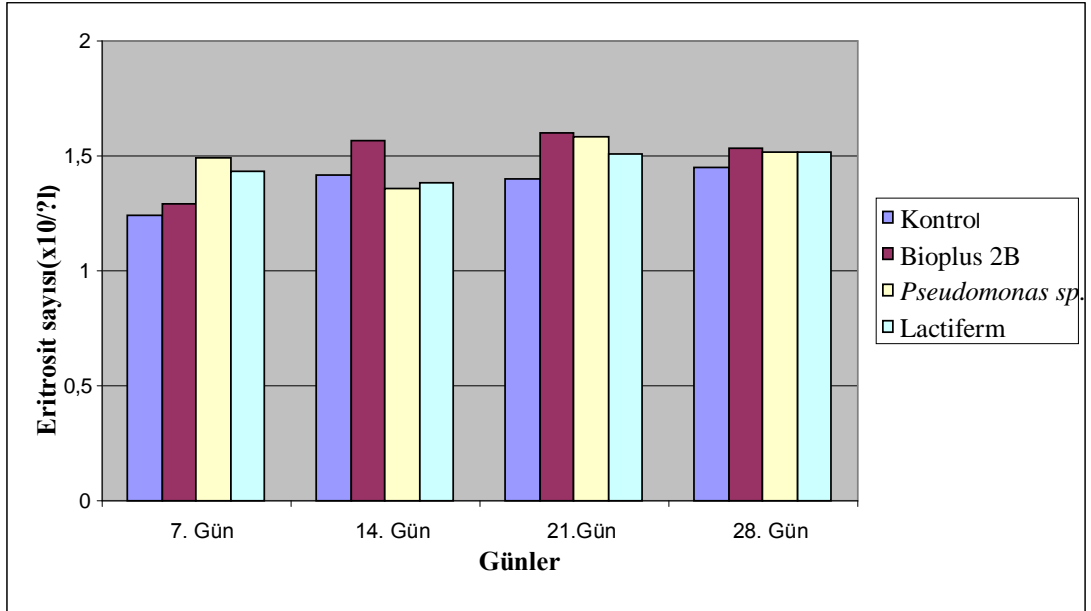
Şekil 4.4. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında toplam lökosit sayıları ($\times 10^5/\mu\text{l}$)

4.3.4. Eritrosit sayım bulguları

Uygulama sonrasında 7., 14., 21. ve 28. günde alınan kan örneklerinde eritrosit değerleri açısından çizelge 4.5. ve şekil 4.5.'te görüldüğü üzere istatistiksel olarak herhangi bir farklılık oluşmamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 4.5. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında eritrosit değerleri ($\times 10^6/\mu\text{l}$)

Gruplar	Günler			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	$1,24 \pm 0,08^b$	$1,42 \pm 0,09^a$	$1,40 \pm 0,14^a$	$1,45 \pm 0,05^a$
Bioplus 2B	$1,29 \pm 0,16^{ab}$	$1,57 \pm 0,10^a$	$1,60 \pm 0,13^a$	$1,53 \pm 0,11^a$
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	$1,49 \pm 0,18^a$	$1,36 \pm 0,32^a$	$1,58 \pm 0,21^a$	$1,52 \pm 0,14^a$
Lactiferm	$1,43 \pm 0,24^{ab}$	$1,38 \pm 0,20^a$	$1,51 \pm 0,12^a$	$1,52 \pm 0,09^a$



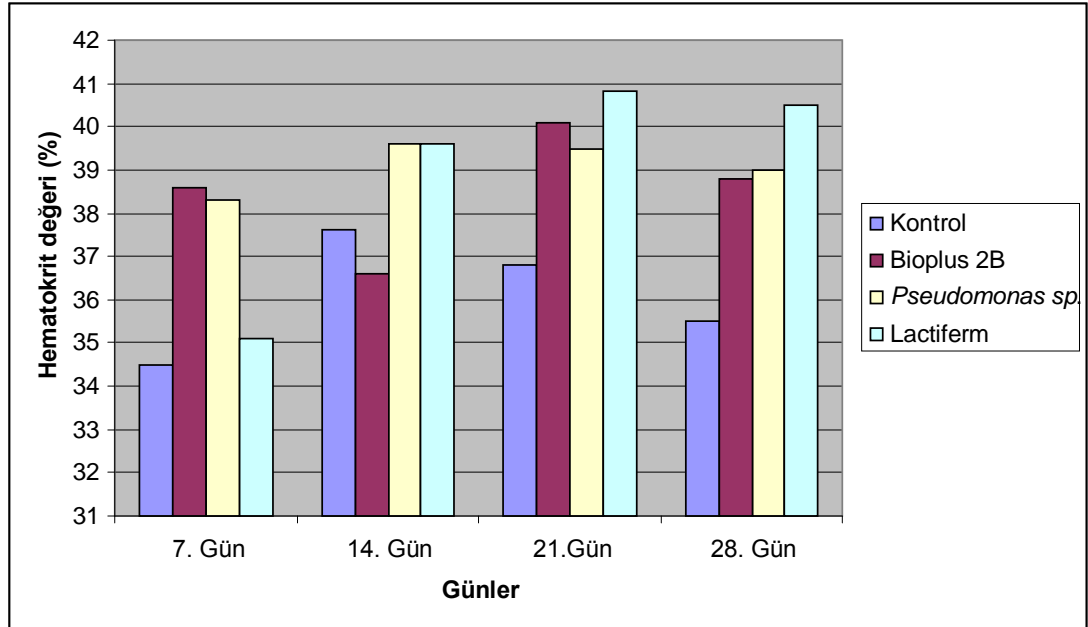
Şekil 4.5. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında eritrosit değerleri ($\times 10^6/\mu\text{l}$)

Hematokrit değer bulguları

Probiyotik uygulamasının 7., 14., 21. ve 28. günlerinde yapılan örnekleme çalışmalarında kontrol grubu ve probiyotik içeren yemlerle beslenen gruplar arasında hematokrit değerleri açısından istatistiksel olarak bir fark gözlenememiştir ($p > 0,05$). (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.).

Çizelge 4.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında hematokrit değerleri (%)

Gruplar	Günler			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	34,5 ± 4,8 ^a	37,6 ± 4,8 ^a	36,8 ± 4,2 ^a	35,5 ± 4,3 ^a
Bioplus 2B	38,6 ± 4,4 ^a	36,6 ± 7,7 ^a	40,1 ± 5,8 ^a	38,8 ± 4,2 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	38,3 ± 5,3 ^a	39,6 ± 5,5 ^a	39,50 ± 3,5 ^a	39,0 ± 4,4 ^a
Lactiferm	35,1 ± 5,9 ^a	39,6 ± 4,3 ^a	40,83 ± 3,7 ^a	40,5 ± 3,01 ^a



Şekil 4.6. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında hematokrit değerleri (%)

4.4. *Vibrio anguillarum* (Probiyotik bakterilerin spesifik olmayan bağıklık sistemi üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla kullanılan test bakterisi) ile deneysel enfeksiyon uygulaması bulguları

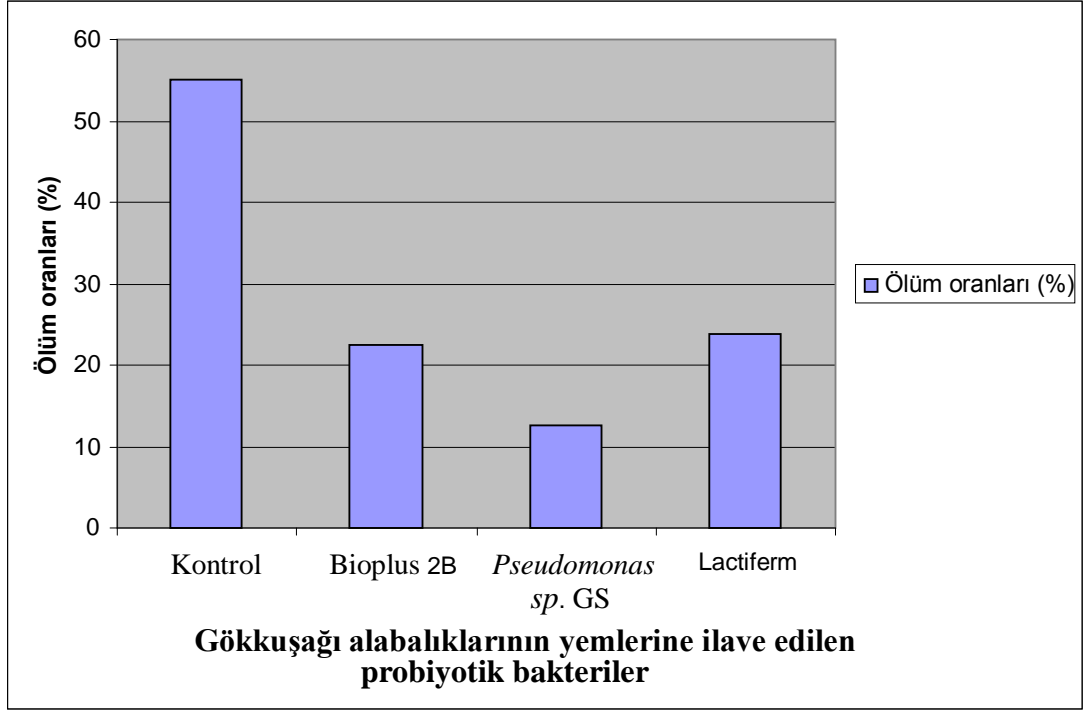
Ortalama ağırlıkları $7 \pm 0,9$ gram olan, probiyotik bakterilerle beslenen balıklara kontrol grubu balıklarına, deneme çalışmasının 60. günde 10^3 hücre/ml dozunda (LD 50) *Vibrio anguillarum* test bakterisi ile epruvasyon uygulaması yapıldığında probiyotik uygulaması yapılan tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha az ölüm oranları tespit edilmiştir (Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7.). En az ölüm oranı ise *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun kullanıldığı grupta gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.7. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda *Vibrio anguillarum* ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%)

