



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SİNNAMİK ASİT VEYA *Bacillus subtilis*'in GÖKKUŞAĞI  
ALABALIĞI YEMLERİNDE KULLANIMININ BÜYÜME  
PERFORMANSI VE BAZI BAĞIŞIKLIK PARAMETRELERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ

Sevdan YILMAZ

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**DOKTORA TEZİ**

**SİNNAMİK ASİT VEYA *Bacillus subtilis*'in GÖKKUŞAĞI  
ALABALIĞI YEMLERİNDE KULLANIMININ BÜYÜME  
PERFORMANSI VE BAZI BAĞIŞIKLIK PARAMETRELERİ  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Sevdan YILMAZ**

**Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 16/01/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN**

**ÇANAKKALE**

Sevdan YILMAZ tarafından Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN yönetiminde hazırlanan ve 16/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Sinnamik Asit veya *Bacillus subtilis*’in Gökkuşığı Alabalığı Yemlerinde Kullanımının Büyüme Performansı ve Bazı Bağışıklık Parametreleri Üzerine Etkisi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

## **JÜRİ**

Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ

### **Başkan**

Prof Dr. Sebahattin ERGÜN

### **Üye**

Prof Dr. Murat YIĞIT

### **Üye**

Doç.Dr. Ekrem Şanver ÇELİK

### **Üye**

Doç.Dr. Derya GÜROY

### **Üye**

Prof Dr Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması, TÜBİTAK ve BAP tarafından 1130364 ve FAY-2014-256 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Sevdan YILMAZ

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen eşim Dilek YILMAZ ve oğlum Çınar YILMAZ'a ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tez çalışmasına destek veren TÜBİTAK yönetimine ve TOVAG grubuna özellikle de proje süresince idari yardımlarından dolayı uzman Alperen ERDOĞAN' a, denemenin kurulmasında, yürütülmesinde, analizlerin yapılmasında bize yardımcı olan Müge DUYSAK, Fatih AYDIN, Nergiz SOYTAŞ, Fatma AKÇAY, Samet ALKAN ve Çağatay BAYİZİT, analizlerin değerlendirilmesinde bizden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Mert GÜRKAN' a rRNA ve gyrB gen dizileme analizlerinde bizlerden yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM, Dr. Emre TURGAY, Can SARVAN'a ve REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. ve personeli Ahmet R. Türkyılmaz'a, patojen bakteri temininde yardımlarını esirgemeyen Dr. Ertan Emek ONUK'a teşekkür ederiz.

Sevdan YILMAZ  
Çanakkale, Ocak 2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Kg	Kilogram
g	Gram
%	Yüzde oranı
mL	Mililitre
OBA	Ortalama Başlangıç Ağırlığı
OSA	Ortalama Son Ağırlığı
CAA	Canlı Ağırlık Artışı
YDO	Yem Dönüşüm Oranı
SBO	Spesifik Büyüme Oranı
İOYİ	İç Organ Yağı İndeksi
HSİ	Hepatosomatik indeks
VSİ	Visserosomatik indeks
SSİ	Safrasomatik İndeks
DSİ	Dalaksomatik İndeks
KSİ	Kalpsomatik İndeks
LM	Lökosit Miktarı
RBC	Eritrosit Miktarı
Hct	Hematokrit Miktarı
Hgb	Hemoglobin Miktarı
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi
MCH	Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin
MCHC	Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu
NBT	Nitroblue Tetrazolium
SOD	Süperoksit Dismutaz
Ig	İmmunoglobulin
MPO	Miyeloperoksidaz
TRİ	Trigliserid
KOL	Kolesterol
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

ALP	Alkalen Fosfataz
GOT	Glutamik Oksaloasetik Transaminaz
GPT	Glutamik Pirüvik Transaminaz
CK	Kreatin Kinaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz



## ÖZET

### SİNNAMİK ASİT VEYA *Bacillus subtilis*'in GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI YEMLERİNDE KULLANIMININ BÜYÜME PERFORMANSI VE BAZI BAĞIŞIKLIK PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sevdan YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

16/01/2017, 210

Bu çalışmada yeme farklı oranlarda ilave edilen sinnamik asit, *Bacillus subtilis* veya sinnamik asit ile birlikte + probiyotik *B. subtilis*'in gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansı, besin ve yağ asidi kompozisyonu, toplam karaciğer yağ miktarı, iç organ indeksleri, bağırsak mikrobiyotası, kan, yem, mide, bağırsak pH miktarları, sindirim enzimleri, immunolojik, hematolojik, serum biyokimyasal sağlık karakteristikleri, serum antioksidan enzim aktiviteleri ve hastalık (*Yersinia ruckeri*) direnci üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca *in vitro* denemelerde disk difüzyon, minimum inhibitör konsantrasyonu ve sıvı kültür inhibisyon testleri ile sinnamik asit, *B. subtilis* üs fazı ve sinnamik asit+ *B. subtilis* üs fazının alabalık bağırsak izolatları ve balık patojenleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışma kapsamında sadece sinnamik asit içeren gruplarda; kontrol (katkı içermeyen), %0,025, %0,050, %0,075 ve %0,15 veya sinnamik asit+ *B. subtilis* içeren gruplarda; kontrol, *B. subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ve sinnamik asit %0,025-%0,15+ *B. subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> içeren yemlerle 60 gün boyunca beslenmişler ve devamında *Y.ruckeri* ile infekte edilmişlerdir.

Denemelerde bazı sindirim ve antioksidan enzimleri, iç organ indeksleri (sadece sinnamik asit+ *B. subtilis* denemesinde), bağırsak mikrobiyotası (sadece *B. subtilis* ilaveli gruplarda), hematolojik, immunolojik, serum biyokimyasal ve *Y.ruckeri* bakterisine karşı yaşama oranları doza ve zamana bağlı olarak, kontrole göre önemli oranda iyileşme göstermiştir. Ayrıca sinnamik asitin disk difüzyon testi sonucunda *A. sobria*, *A. salmonicida*, *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* patojenleri üzerine antimikrobiyal etki



gösterdiği tespit edilmiştir. Sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda ise sinamik asitin tek başına veya *B. subtilis* üs fazı ile birlikte *A. sobria*, *A. salmonicida*, *Citrobacter sp.*, *E. tarda*, *L. garvieae*, *L. anguillarum*, *Y. ruckeri* ve *S. iniae* patojenlerinin ürmesini engellediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yeme %0,025 veya %0,050 sinamik asit veya %0,025-0,150 sinamik asit + *B. subtilis* ilavesinin gökkuşağı alabalıklarında bağışık yanıtı ve hastalık direncini arttırabileceği bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bulgular ışığında sinamik asit veya sinamik asit+ *B. subtilis*' in gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde kızıl ağız hastalığının kontrol altına alınmasında antibiyotiklere alternatif olabileceği görülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** *Oncorhynchus mykiss*, Organik Asit, Probiyotik, Büyüme, Bağışıklık, *Yersinia ruckeri*

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF DIETARY CINNAMIC ACID OR *Bacillus subtilis* ON GROWTH PERFORMANCE AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN RAINBOW TROUT

Sevdan YILMAZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Aquaculture

Advisor : Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

16/01/2017, 210

The aim of this study was to assess the effect of different ratio of dietary cinnamic acid, *Bacillus subtilis* (Probiotic) or cinnamic acid + *B. subtilis* on the growth performance, proximate and fatty acid compositions, total liver fat levels, biometric indices, intestinal microbiota, blood, feed, stomach and intestine pH, digestive enzymes, immunological, hematological, serum biochemical health characteristics, serum antioxidant enzyme activities, and disease (*Yersinia ruckeri*) resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Fish were fed diets containing cinnamic acid; control (non supplemented): or diet supplemented with 0.025%, 0.05%, 0.075% and 0.15% cinnamic acid and/or cinnamic acid+ *B. subtilis*: control (non supplemented); or diet supplemented with *B. subtilis*;  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> 0.025%-0.15% cinnamic acid+ *B. subtilis*;  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> up to 60 days and then infected with *Y.ruckeri*.