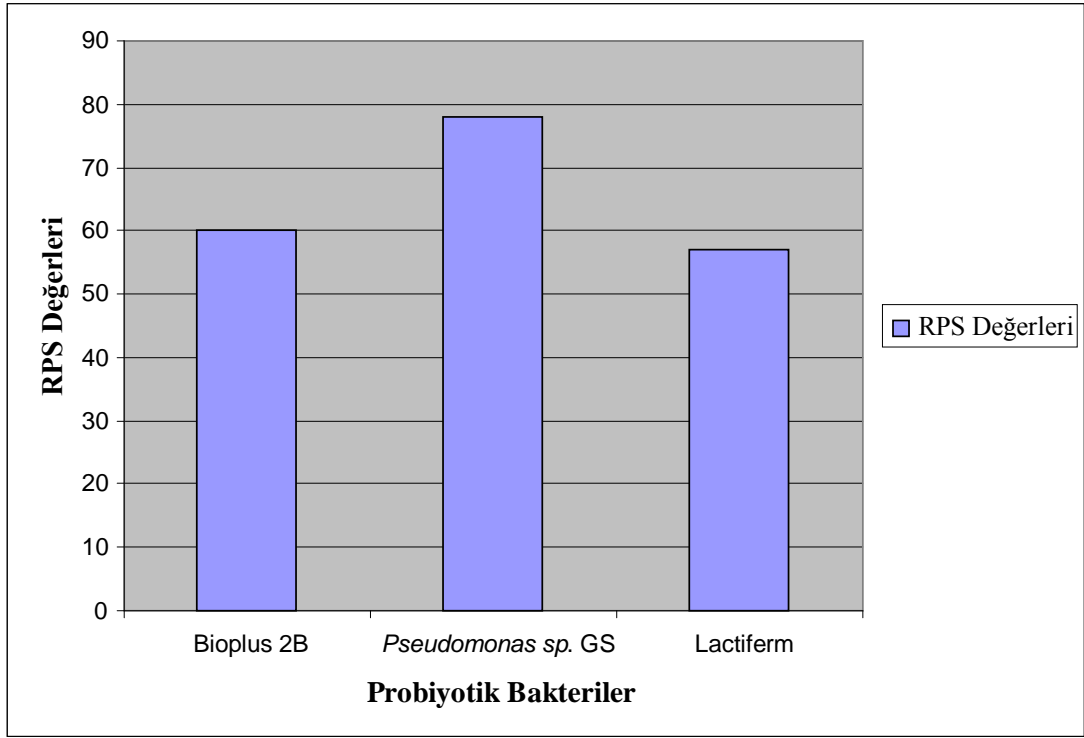
	Gruplar			
	Kontrol	Bioplus 2B	<i>Pseudomonas sp. GS</i>	Lactiferm
Toplam Balık Sayısı	80	80	80	80
Ölen Balık Sayısı	44	19	10	18
Mortalite (%)	55	23,75	12,5	22,5

Vibrio anguillarum patojen bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması sonrasında balıklardaki RPS (Yaşama oranı yüzdesi) değerleri ise Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotiğini ve *Pseudomonas sp.* GS potansiyel bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda sırasıyla %60, %57 ve %78 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).

Pseudomonas sp. GS, gökkuşuğı alabalıklarını *Vibrio anguillarum* patojen bakterisine karşı Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotiklerine göre daha etkin bir koruma sağlamıştır.



Şekil 4.7. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda *Vibrio anguillarum* ile eprüvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları



Şekil 4.8. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 10^3 hücre/ml dozunda *Vibrio anguillarum* ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen yaşama oranı yüzdeleri

4.5. *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin fenotipik özellikleriyle ilgili bulgular

Deneysel enfeksiyon sırasında kullanılan *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin teşhisi gram boyama, sitokrom oksidaz, katalaz, nişasta, kazein ve fleksirubin pigment ile doğrulanmış ve çizelge 4.8.'de yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin fenotipik özellikleri

Gram boyama	-
Sitokrom oksidaz	-
Katalaz	+
Kayma hareketi	+
Fleksirubin	+
Kazein	+
Nişasta	-
β -Galaktozidaz	-
Arjinin dehidrolaz	-
Lizin dekarboksilaz	-
Ornitin dekarboksilaz	-
Sitrat	-
H ₂ S indirgeme	-
Üreaz	-
Triptofan deaminaz	-
İndol	-
VP	-
Jelatin deaminaz	+
Glukoz	-
Mannitol	-
İnositol	-
Sorbitol	-
Ramnoz	-
Sükroz	-
Melibioz	-
Amigdalın	-
Arabinoz	-

4.6. *Flavobacterium psychrophilum* bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması bulguları

15 gün süreyle Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen, ortalama ağırlıkları $2 \pm 0,5$ gram olan balıklardan oluşan gruplara ve kontrol grubuna $0,9 \times 10^7$ hücre/ml dozunda (LD 50) *Flavobacterium psychrophilum* patojen bakterisi

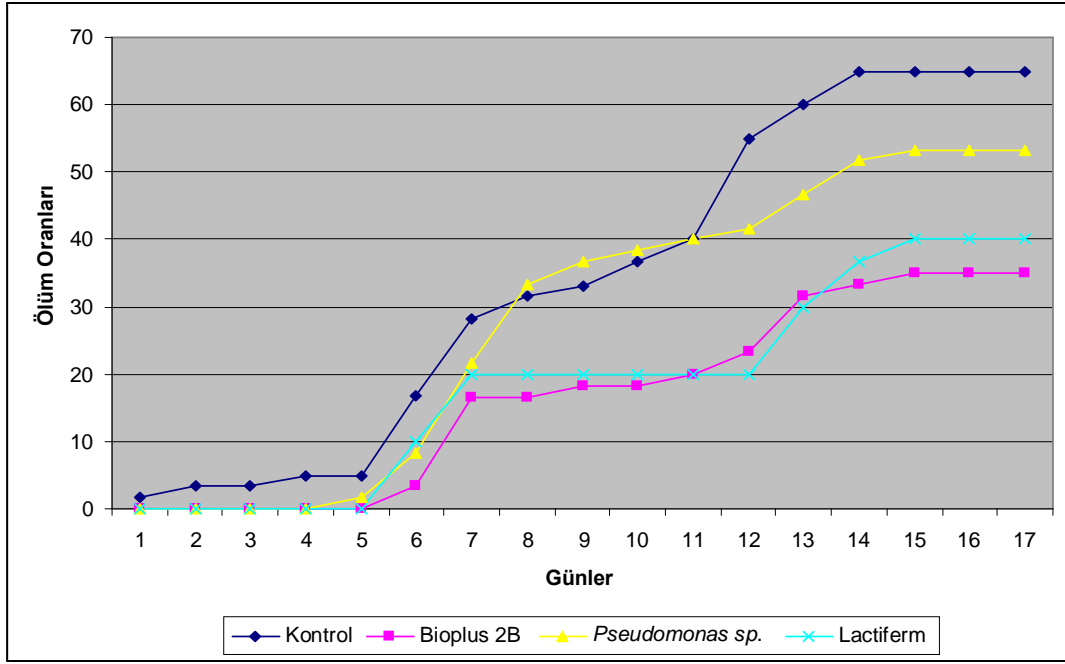
ile epruvasyon testi uygulandığında gruplardaki ortalama ölüm oranları çizelge 4.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında $5,4 \times 10^7$ hücre/ml dozunda *Flavobacterium psychrophilum* ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%)

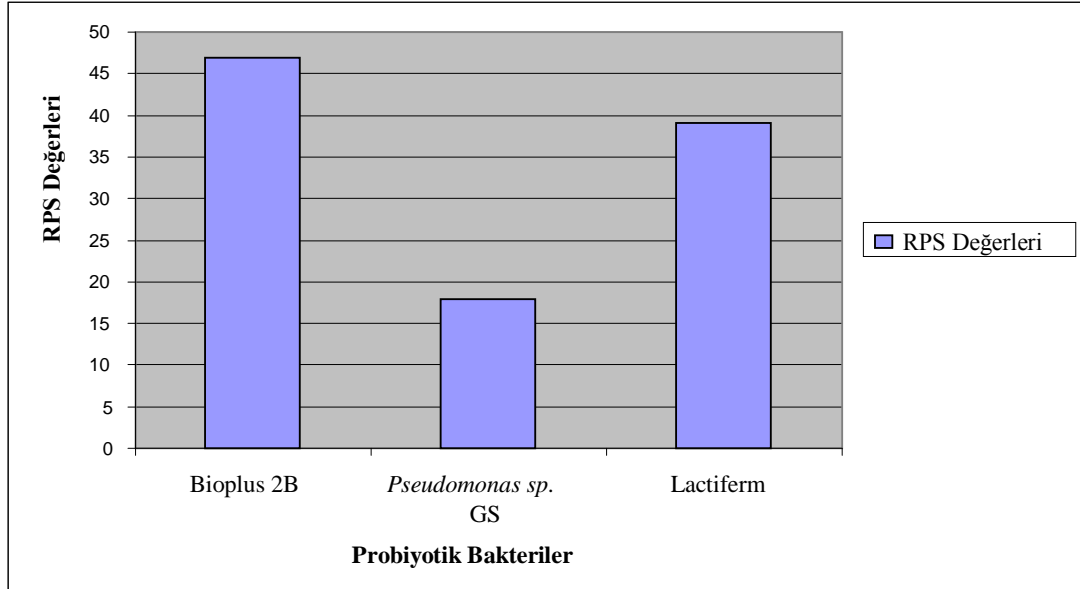
	Gruplar			
	Kontrol	Bioplus2B	<i>Pseudomonas sp. GS</i>	Lactiferm
Toplam Balık Sayısı	60	60	60	60
Ölen Balık Sayısı	39	21	32	24
Mortalite (%)	65	35	53,3	40

Probiyotik uygulaması yapılan tüm gruplarda epruvasyon testi sonrası ölüm oranları kontrol grubuna göre daha az oranda gerçekleşmiştir. ($p < 0,05$). Bioplus 2B ve Lactiferm adlı ticari probiyotikler, gökkuşuğı alabalığının yaşadığı sudan izole edilen *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşuna göre soğuksu hastalığının kontrolünde daha etkin koruma sağlamışlardır (Şekil 4.9.).

F. psychrophilum patojen bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulaması sonrasında balıklardaki RPS (Yaşama Oranı Yüzdesi) değerleri ise Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotiğini ve *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda sırasıyla %47, %39, ve %18 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında $0,9 \times 10^7$ hücre/ml dozunda *F. psychrophilum* ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında görülen ölüm oranları (%)



Şekil 4.10. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakterisini içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında $0,9 \times 10^7$ hücre/ml dozunda *F. psychrophilum* ile epruvasyon testi uygulaması sonrasında balıklarda görülen yaşama oranı yüzdeleri

4.7. Probiyotik Uygulamasının Gökkuşığı Alabalıklarının Büyüme Parametreleri Üzerine Olan Etkileri ile İlgili Bulgular

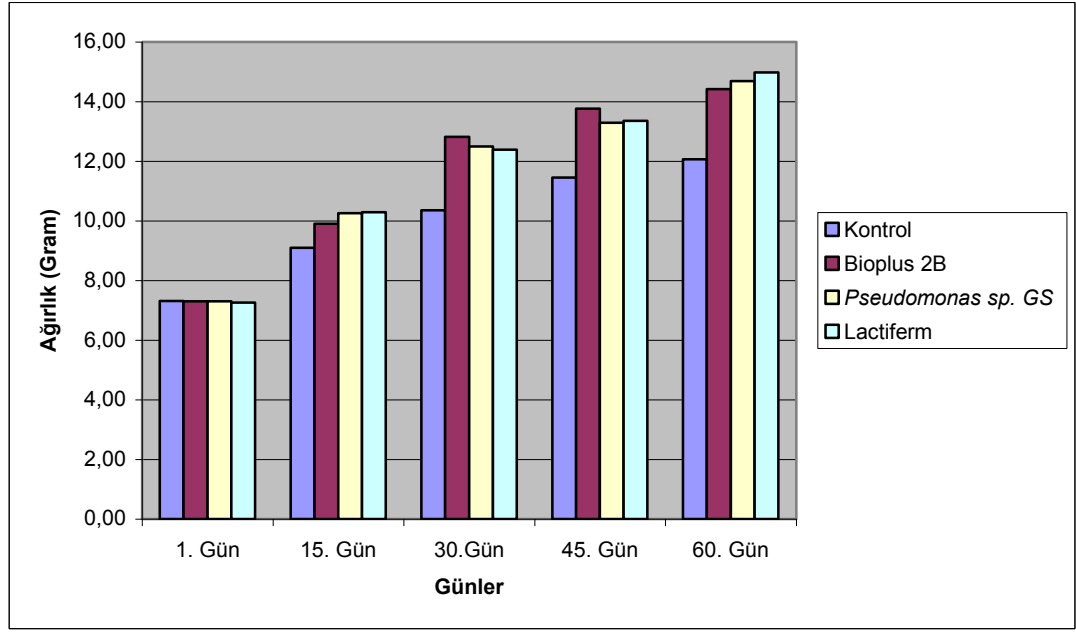
4.7.1. Ağırlık ölçümleriyle ilgili bulgular

60 gün süren deneme çalışması süresince 15'er günlük periyotların sonucunda yapılan ağırlık ölçümlerinde çizelge 4.10. ve şekil 4.11.' de yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan ağırlık ölçüm sonuçları (g)

Gruplar	Günler				
	1. Gün	15. Gün	30.Gün	45. Gün	60. Gün
Kontrol	7,31 ± 1,12 ^a	9,10 ± 1,40 ^b	10,35 ± 1,42 ^b	11,45 ± 1,52 ^b	12,06±1,32 ^b
Bioplus 2B	7,30 ± 1,02 ^a	9,90 ± 1,22 ^a	12,82 ± 2,10 ^a	13,76 ± 1,76 ^a	14,42 ±1,42 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	7,30 ± 0,95 ^a	10,26± 1,33 ^a	12,50 ± 1,22 ^a	13,29 ± 1,53 ^a	14,69 ±1,70 ^a
Lactiferm	7,26 ± 1,01 ^a	10,29± 1,41 ^a	12,39 ± 1,49 ^a	13,36 ± 1,53 ^a	14,98 ±1,23 ^a

Yapılan ağırlık ölçümü sonuçlarında 15. günden itibaren probiyotik uygulaması yapılan tüm gruplarda, kontrol grubuna göre ağırlık daha fazla olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$). Ağırlık artışına çalışmada kullanılan Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşu istatistiksel sonuçlara göre aynı oranda etki etmiştir.



Şekil 4.11. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan ağırlık ölçüm sonuçları (g)

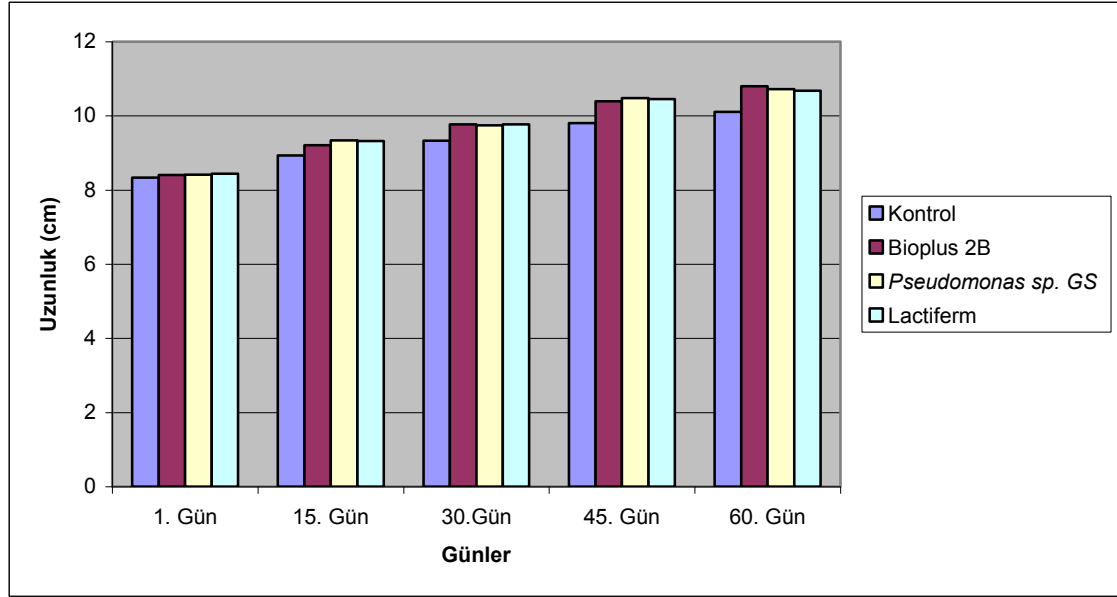
4.7.2. Uzunluk ölçümleriyle ilgili bulgular

60 gün süren deneme çalışması süresince 15'er günlük periyotların sonucunda yapılan uzunluk ölçümlerinde çizelge 4.11. ve şekil 4.12.'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.11. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan uzunluk ölçüm sonuçları (cm)

Gruplar	Günler				
	1. Gün	15. Gün	30. Gün	45. Gün	60. Gün
Kontrol	8,33±0,67 ^a	8,93± 0,87 ^b	9,33 ± 0,81 ^b	9,80 ± 1,02 ^b	10,11± 0,92 ^b
Bioplus 2B	8,40±0,71 ^a	9,21± 0,79 ^a	9,77 ±1,04 ^a	10,39± 0,77 ^a	10,80± 1,21 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	8,41±0,71 ^a	9,34± 0,82 ^a	9,74 ± 0,99 ^a	10,48± 1,15 ^a	10,72± 1,31 ^a
Lactiferm	8,44±0,69 ^a	9,32± 0,86 ^a	9,77 ± 1,09 ^a	10,45± 1,08 ^a	10,68± 1,24 ^a

Yapılan uzunluk ölçümü sonuçlarında 15. günden itibaren probiyotik uygulaması yapılan tüm gruplarda, kontrol grubuna göre uzunluk daha fazla olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$). Uzunluk artışına çalışmada kullanılan Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşu istatistiksel sonuçlara göre aynı oranda etki etmiştir.