Some digestive and antioxidant enzymes, hematological, immunological, serum biochemical and biometric indices (only cinnamic acid + probiotic experiments), intestinal microbiota (only *B. subtilis* diets) and survival percentages of fish challenged with *Y.ruckeri* were dose- and time-dependently and significantly improved in fish fed with cinnamic acid, *B. subtilis* or cinnamic acid + *B. subtilis* diets compared to those of young trout fed the control diet. In disc diffusion assay, cinnamic acid showed antimicrobial activity against pathogenic *A. sobria*, *A. salmonicida*, *L. anguillarum* and *Y. ruckeri*. Results of a liquid culture inhibition assay showed that cinnamic acid or cinnamic acid+ cell-free supernatant of *B. subtilis* was also effective in inhibiting strains of *A. sobria*, *A.*

*salmonicida*, *Citrobacter sp.*, *E. tarda*, *L. garvieae*, *L. anguillarum*, *Y. ruckeri* and *S. iniae*.

It was concluded that 0.025 or 0.050 % cinnamic acid or 0.025-0.150% cinnamic acid + *B. subtilis* can enhance immune responses and disease resistance of rainbow trout, suggesting that cinnamic acid or cinnamic acid+*B. subtilis* may be an alternative to antibiotics in controlling enteric redmouth disease in rainbow trout culture.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, Organic Acid, Probiotic, Growth, Immunity, *Yersinia ruckeri*



## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU .....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	3
2.1. Gökkuşuğu Alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.2. Yersiniozis (Enterik Kızıl Ağız Hastalığı) Hakkında Genel Bilgiler .....	5
2.3. Organik Asitler Hakkında Genel Bilgiler.....	7
2.4. Sinnamik Asit Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.5. Yeme İlave Edilen Organik Asitlerin Etki Şekli ve Etkileri .....	9
2.5.1. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları.....	9
2.5.2. Organik Asitlerin Balıkların Bağırsak Florası Üzerine Etkileriyle İlgili Yapılmış Çalışmalar .....	11
2.5.3. Organik Asitlerin Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı Üzerine Etki Mekanizmaları .....	12
2.5.4. Organik Asitlerin Balıkların Yeme olan Tepkisi Üzerine Etkileri.....	13
2.5.5. Organik Asitlerin Yem, Mide ve Bağırsak pH'ı Üzerine Etkileri .....	14
2.5.6. Organik Asitlerin Sindirim Enzimleri Üzerine Etkileri.....	16
2.5.7. Organik Asitlerin Alabalıklar Üzerine Etkileriyle ilgili Yapılmış Çalışmalar... ..	16
2.6. Balık Yemlerinde Kullanılan Probiyotik Katkıları .....	18
2.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları.....	24
2.7.1. Probiyotik Bakterilerin Antagonistik Özellikleri .....	24
2.7.2. Probiyotik Bakterilerin Rekabetçi Flora Üzerine Etkileri .....	25
2.7.3. Probiyotik Bakterilerin Bağışıklık Yanıt Üzerine Etkileri.....	26

2.7.4. Probiyotik Bakterilerin Su Kalitesi Üzerine Etkileri.....	27
2.7.5. Probiyotik Bakterilerin “Quorum Sensing” Üzerine Etkileri.....	28
2.7.6. Probiyotik Bakterilerin Antifungal ve Antiviral Özellikleri.....	28
2.8. Balıklarda Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı.....	29
2.9. Balıklarda Yağ ve Yağ Asitleri.....	30
2.10. Balık Besleme Denemelerinde Kullanılan Sağlık Karakteristikleri ve Önemi .....	31
2.10.1. Hematoloji ve Hematolojik Analizlerin Önemi .....	31
2.10.2. Balıklarda Kan Hücreleri ve Bağışıklık Sistemindeki Görevleri.....	32
2.10.2.1. Kırmızı Kan Hücreleri (Eritrositler) .....	32
2.10.2.2. Beyaz Kan Hücreleri (Lökositler).....	33
2.10.2.2.1. T lenfositler .....	34
2.10.2.2.2. B lenfositler .....	34
2.10.2.2.3. Retikuloendotelyal Sistem (RES).....	34
2.10.2.2.4. Mononükleer Fagositler .....	34
2.10.2.2.5. Polimorf nükleer Lökositler (PMNL).....	35
2.10.2.2.6. Nötrofiller.....	35
2.10.2.2.7. Eozinofiller.....	35
2.10.2.2.8. Bazofiller.....	36
2.10.2.2.9. Trombositler.....	36
2.10.3. Bağışıklık Sisteminde Görev Alan Organlar.....	36
2.10.3.1. Böbrek.....	36
2.10.3.2. Timus.....	37
2.10.3.3. Karaciğer .....	38
2.10.3.4. Bağırsak.....	38
2.10.3.5. Dalak .....	39
2.10.4. Balıklarda Bağışıklık Sistemi.....	40
2.10.4.1. Balıklarda Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi .....	40
2.10.4.1.1. Balıklarda Fagositoz.....	41
2.10.4.1.2. Balıklarda Solunum Patlaması (Respiratörük Yıkım).....	43
2.10.4.1.3. Balıklarda Lizozomal Enzimler .....	47
2.10.4.1.4. Kompleman .....	48
2.10.4.1.5. Proteinaz .....	50
2.10.4.2. Balıklarda Spesifik Bağışıklık Sistemi .....	50
2.10.5. Balıklarda Kullanılan Bağışıklık Arttırıcı Katkı Maddeleri .....	52

2.10.6. Balıklarda Kan Biyokimyası .....	54
2.10.6.1. Plazma .....	54
2.10.6.2. Glikoz.....	54
2.10.6.3. Kan Proteinleri.....	55
2.10.6.4. Kan Yağları .....	56
2.10.6.5. Kan Enzimleri.....	59
2.10.7. Balıklarda Kortizol .....	60
2.10.8. Balıklarda Antioksidan Enzimler .....	63
2.10.9. Balıklarda İç Organ İndeksleri .....	64
2.10.10. Balıklarda Bağırsak ve Mide Enzimleri.....	66
2.10.11. Balıklarda Bağırsak Florası.....	67
2.10.12. Kan pH değeri.....	69
<b>BÖLÜM 3</b>	
<b>MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>70</b>
3.1. Deneme Yeri.....	70
3.2. Deneme Materyalleri ve Deney Sistemleri.....	71
3.2.1. Deneme 1 .....	72
3.2.1.1. Deneme 1.1. ....	72
3.2.1.2. Deneme 1.2.....	72
3.2.2. Deneme 2 .....	73
3.2.2.1. Deneme 2.1 .....	73
3.2.2.2. Deneme 2.2 .....	73
3.2.3. Deneme 3 .....	74
3.2.4. Deneme 4 .....	74
3.3. Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Analizleri.....	74
3.4. Büyüme Performansı, Yemden Yararlanmanın ve İç organ İndekslerinin Hesaplanması.....	74
3.5. Kimyasal Besin Madde Analizleri .....	75
3.5.1. Kuru Madde Analizi .....	75
3.5.2. Protein Analizi.....	76
3.5.3. Yağ Analizi .....	76
3.5.4. Kül Analizi.....	76
3.5.5. Yağ Asidi Analizi.....	77
3.6. Balıklardan Kan Örneklerinin Alınması ve Analizleri.....	77