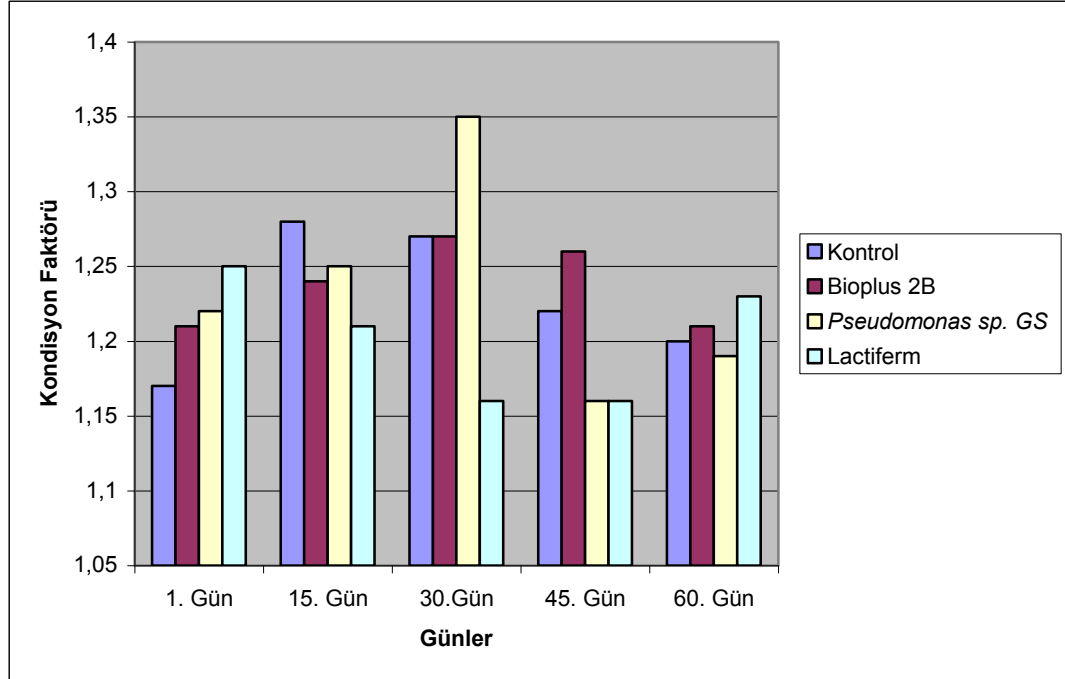
Şekil 4.12. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında 15 günlük periyotlarla yapılan uzunluk ölçüm sonuçları (cm)

4.7.3. Kondüsyon faktörü bulguları

Deneme çalışması süresince Bioplus 2B, Lactiferm ticari probiyotik bakterileri ve *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşu ile beslenen gökkuşuğu alabalıklarının 15'er günlük periyotların sonunda yapıla kondüsyon faktörü hesaplamalarında kontrol grubu balıkları ile probiyotik içeren yemlerle beslenen gruplarda çizelge 4.12. ve şekil 4.13.'te görüldüğü üzere istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 4.12. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında kondüsyon faktörü bulguları (g/cm³)

Gruplar	Günler				
	1. Gün	15. Gün	30.Gün	45. Gün	60. Gün
Kontrol	1,17 ± 0,2 ^a	1,28± 0,01 ^a	1,27 ± 0,00 ^a	1,22±0,04 ^a	1,20±0,00 ^a
Bioplus 2B	1,21± 0,02 ^a	1,24± 0,06 ^a	1,27 ± 0,02 ^a	1,26±0,06 ^a	1,21±0,03 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	1,22 ± 0,3 ^a	1,25±0,02 ^{ab}	1,35 ± 0,04 ^a	1,16±0,07 ^a	1,19±0,02 ^a
Lactiferm	1,25 ± 0,4 ^a	1,21± 0,02 ^a	1,16 ± 0,23 ^a	1,16±0,07 ^a	1,23±0,07 ^a



Şekil 4.13. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında kondüsyon faktörü bulguları (g/cm³)

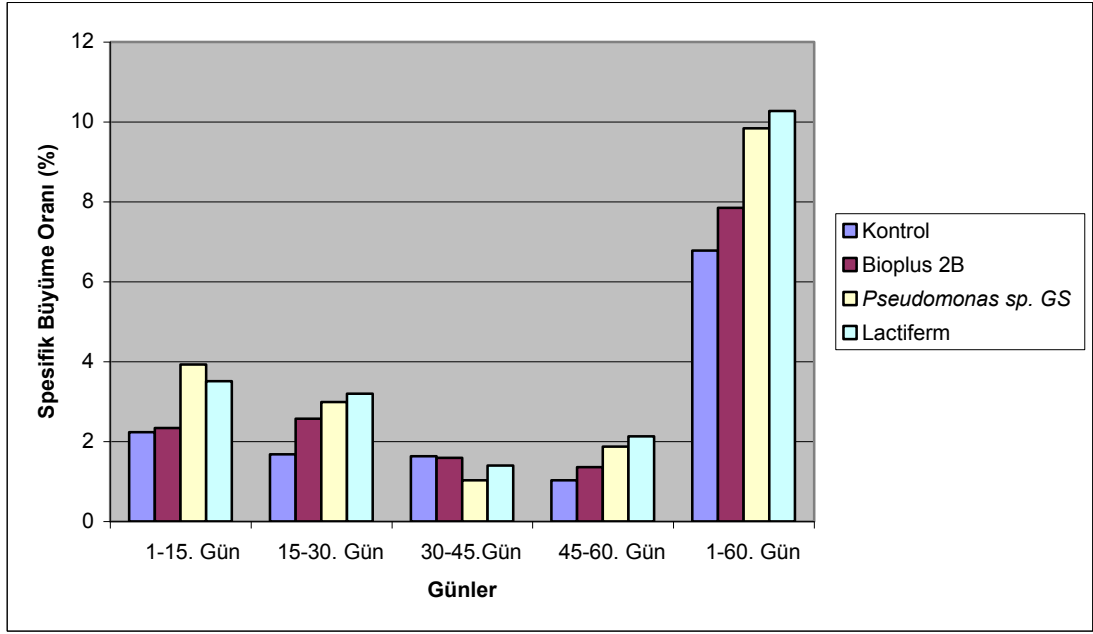
4.7.4. Spesifik büyüme oranları bulguları

Balıkların spesifik büyüme oranları hesaplandığında çizelge 4.13. ve şekil 4.14. 'teki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.13. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında spesifik büyüme oranları (%)

Gruplar	Günler				
	1-15. Gün	15-30. Gün	30-45. Gün	45-60. Gün	1-60. Gün
Kontrol	2,23 ± 0,3 ^a	1,68 ± 0,2 ^a	1,63 ± 0,44 ^a	1,03± 0,23 ^a	6,78 ± 0,05 ^b
Bioplus 2B	2,34 ± 0,2 ^a	2,57 ± 0,3 ^a	1,59 ± 0,47 ^a	1,36± 0,71 ^a	7,85 ± 2,3 ^a
<i>Pseudomonas sp. GS</i>	3,93 ± 0,2 ^a	2,99± 0,1 ^a	1,03 ± 0,25 ^a	1,87± 0,05 ^a	9,84 ± 0,26 ^a
Lactiferm	3,51±0,03 ^a	3,20 ± 0,02 ^a	1,40 ± 0,09 ^a	2,13± 0,10 ^a	10,27 ± 0,04 ^a

60 gün süren deneme çalışması süresince birbirini takip eden her 15 günlük periyottaki spesifik büyüme oranları hesaplandığında Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakterisini içeren yemlerle beslenen balıklarla kontrol grubu balıkları arasında istatistiksel bir fark gözlenemezken ($p > 0,05$), 1-60. günler arasındaki spesifik büyüme oranı hesaplandığında probiyotik bakterilerle beslenen tüm gruplarda spesifik büyüme oranı kontrol grubuna göre daha fazla olarak bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.14. Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşunu içeren yemlerle beslenen balıklarda ve kontrol grubu balıklarında spesifik büyüme oranları (%)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıkların tedavilerinde antibiyotik ve diğer çeşitli kimyasalların bazı dezavantajlara sahip olmaları nedeniyle 1990'lı yılların sonlarından itibaren hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde, medikal bitkilerin ve probiyotiklerin kullanımı gibi biyolojik mücadele yöntemleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik bakteriler, balıkların bağışıklık sistemini güçlendirmek, büyüme ve gelişmelerini hızlandırmak ve hastalıklara karşı korumak amaçlarıyla kullanılmaktadırlar (Bagheri, 2007; Kim ve Austin, 2006; Panigrahi vd., 2004; Aly vd., 2008; Gatesoupe, 1997).

Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bazı kriterlere sahip olmaları gerekmektedir. Probiyotik bakteriler uygulama yapılan canlıda patojen etki göstermemelidir ve bu amaçla bazı ön testler yapılmalıdır. Asitlere karşı dirençli olma, bağırsak yüzeyine tutunabilme, antimikrobiyal özelliğe sahip olma, canlı hücrelerden oluşma ve antibiyotiklere karşı dirençli olmama, probiyotik bakterilerde aranan diğer özelliklerdir (Oyetayo ve Oyetayo, 2005; Yağcı, 2007).

Bu tez çalışmasında; Bioplus 2B, ve Lactiferm adlı ticari probiyotikler ile gökkuşaağı alabalığının yaşadığı sudan izole edilen *Pseudomonas sp.* GS adlı bakteri gökkuşaağı alabalıklarının yemlerine ilave edilmek suretiyle kullanılmış, gökkuşaağı alabalıklarının büyümesine ve bağışıklık sistemi parametreleri üzerine olan etkileri ile yavru balıklarda soğuk su hastalığına neden olan *F. psychrophilum* patojen bakterisine karşı göstermiş oldukları koruma potansiyeli araştırılmıştır.

NBT testi bulguları incelendiğinde 7., 14., 21. ve 28. günde yapılan örnekleme çalışmalarının sonucunda yeme Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.*GS potansiyel probiyotik bakteri süşunun ilave edildiği tüm gruplarda 4 hafta boyunca NBT (+) nötrofil sayılarında artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Bu araştırmada incelenen ve bağışıklık sisteminin korunmasında çok önemli role sahip olan nötrofil aktivitesinin balıklardan alınan kan örneklerinde tüm haftalarda kontrol grubuna göre oldukça yüksek olarak bulunması probiyotiklerin bağışıklık sistemine olan etkilerini göstermektedir.

Gökkuşağı alabalıklarında *Lactobacillus rhamnosus* adlı probiyotik bakterinin bağışıklık sistemi üzerine olan etkileri araştırıldığında probiyotik uygulanan gruplarda NBT aktivitesi yüksek bulunmuştur (Panigrahi vd., 2004).

Aly vd., (2008) Nil tilapialarında *Bacillus pumilus* adlı bakteriyi ve ticari bir probiyotik olan Biobuds'u bir ve iki aylık dönemler boyunca uyguladıklarında balıklardan alınan kan örneklerinde probiyotik kullanılan gruplarda NBT ve serum lizozim aktivitesinde artış meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Spesifik olmayan bağışıklık sisteminin en önemli savunma mekanizmalarından biri olan lökosit değerleri incelendiğinde 7. günde gruplar arasında herhangi bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). 14. günde ise Bioplus 2B ve *Pseudomonas sp.* GS ile beslenen gruplarda lökosit değerleri artmış olarak gözlenirken Lactifermle beslenen gruplarda bir fark oluşmamıştır ($p > 0,05$). 28. günde yapılan örnekleme çalışmalarında ise probiyotiklerle beslenen tüm gruplarda lökosit değerlerinde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Bioplus 2B'nin gökkuşağı alabalığının spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, bu ticari probiyotiğin hematokrit ve lenfosit değerleri üzerine bir etkisinin olmadığı ancak antikör seviyesini yükselttiği belirtilmiştir (Raida vd., 2003).

Serum lizozim aktivitesinde 7. ve 14. günlerde yapılan örnekleme çalışmalarında probiyotik bakterilerle beslenen gruplarda artış gözlenirken ($p < 0,05$), 21. ve 28. günlerde yapılan çalışmalarda probiyotiklerle beslenen gruplarla kontrol grubu arasında bir fark gözlenememiştir ($p > 0,05$).

Bacillus subtilis, *B. licheniformis* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin gökkuşağı alabalıklarına uygulandığı bir başka çalışmada serum lizozim aktivitesi probiyotik

uygulanan tüm gruplarda artarken lökosit değerleri sadece *Bacillus* cinsi probiyotiklerin uygulandığı gruplarda artmıştır (Merrifield vd., 2010).

B. subtilis bakterisinin gökkuşığı alabalıklarında kullanıldığı bir diğer çalışmada da lizozim aktivitesinde artış gözlenmiştir (Fyzul vd., 2007).

Sharifuzzaman ve Austin (2009), gökkuşığı alabalıklarını *Kojura* SM1 probiyotik bakterisini 2 hafta süreyle yeme ilave etmek suretiyle beslediklerinde serum lizozim aktivitesinde artış kaydetmişlerdir.

Nil Tilapialarında (*Oreochromis niloticus*) yapılan bir diğer araştırmada, *Enterococcus faecium* probiyotik bakterisi lizozim aktivitesine artışa neden olmuştur (Wang vd., 2008).

Probiyotik bakterilerle beslenen gökkuşığı alabalıklarından deneme çalışmasınının 7., 14., 21. ve 28. günlerinde alınan kan örneklerinde hematokrit ve eritrosit değerlerinde probiyotik uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna göre bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun ilave edildiği yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarına *F. psychrophilum* patojen bakterisi ile deneysel enfeksiyon uygulandığında, çalışmada kullanılan probiyotik bakterilerin gökkuşığı alabalıklarında *F. psychrophilum*'a karşı koruma sağladığı gözlenmiştir. En düşük ölüm oranları Bioplus 2B ve Lactiferm ile beslenen gruplarda oluşmuştur.

Diler vd. 2007, *P. fluorescens* potansiyel probiyotik bakterisinin *F. psychrophilum* patojen bakterisine karşı *in vitro* antagonistik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak ilk defa bu çalışmada *Pseudomonas* genusuna ait olan *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun *in vivo* etkileri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, *Pseudomonas sp.* GS'nin etkinliğini test etmek amacıyla *in vitro* olarak *Vibrio anguillarum* bakterisine karşı antagonistik etkisi araştırıldığında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Ancak yapılan *in vivo* (Deneysel enfeksiyon)

çalışmalarda *Pseudomonas sp. GS'nin Vibrio anguillarum* bakterisine karşı oldukça yüksek koruma potansiyeli oluşturduğu tespit edilmiştir.

Bazı durumlarda laboratuvar çalışmalarında patojen bir bakteriye karşı antagonistik etki göstermeyen bir bakteri canlı üzerinde uygulandığında o bakteriye karşı etki gösterebilir. Bazı durumlarda ise laboratuvar şartlarında patojen bakteriye karşı antagonistik etki gösteren bir bakteri *in vivo* uygulamalarda aynı etkiyi göstermeyebilmektedir.

Raida vd (2003), Bioplus 2B adlı ticari probiyotiğin *Y. ruckeri* patojen bakterisine karşı etkilerini araştırdıklarında, bu ticari probiyotiğin *in vitro* olarak *Yersinia ruckeri* bakterisine karşı her hangi bir etki göstermediğini ancak, yapılan *in vivo* alışmalarda Bioplus 2B adlı ticari probiyotiğin gökkuşağı alabalıklarında *Y. ruckeri* patojen bakterisine karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Robertson vd. (2000), *V. anguillarum* patojen bakterisine karşı *in vitro* antagonistik etki gösteren bir *Carnobacterium* suşunu yeme ilave etmek suretiyle, Atlantik salmonlarını beslediklerinde ve *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon uyguladıklarında bu patojene karşı herhangi bir koruma sağlamadığını bildirmişlerdir. Gram vd. (2001) de benzer şekilde *Aeromonas salmonicida* patojenine karşı *in vitro* antagonistik etki gösteren *P. fluorescens* bakterisinin, aynı etkiyi *in vivo* alışmalarda gösteremediğini ortaya koymuşlardır.

Probiyotik bakteriler patojen bakteri türlerine göre farklı etkiler gösterebilmektedirler. Gram ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada (2001), *Vibrio anguillarum*'a karşı etkin koruma sağlayan *P. fluorescens* bakterisi, *A. salmonicida*'ya karşı koruma sağlayamamıştır.

Bu çalışmada ise *F. psychrophilum* patojenine karşı deneysel enfeksiyon uygulamasında Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri, *Pseudomonas sp. GS* potansiyel probiyotik bakteri suşuna göre daha etkin koruma sağlarken, diğer taraftan

V. anguillarum patojen bakterisine karşı *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşu ticari probiyotik bakterilere oranla daha iyi bir koruma sağlamıştır.

Probiyotik bakterilerin patojen bakteri türüne göre etkinliklerinin değişmesinde, aralarındaki bazı etkileşimlerin rol oynadıkları düşünülmektedir. Örneğin bazı bakteriler yüksek miktarlarda demir elementine ihtiyaç duyarlar ve bunun için birbirleriyle rekabete girerler.

Smith ve Davey (1993), *Pseudomonas fluorescens* bakterisinin *Aeromonas salmonicida* patojen bakterisine karşı etkili olduğunu, bu etkinin aralarında gerçekleşen demir elementi rekabetinden kaynaklandığını savunmuşlardır. *P. fluorescens*, demir elementinin sınırlı bulunduğu ortamlarda gram (-) ve gram (+) bakterilerle hızla rekabete girerek çoğalmalarını engellemektedir.

Gram vd. (1999), yaptıkları *in vitro* çalışmada sınırlı demir elementinin olduğu ortamlarda *P. fluorescens* bakterisinin *Vibrio anguillarum*'un üremesini inhibe ettiğini, ancak ortamda yetecek kadar demir elementi bulunduğu herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Yaptıkları deneysel enfeksiyon uygulamasında *P. fluorescens*' in probiyotik bakteri olarak kullanıldığı grupta %25 oranında ölüm olurken kontrol grubunda bu oran % 47 olarak kaydedilmiştir.