3.6.1. Hematolojik Analizler.....	78
3.6.2. Beyaz Kan Hücre Sayısı ve Tipleri .....	79
3.6.3. İmmunolojik Analizler.....	80
3.6.3.1. Respiratöri Burst Aktivitesi.....	80
3.6.3.2. Süperoksit Anyon Üretimi .....	81
3.6.3.3. Fagositik İndeks ve Aktivite.....	81
3.6.3.4. Lizozim Aktivitesi .....	81
3.6.3.5. Myeloperoksidaz Aktivitesi .....	82
3.6.3.6. Serum Toplam Antiproteaz Aktivitesi .....	82
3.6.3.7. α1-Antiproteaz Aktivitesi.....	82
3.6.3.8. Hemolitik Komplement.....	82
3.6.4. Kortizol Testi.....	83
3.6.5. Biyokimyasal Analizler .....	83
3.7. Antioksidan Savunma Sistemi Analizleri.....	83
3.7.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK).....	83
3.7.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi.....	83
3.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi .....	84
3.8. Balıkların <i>Y.ruckeri</i> ile infekte edilmesi, balıklarda yaşama oranı ve LD50'nin hesaplanması .....	84
3.9. Aglütinasyon.....	84
3.10. Bağırsak Mikrobiotası ve pH analizleri .....	84
3.11. Bağırsak ve Mide Enzimleri.....	85
3.12. <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterilerinin Teşhisi .....	86
3.13. <i>In vitro</i> Denemeler .....	87
3.13.1. Disk Difüzyon Testi .....	87
3.13.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK).....	88
3.13.3. Sıvı Kültür İnhibisyon Testi .....	89
3.14. İstatistiksel Analizler.....	90
<b>BÖLÜM 4</b>	
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>92</b>
4.1. Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları.....	92
4.2. Deneme 1.1 .....	92
4.2.1. Büyüme Performansı Bulguları.....	92
4.2.2. Besin Kompozisyonu ve Karaciğer Yağ Bulguları .....	92

4.2.3. Yağ Asidi Bulguları.....	93
4.2.4. Bağırsak Mikrobiyotası Bulguları .....	95
4.2.5. Yem, Mide ve Bağırsak pH Bulguları.....	95
4.2.6. Bağırsak ve Mide Enzim Bulguları.....	96
4.2.7. İç Organ İndeks Bulguları.....	96
4.2.8. Serum Biyokimyası Bulguları.....	97
4.2.9. Serum Antioksidan Analiz Bulguları.....	98
4.3. Deneme 1.2.....	98
4.3.1. LD50 ve Yaşama Oranı Bulguları.....	98
4.3.2. Hematolojik Bulgular .....	100
4.3.3. İmmunolojik Bulgular.....	102
4.3.4. Kan pH Bulguları .....	110
4.3.5. Serum Biyokimya Bulguları .....	110
4.3.6. Kortizol Bulguları.....	113
4.4. Deneme 2.1.....	113
4.4.1. Büyüme Performansı Bulguları.....	113
4.4.2. Besin Kompozisyonu ve Karaciğer Yağ Bulguları.....	114
4.4.3. Yağ Asidi Bulguları.....	114
4.4.4. Bağırsak Mikrobiyotası Bulguları.....	116
4.4.5. Yem, Mide ve Bağırsak pH Bulguları.....	117
4.4.6. Bağırsak ve Mide Enzim Bulguları .....	117
4.4.7. İç Organ İndeks Bulguları.....	118
4.2.8. Serum Biyokimyası Bulguları.....	119
4.2.9. Serum Antioksidan Analiz Bulguları.....	120
4.5. Deneme 2.2.....	121
4.5.1. Yaşama Oranı Bulguları .....	121
4.5.2. Hematolojik Bulgular .....	122
4.5.3. İmmunolojik Bulgular.....	123
4.5.4. Kan pH Bulguları .....	133
4.5.5. Serum Biyokimya Bulguları .....	133
4.5.6. Kortizol Bulguları.....	136
4.6. Deneme 3.....	136
4.6.1. Büyüme Performansı Bulguları.....	136
4.6.2. Besin Kompozisyonu Bulguları .....	137



4.6.3. Kortizol ve Hematolojik Bulgular .....	137
4.7. Deneme 4.....	138
4.7.1. Büyüme Performansı Bulguları.....	138
4.7.2. Besin Kompozisyonu Bulguları .....	139
4.7.3. Kortizol ve Hematolojik Bulgular .....	139
4.8. 16S rRNA ve gyrB Gen Dizileme Analizi Bulguları.....	140
4.9. Antimikrobiyal ve Sıvı Kültür İnhibisyon Analiz Bulguları.....	142
4.10. Araştırma Bulgularının Genel Olarak Değerlendirilmesi ve Literatür ile Tartışılması.....	152
<b>BÖLÜM 5</b>	
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>171</b>
5.1. Sonuçlar .....	171
5.2. Öneriler.....	173
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>175</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>I</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Sinnamik asit .....	9
Şekil 2.2. Organik asitlerin balıklar üzerindeki muhtemel etki mekanizmaları .....	18
Şekil 2.3. Probiyotiklerin konakçıdaki bağışıklık arttırıcı etkisi .....	27
Şekil 2.4. Balıklarda kan hücrelerinin şekilleri.....	32
Şekil 2.5. Bağırsaklarda antijenlerin emilimi ve taşınımı .....	39
Şekil 2.6. Fagositozun aşamaları.....	42
Şekil 2.7. Süperoksit radikal üretimi ve indirgenmesi .....	44
Şekil 2.8. Fagositik hücrelerin mikrobisidal mekanizması.....	46
Şekil 2.9. Lizozomal enzimler .....	48
Şekil 2.10. Koplemen aktivasyonundaki üç ana yolun şematik gösterimi .....	49
Şekil 2.11. Balıklarda spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi.....	51
Şekil 2.12. Glikoz metabolizması .....	55
Şekil 2.13. Eksojen yağların metabolizması.....	57
Şekil 2.14. VLDL metabolizması ve LDL nin üretimi.....	58
Şekil 2.15. HDL metabolizması.....	59
Şekil 2.16. Kortizolün balıklar üzerindeki metabolik etkileri .....	61
Şekil 2.17. Kemikli balıklarda kortizol biyosentesi.....	62
Şekil 2.18. Antioksidantların radikallerin uzaklaştırılmasında ve demirin indirgenmesindeki etkisi .....	64
Şekil 2.19. Gökkuşluğu alabalığında iç organların görüntüsü.....	66
Şekil 2.20. Gökkuşluğu alabalığı bağırsak florasının elektron mikroskop görüntüleri.....	68
Şekil 3.1. Denemenin yürütüldüğü kapalı devre sistemlerin görüntüsü.....	70
Şekil 3.2. Denemelerde kullanılan alabalıkların görüntüsü.....	72
Şekil 3.3. Sinnamik asit ve <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC® 6633)'in MYP (Mannitol-Egg-yolk- Polymyxine Agar) besiyeri üzerindeki görüntüsü .....	72
Şekil 3.4. Balıklardan kan örneklerinin alınması.....	78
Şekil 3.5. Yayma preparattaki hücre tiplerinin mikroskobik görüntüsü .....	80
Şekil 3.6. Antibiyotik ve sinnamik asit disklerinin zon çapları ölçüm görüntüsü .....	88
Şekil 4.1. Deneme 1.2 sonunda <i>Y.ruckeri</i> ile infekte edilmiş alabalıkların gruplar arasındaki yaşama oranlarındaki değişimler .....	99
Şekil 4.2. Deneme 1.2 sonunda gruplara göre aglütinasyon bulgularındaki değişimler ...	100