Probiyotik bakterilerin patojen bakterilere karşı etkilerinde salgıladıkları bazı antimikrobiyal bileşiklerin de rol oynadıkları düşünülmektedir. Nair vd. (1985), denizlerde bulunan birçok bakteri türünün *Vibrio parahaemolyticus* patojenine karşı bakteriyolitik enzimler salgıladıklarını göstermişlerdir.

İmada vd. (1985), inhibitör etkiye sahip olan monastatin adlı alkalın proteaz salgılayan *Alteromonas* suşunu deniz suyundan izole edip, *in vitro* olarak bu maddenin hem sınırlı hem de bol miktarda bulunduğu ortamlarda *Aeromonas hydrophila* ve *V. anguillarum* patojenlerinin üreyemediklerini gözlemişlerdir.

Probiyotik bakterilerin etkileri balık türlerinde göre değişebilmektedir. Bu değişikliğin, farklı balık türlerinin farklı mikrobiyal yapıya sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Balıkların mikrobiyası balığın cinsi, yaşadığı sular, mevsim ve gelişim dönemine göre farklılık gösterir (İnal, 1992). Probiyotik

bakteriler konakçı türlerine göre özgünlük göstermektedirler. O yüzden kullanım için seçilecek olan probiyotik bakteri türü, o canlının mikroflorasından izole edilmiş bir bakteri türü ise çok daha olumlu sonuçlar vermektedir (Duangjitcharoen vd., 2008).

Richard vd. (2006) Bioplus 2B probiyotik bakterisini, tilapia frylarına uyguladıklarında; serum, total immunoglobülin, antikor seviyelerinde ve balıkların gelişimlerinde herhangi bir fark kaydedemezken, aynı probiyotik bakteri gökkuşığı alabalıklarında uygulandığında hem antikor titresinde yükselişe, hem de uzunluk ve ağırlık artışına neden olmuştur (Raida 2003).

Bu araştırmada, 60 gün süreyle Bioplus 2B (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*), Lactiferm (*Enterococcus faecium*) ticari probiyotikleri ve *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşuyla beslenen balıkların gelişme parametreleri incelendiğinde, her üç probiyotiğin de balıkların ağırlık ve uzunluk artışları üzerinde pozitif etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Bioplus 2B ticari probiyotiğinin 36 gün süreyle ortalama 0,4 gram ağırlığındaki gökkuşığı alabalığı larvalarına uygulandığı üzerine bir çalışmada larvaların ağırlık kazancı ve spesifik büyüme oranlarında, bu probiyotik bakterinin etkili olduğu tespit edilmiştir (Farzanfar vd., 2007).

Bioplus 2B bakterisinin kullanıldığı bir diğer çalışmada 42 gün süreyle Bioplus 2B bakterisinin yeme ilave edilmesi suretiyle beslenen gökkuşığı alabalıklarında gelişimin kontrol grubuna göre daha hızlı olduğu gözlenmiştir (Raida vd., 2003).

Probiyotik bakterilerin etki gösterebilmeleri için bağırsak yüzeyine tutunabilmeleri son derece önemlidir. *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin gökkuşığı alabalıklarının bağırsak yüzeyine tutunabilmeleri ile ilgili yapılan bir araştırmada, gökkuşığı alabalıkları adı geçen probiyotik bakterilerle 10 hafta süreyle beslenmişlerdir. Çalışmanın sonunda *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterilerinin bağırsak yüzeyindeki toplam bakteri sayısının % 36'sını oluşturduklarını, *E. faecium* bakterisinin ise bağırsak yüzeyindeki bakteri popülasyonunun %45'ini oluşturduğunu kaydetmişlerdir (Merrifield vd., 2010).

Probiyotik bakterilerin balıkların gelişimleri üzerine olan etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle beraber; patojen bakterilerle bağırsak yüzeyinde adezyon ve besin rekabetine girdikleri, bu yolla patojen bakterilerin üremelerini yavaşlatarak ya da tamamen inhibe ederek balıklardaki bir takım stres faktörlerini ortadan kaldırarak daha elverişli bir ortamda gelişmelerini sağladıkları, ayrıca bağırsak pH'ını düzenleyerek enzimlerin sindirim aktivitelerini, dolayısıyla besinlerin sindirilebilirliklerini artırdıkları bilinmektedir (Dierck, 1989; Denev vd, 2009). *Aspergillus oryzae* adlı mantarın kümes hayvanlarının gelişimi üzerindeki etkileriyle ilgili yapılan bir araştırmada bu mantar türünün barındırdığı bir takım enzimlerin besinlerin sindiriminde etkili olduğu ortaya konmuştur (Schneitz, 2005).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun gökkuşağı alabalığının bağışıklık sistemi parametrelerinden serum lizoim, lökosit ve NBT (+) nötrofil sayılarında artışa neden olduğu, büyüme ve gelişimlerini hızlandırdığı ayrıca *V. anguillarum* ve *F. psychrophilum* patojen bakterilerine karşı koruma potansiyeli oluşturdukları tespit edilmiştir.

Daha ileriki çalışmalarda bu tez çalışmasında kullanılan Bioplus 2B ve Lactiferm ticari probiyotikleri ile *Pseudomonas sp.* GS potansiyel probiyotik bakteri suşunun farklı dozlarının gökkuşağı alabalığı üzerinde denenmesiyle farklı sonuçlar alınabilmesi mümkündür.

Yem katkı maddesi olarak kullanılacak probiyotik bakterilerin çeşitli patojen bakterilere karşı sergilemiş oldukları koruma potansiyeli ile bağışıklık sistemi ve gelişimlerine olan etkileri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Ancak uygulanma ve koruma süreleriyle ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Probiyotik bakterilerin seçim kriterleriyle ilgili daha fazla araştırma yapılmalı, bunu için de konak- probiyotik bakteri ilişkisi bilinmelidir. Ayrıca probiyotik bakterilerin yetiştiricilikte kullanımı maliyet yarar analizi yapılarak ekonomik olarak da değerlendirilmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Agius, C., Roberts, R., J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26, 499–509.
- Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Poornima, M., Jithendran, K.P., Ali, S.A., Rajan, J.J.S., 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunology*, 17, 115-120.
- Ali, A., 2000. Probiotics in fish farming -Evaluation of a candidate bacterial mixture. Umea, Yüksek lisans tezi, 18, Umea.
- Aly, S.,M., Abdel-Galil, A.Y, Abdel-Aziz G.A, Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunology*, 25(1-2), 128-36.
- Amita, K., Hoshino, A., Honma, T., Wakabayashi, H., 2000. An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa River. *Fish Pathology*, 35, 193 –197.
- Anacker, R.L., Ordal, E.J., 1959. Study on the *myxobacterium Chondrococcus columnaris*. I. Serological typing. *Journal of Bacteriology*, 78, 25–32.
- Anderson, P.D., Moritomo, T., Grooth, R., 1992. Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30, 419-429.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H., Hirono, I., 2006. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress, 263–276.
- Austin, B., Austin, D.A., 1987. *Bacterial Fish Pathogens. Disease in Farmed and Wild Fish* New York Ellis Harwood Lmt., 346 s.
- Austin, B., Alsina, M., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, F., Grimont, P.A.D., 1995. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 285–302.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, Second edition. Ellis Horwood Limited Chichester, 457s .U.K.

- Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, E., Alizade, M., Farzanfar, A., 2008. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8, 43-48.
- Balca'zar, J.L., Luna, T.R., Cunningham, D.P., 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Invertebrate Pathology 96, 147–150.
- Benbrook, C.M., 2002. Antibiotic Drug Use in U.S. Aquaculture. The Northwest Science and Environmental Policy Center. IATP Report, Sandpoint, Idaho.
- Bernardet, J.F., Kerouault, B., 1989. Phenotypic and genomic studies of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseased rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in France. Applied and environmental microbiology, 55, 1796-1800.
- Bernardet, J.F., Grimont, P.A.D., 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter marinus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 39, 346-354.
- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., 1996. Cutting a Gordian knot: Embedded classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. Nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology , 46, 128– 148.
- Blanch, A.R., Alsina, M., Simon, M., Jofre, J., 1997. Determination of bacteria associated with reared turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Journal of Applied Microbiology, 82, 729-734.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology, 5, 771-781.
- Borg, A.F., 1948. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. Ph.D. Thesis. University of Washington. Seattle.
- Borg, A.F., 1960. Studies on Myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. American Association for the Advancement of Science, Wildlife Disease. Washington, DC. 8, 1–85.
- Branson, E., 1995. Rainbow trout fry syndrome. Fish Veterinary Journal 1, 1-7.

- Bruno, D.W., 1992. *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in the UK. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12, 215–216.
- Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28, 693–701.
- Brunt, J., Fyzul, A.N., Austin, B., 2007. Development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30, 573-579.
- Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, I., Dalsgaard, I., 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*, 187, 201-212.
- Bulduklu, P., Özer, S., 2007. Mersin’de Tüketime Sunulan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Motil *Aeromonas*’ların Araştırılması ve Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı. *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 24(1-2), 97-102.
- Busch, S., Dalsgaard, I., Buchmann, K., 2003. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus derjavini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. *Veterinary Parasitology*, 117, 117– 122.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8(7), 1137-1144.
- Cahil, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: A review *Microbial Ecology*, 19(1), 21-41.
- Cai, Y., Benno, Y., Nakase, T., Oh, T.K., 1998. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 44, 311-316.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.L., Schmidely, P., Mariojous, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275, 182–193.
- Cipriano, R.C., Schill, W.B., Teska, J.D., and Ford, L.A., 1996. Epizootiological study of bacterial coldwater disease in Pacific salmon and further characterization of the etiologic agent, *Flexibacter psychrophila*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8, 23-36.

- Cipriano, R.C., Holt, R.A., 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No. 86, United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.
- Çağırğan, H., Tanrikul, T.T., Balta, F., 1997. Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth International Conference "Diseases of Fish and Shell Fish". 14-19 Sep. 1997. Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists.
- Çapkın, E., Altınok, İ., 2009. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. Journal of Applied Microbiology, 106(4), 1147-1153.
- Dahiya, R.S., Speck, M.L., 1968. Hydrogen peroxide formulation by Lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science, 51(10), 1068-1072.
- Dalsgaard, I., 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga* like bacteria pathogenic for fish. Annual Review of Fish Diseases, 1, 127-144.
- Dalsgaard, I., Madsen, L., 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. Journal of Fish Diseases, 23, 199–209.
- Davis, H.S., 1946. Care and diseases of trout. United States Fish and Wildlife Service Research Report, 12. Washington, DC., 98.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. Journal International Aquatic Research, 1, 1-29.
- Desponnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., Dinan, T.G., 2008. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. Journal of Psychiatric Research, 43(2), 164-174.
- Dierck, N.A., 1989. Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: Enzymes and fermentation. Archives of Animal Nutrition, Berlin 39, 241-261.
- Diler, Ö., Altun, S., Çalikuşu, F., Diler, A., 2000. Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin Yasadığı Ortam ile İlişkili Kalitatif ve Kantitatif Bakteriyel Florası Üzerine Bir Araştırma. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 24, 251–259.

- Diler, Ö., Altun, S., Işıklı, B., I., 2003. Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7 (1): 1-8.
- Diler, Ö., Didinen, B.I., Ekici, S., Altun, S., Diler, A., Kubilay, A., 2007. Antagonistic Activities of Bacteria Against The Pathogen of Cold Water Disease, *Flavobacterium psychrophilum*. 13th International Conference of the EAAP. 17 - 22 September 2007 Diseases of Fish and Shellfish. Grado Italy, Abstract Book.
- Dulluç A., 2010. Probiyotik İlavelei Beslemenin Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) ve Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio* L. 1758) Yavrularının Büyüme ve Yem Değerlendirmesine Etkileri. Isparta, Doktora Tezi, 93, Isparta.
- Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran N., Chaiyasut, C., 2008. Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages. Pakistan Journal of Biological Science, 11, 652-655.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. American Journal of Clinical Nutrition, 73(2), 386-392.
- Düğenci, S.K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal Ethnopharmacology, 88(1), 99-106.
- Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Reprinted from Fish and Shellfish Immunology, 2, 287-297.
- Ekici, S., 2010. Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis'e Karşı Aşı Uygulamasının Bağışıklık Sistemine Etkisi. Isparta, Doktora tezi, 112, Isparta.
- Ellis, A.E., 1988. General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. 1-19p. London.
- Engelking, H.M., Kaufman, J., 1994. Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) found in four geographically distinct feral populations of salmonids in Oregon. FHS/AFS Newsletter 22, 10-12.
- Evensen, Ø.E. Lorenzen, E., 1997. Simultaneous demonstration of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and *Flavobacterium psychrophilum* in paraffin-embedded specimens of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry by use of paired immunohistochemistry. Diseases of Aquatic Organisms, 29, 227-232.

- Farzanfar, A., Aghaei, G.L., Alizadeh, M., Bayati, M., Ghorbani, R., 2007. Study on growth performance of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* larvae with different concentration of probiotic in diet. WORLD Aquaculture Society, Meeting Abstract, 1021.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbes, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, Journal of Applied Microbiology, 94, 449-455.
- Fletcher, T.C., White A., 1973. Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa L.*). Experientia 29, 1283-1285.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol, 66, 365–78.
- Fyzul., N., Adesiyun, A.A., Mutani A., Ramsubhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 103(5), 1699 – 1706.
- Garcia, C., Pozet, F., Michel, C., 2000. Standardization of experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. Disease of Aquatic Animals, 42, 191-197.
- Gatesoupe, F.J., 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. Aquatic Living Resources, 7, 277-282.
- Gatesoupe, F.J., 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Aquatic Living Resources, 10, 239-246.
- Gibson, L.F., Woodworth, J., George, A.M., 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquaculture, 169, (1-2), 111-120.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., 1984. The effect of oral administration on *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumors. Developments in Industrial Microbiology, 25, 139-150.
- Gomez, B., Roque, A., Turnbull, J., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191, 259-270.
- Gökoğlu, N., 2002. Su Ürünleri İşleme Teknolojisi, Su Vakfı Yayınları, 157s. İstanbul,

- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 969-973.
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J., Spanggaard, B., 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture*, 199, 1–11.
- Grinde, B., Jolles, J., Jolles, P., 1988. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *European Journal of Biochemistry*. 173, 269-273.
- Grinde, B., 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson as an antibacterial agent against fish pathogens. *Journal of Fish Diseases*, 12, 95-104.
- Hamid, A., Sakata, T., Kakimoto, D., 1978. Microflora in the alimentary tract of gray mullet-2. *bulletin of japanese Society of Scientific Fishers*, 44(1), 53-57.
- Hansen, E.M., 1990. Forelgige undersøgelser over Yngelsyndromet (Preliminary investigations of fry mortality syndrome). *Ferskvandsfiskeribladet*. 88, 88-92.
- Hansen, G.H., Olafsen, J.A., 1999. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microb*, 38, 1–26.
- Havenaar, R., Huis In't Veld, M.J.H., 1992. Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science, London , 151–170.
- Hernández, S.P., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 469. Rome, FAO. 97 s.
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan H., Ahrens P., Birkbeck, H., Gram, L., 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 360–371.
- Hoffmann, R., Lomel, R., 1984. Effect of repeated blood sampling on some blood Parameters in Freshwater Fish. *Journal of Fish Biology*, 24, 245-251.
- Holt, R.A., 1987. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial coldwater disease in salmonid fish. Doctoral dissertation. Oregon State University. Corvallis, Oregon.

- Holt, R.A., Amandi, A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1989. Relation of water temperature to bacterial cold-water disease in coho salmon, Chinook salmon, and rainbow trout, *Journal of Aquatic Animal Health*, 1, 94–101.
- Holt R.A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1993. Bacterial cold-water disease. In: *Bacterial Diseases of Fish* (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Brombage), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3-22.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams&Wilkins, 485-487.
- Holzappel, W.H., Haberer, P.S.J., Schilinger, U., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41, 85-101.
- Huss, H.H., 1988. *Fresh Fish Quality and Quality changes*, FAO, 131s.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- Işıdan, H., 2009. Probiyotikler. *SÜMAE-yunus Araştırma Bülteni*, 9(1), 9-10.
- Imada, C., Simidu, U., Taga, N., 1985. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.*, 51, 799–803.
- Iwama, G., and Nakanishi, T., 1996. *The Fish Immune System Organism, pathogen and Environment*. Academic Press, USA, 378.
- İnal, T., 1992. *Besin Hijyeni Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü*. İstanbul, Final Ofset, İstanbul, 783s.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., Dörücü, M., 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması. *Fırat Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Fakültesi Bilimleri Dergisi*, 16 (4), 718-724.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virlanen, E., Laine, S., Arvilommi, H., 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*, 32, 141-144.
- Kapetanovic, D., Kurtovic, B., Teskeredzic, E., 2005. Differences in Bacterial Population in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Fry after Transfer from Incubator to Pools. *Food Technology and Biotechnology* 43, 2, 189–193.

- Kaya, M., 2007. Ticari probiyotik Bactocell'in Gökkuşığı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık sistemleri ve büyümeleri üzerine etkisi. Isparta, Yüksek lisans semineri, 33, Isparta.
- Kim, D., H., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish and Shellfish Immunology, 21(5), 513-524.
- Kocabatmaz, M., Ekingen, G., 1982. Değişik tür balıklarda kan örneği alınması ve hematolojik metotların standardizasyonu. Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje No: VHAG-557, 72s.
- Korkut, A.Y., Kop, A., Demirtaş, N., Cihaner, A., 2007. Balık Beslemede Gelişim Performansının İzlenme Yöntemleri. Ege Üniversitesi. Su Ürünleri Dergisi, 24(1-2), 201-205.
- Korun, J., Timur, G., 2001. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniv Su Ürünleri Derg, 12, 15-30.
- Kubilay, A., Altun, S., Dididen, B.I., Ekici, S., Diler, Ö., 2009. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzalasyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (5), 709-715.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Cain, K.D., 2004. Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. Diseases of Aquatic Organisms., 59, 17-26.
- Leadbetter, E.R., 1974. The Gliding Bacteria Family I. Cytophagaceae Order II. Cytophagales *Nomen novum*.in: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition, 99 – 115, The Williams and Wilkins Company. Baltimore. 1246s.
- Lilly, D.M., Stillwell R.H., 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science, 147, 747-8.
- Logan, A.C., Katzman, M., 2005. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. Medical Hypotheses, 64(3), 533-538.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., (Alıntı yaparak), Hansen, F.M., Horlyck, V., Korsholm, H., Mellergaard, S., Olesen, N.J., 1991. Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bulletin of European Association of Fish Pathologists, 11, 77-79.

- Lorenzen, E., 1993. The importance of the brand of the beef extract in relation to the growth of *Flexibacter psychrophilus* in Anacker and Ordals medium. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists.*, 13, 64–65.
- Lorenzen, E., 1994. Study on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS). PhD thesis, Royal Veterinary and Agriculture University, Copenhagen.
- Madetoja, J., Nyman, P., Wiklund, T., 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 27-38.
- Madetoja, J., Nystedt, S., Wiklund, T., 2003. Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 217–223.
- Madhu, A.N., Giribhattanavar, P., Narayan, M.S., Prapulla, S.G., 2009. Probiotic lactic acid bacterium from *kanjika* as a potential source of vitamin B₁₂: evidence from LC-MS, immunological and microbiological techniques. *Biotechnology Letters*, 32(4),503-506.
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 1999. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36, 169-176.
- Madsen, L., Dalsgaard, I., 1999. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 171, 41–48.
- Madsen, L., Arnbjerg, J., Dalsgaard, I., 2001. Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Research*, 32, 235-241.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdotti, S., Bagwald, J., Dalmo, R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 429-439.
- Malhotra, S.L., 1977. Dietary factors in a study of cancer colon from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk and fermented milk products and vegetable fibre. *Medical Hypotheses*, 3(3), 122-126.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition* early view DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x.

- Mitra, A., Foster-Frey, J.A., Wells, K.D., Rexroad, C.E., Wells, K.D., Wall, R.J., 2003. Molecular Characterization lysozyme type II gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evidence of Gene Duplication. *Animal Biotechnology* 14, 7-12.
- Morteza, A., Farzanfar, A., Lashtuaghai, G.R., Bayati, M., Ghorbani, R., 2010. Effect of dietary different levels of probiotic on growth performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in larvae stage. ISFNF 2010 Qingdao/China P-345.
- Naidau, A.S., 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 38, 13-126.
- Nair, S., Tsukamoto, K., Shimidu, U., 1985. Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environments of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51, 1469–1473.
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Disease*, 26(10), 563-574.
- Nieto, P., Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1984. Comparison Between The Bacterial Flora Associated with Fingerling Rainbow Trout Cultured in Two Different Hatcheries in the North-West of Spain. *Aquaculture*, 42, 193-206.
- Obach, A., Baudin-Laurencin, F., 1991. Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 13-15.
- Ocak, F., 2006. Balıklarda Lenfoid Organlar ve İmmun Sistemin Özellikleri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 61-66.
- Olafsen, J.A., 1995. Bacterial antigen priming of marine fish larvae. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 371A, 349-52.
- Olivares, M., Ropero, M.P.D., Gomez, N., Villoslada, F.L., Sierra, S., Maldonado, J.A., Martin, R., Rodriguez, J.M., Xaus, J., 2006. *International Microbiology*, 9(1), 47-52.
- Oyetayo, V.O., Oyetayo, F.L., 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*, 4 (2), 123-127.
- Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım B., 2005. Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeylere Yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(9), 1-10.
- Özdamar, K., 2001. Tıp Biyoloji Eczacılık ve Diş Hekimliği Öğrencileri İçin SPSS ile Biyoistatistik, Kaan Kitabevi, 452s.

- Öztürk, F.Y., 2007. Levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) probiyotik olarak *Lactobacillus rhamnosus* kullanılması performans üzerindeki etkisi. Ankara, Doktora Tezi, 77, Ankara.
- Pacha, R.E., Porter, S., 1968. Characteristics of *Myxobacteria* Isolated from the Surface of Freshwater Fish. *Applied Microbiology*, Dec, 1901-1906.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Sath, S., Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102(4), 379-388.
- Parker, R.B., 1974. Probiotics. The other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*, 29:4-8.
- Peters, R.K., Pike, M.C., Garabrant, D., and Mack, T.M., 1992. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. *Cancer Causes Control* 3, 457-473.
- Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E., Buchmann, K., 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*, 26, 495-498.
- Rangdale, R.E., Richards, R.H., Alderman, D.J., 1996. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16, 63-67.
- Reichenbach, H., Dworkin, M., 1981. The Order Cytophagales (with addenda on the genera *Herpetosiphon*, *Saprospira*, and *Flexithrix*, 356 - 379, in: M.P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel, eds. *The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*, Volume 1. Springer-Verlag. Berlin. 1102s.
- Richard, A.S., Lim, C., Aksoy, M.Y., Delaney, M.A., 2006. Effects of Probiotic Diet Supplements on Disease Resistance and Immune Response of Young Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 18(2), 23-34.
- Robertson, P.A.V., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams P., Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185(3-4), 235-243.

- Sakata, T., Okabayashi, J., Kakimoto, D., 1980. Variations in the intestinal flora of Tilapia reared in fresh and sea water. Bulletin of the Japanese society of scientific fishers, 46(3), 313-317.
- Sakata, T., 1990. Microflora in The Digestive Tract of Fish and Shell-fish. In: R. Lesel, Editor, Microbiology in Poecilotherms, Elsevier, Amsterdam, Pp. 171–176.
- Salminen, S., Deighton, S., Gorbach, S., 1998a. Lactic acid bacteria in health and disease. Pages 1-72, in “Lactic Acid Bacteria”, Second Edition, Ed. S. Salminen and A. von Wright, Marcel Dekker Inc. 270 Madison Avenue, New York, 10016, USA, 442s.
- Santos, Y., Huntly, P.J.A., Turnbull, A., Hastings, T.S., 1992. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 12, 209-210.
- Sarıeyüpoğlu, M., 1984. Gökkuşığı alabalıklarında mide barsak bakteriyel florasının aerobik yönden incelenmesi. Doğa Bilim Dergisi., 8(3), 281-287.
- Schneitz, C., 2005. Competitive exclusion in poultry—30 years of research. Food Control, 16, 657-667.
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, 27(3), 440-445.
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010. Development of Protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the *Kocuria* SM1. Fish and Shellfish immunology, 29 , 212-216.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary immunology and immunopathology, May, 41, (1-2), 125-139.
- Smith, P.Davey, S., 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. Journal of Fish Diseases. Fish Dis. 16, 521–524.
- Sousa, J.A., Souza, A.T.S., 2001. Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil. 44(4), ISSN 1516-8913.
- Sperti, G., S., 1971 Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co.

- Süzer, C., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Fırat, K., Otkucuoğlu, Ö., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1-4), 140-145.
- Tamai, Y., Oishi, H., Nakagawa, I., Watanabe, Y., Shinmoto, H., Kuwabara, Y., Yamato, K., Nagai, S., 1995. Antimutagenic activity of the milk fermented by mixed-cultured with various lactic acid bacteria and a yeast. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology [Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi]* 42, 383-387.
- TUIK, 2009. www.tuik.gov.tr. Erişim tarihi: 03.01.2011.
- USFWS (United States Fish and Wildlife Service). 1995. Fisheries: fish health operations. USFWS, FWM 170, Part 713 FW, Washington, DC.
- Wang, Z.Y., Zhou, X., Li, W., 2008. Effect of Probiotics *Enterococcus faecium* on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277, 203-207.
- Wood, J.W., 1974. Diseases of Pacific salmon, their prevention and treatment, 2nd edition. Washington. Department of Fisheries, Olympia.
- Verlach, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schüep, W., Hole, R., 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Fish and Shellfish Immunology*, 8(6), 409-424 .
- Vijayan, K.K., Singh, I.S.B., Jayaprakash, N.S., Alavandi, S.V., Pai, S.S., Preetha, R., Rajan, J.J.S., Santiago, T.S., 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture*, 251, 192-200.
- Vural, T., 2000. Probiyotiklerin gelişimi, XXIX. Türk mikrobiyoloji kongresi, 251-256.
- Yağcı R.V., 2007. Probiyotikler- Prebiyotikler: Sağlıkta ve Hastalıkta. *ANKEM Derg.*, 21(2), 243-245.
- Yan, F., Polk, D.B., 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine induced apoptosis in intestinal epithelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50959-65.
- Yan, F., Polk, D.B., 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20, 565-571.

- Yano, T., 1996. The Non Spesific Immune System: Humoral Defense. The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Pres, Inc (Google Boks), 105-109.
- Yılsoy, T.O., Kurdal, E., 2000. Probiyotik st rnlerinin beslenme ve sağlık üzerine etkisi. VI. St ve st Ürünleri sempozyumu (Ed. M. Demirci). Tekirdağ, 279-286.
- Yıldırım, S., zer, S., 2010. Mersin İli ağlarca Kyndeki Gkkuşaağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Kulukahanelerinde *Flavobacterium spp.* Varlığı. Journal of Fishers Science, 4(1), 112-122.
- Yiğit, N., ., Koca, S., B., Diler, İ., Dulluç, A., 2009. Probiyotik Olarak Bactocell Kullanımının Melek Balıklarında (*Pterophyllum Scalare Lictenstein*, 1823) Büyüme Performansı ve Yaşama Oranları zerine Etkileri. XV. Ulusal Su rnleri Sempozyumu, 01- 04 Temmuz 2009, Rize.