Şekil 4.3. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lökosit miktarı bulgularındaki değişimler	102
Şekil 4.4. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lenfosit yüzdesi bulgularındaki değişimler	103
Şekil 4.5. Deneme 1.2 süresince gruplara göre granülosit yüzdesi bulgularındaki değişimler	103
Şekil 4.6. Deneme 1.2 süresince gruplara göre monosit yüzdesi bulgularındaki değişimler	104
Şekil 4.7. Deneme 1.2 süresince gruplara göre fagositik aktivite bulgularındaki değişimler	104
Şekil 4.8. Deneme 1.2 süresince gruplara göre fagositik indeks bulgularındaki değişimler	105
Şekil 4.9. Deneme 1.2 süresince gruplara göre süperoksit anyon üretimi bulgularındaki değişimler	105
Şekil 4.10. Deneme 1.2 süresince gruplara göre respiratöri burst aktivitesi bulgularındaki değişimler	106
Şekil 4.11. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lizozim aktivitesi bulgularındaki değişimler	107
Şekil 4.12. Deneme 1.2 süresince gruplara göre myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi bulgularındaki değişimler	107
Şekil 4.13. Deneme 1.2 süresince gruplara göre süresince toplam antiproteaz aktivitesi bulgularındaki değişimler	108
Şekil 4.14. Deneme 1.2 süresince gruplara göre $\alpha$ 1-antiproteaz (%) aktivitesi bulgularındaki değişimler	108
Şekil 4.15. Deneme 1.2 süresince gruplara göre toplam Ig bulgularındaki değişimler	109
Şekil 4.16. Deneme 1.2 süresince gruplara göre hemolitik komplemant bulgularındaki değişimler	109
Şekil 4.17. Deneme 1.2 süresince gruplara göre kan pH bulgularındaki değişimler	110
Şekil 4.18. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum glikoz bulgularındaki değişimler	111
Şekil 4.19. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum toplam protein bulgularındaki değişimler	111
Şekil 4.20. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum albumin bulgularındaki değişimler	112

Şekil 4.21. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum globulin bulgularındaki değişimler.....	112
Şekil 4.22. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum kortizol bulgularındaki değişimler....	113
Şekil 4.23. Deneme 2.2 sonunda <i>Y.ruckeri</i> ile infekte edilmiş alabalıkların gruplar arasındaki yaşama oranlarındaki değişimler.....	121
Şekil 4.24. Deneme 2.2 sonunda gruplara göre aglütinasyon bulgularındaki değişimler..	122
Şekil 4.25. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lökosit miktarı bulgularındaki değişimler...	124
Şekil 4.26. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lenfosit yüzdesi bulgularındaki değişimler.....	125
Şekil 4.27. Deneme 2.2 süresince gruplara göre granülosit yüzdesi bulgularındaki değişimler .....	125
Şekil 4.28. Deneme 2.2 süresince gruplara göre monosit yüzdesi bulgularındaki değişimler.	126
Şekil 4.29. Deneme 2.2 süresince gruplara göre fagositik aktivite bulgularındaki değişimler. ....	127
Şekil 4.30. Deneme 2.2 süresince gruplara göre fagositik indeks bulgularındaki değişimler.....	128
Şekil 4.31. Deneme 2.2 süresince gruplara göre süperoksit anyon üretimi bulgularındaki değişimler. ....	128
Şekil 4.32. Deneme 2.2 süresince gruplara göre respiratöri burst aktivitesi bulgularındaki değişimler. ....	129
Şekil 4.33. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lizozim aktivitesi bulgularındaki değişimler .....	130
Şekil 4.34. Deneme 2.2 süresince gruplara göre myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi bulgularındaki değişimler.....	130
Şekil 4.35. Deneme 2.2 süresince gruplara göre toplam antiproteaz aktivitesi bulgularındaki değişimler.....	131
Şekil 4.36. Deneme 2.2 süresince gruplara göre $\alpha$ 1-antiproteaz (%) aktivitesi bulgularındaki değişimler.....	131
Şekil 4.37. Deneme 2.2 süresince gruplara göre toplam Ig bulgularındaki değişimler.. ..	132
Şekil 4.38. Deneme 2.2 süresince gruplara göre hemolitik komplement bulgularındaki değişimler. ....	132

Şekil 4.39. Deneme 2.2 süresince gruplara göre kan pH bulgularındaki değişimler.....	133
Şekil 4.40. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum glikoz bulgularındaki değişimler.....	134
Şekil 4.41. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum toplam protein bulgularındaki değişimler.....	134
Şekil 4.42. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum albumin bulgularındaki değişimler.....	135
Şekil 4.43. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum globulin bulgularındaki değişimler.....	135
Şekil 4.44. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum kortizol bulgularındaki değişimler.....	136
Şekil 4.45. Elde edilen izolatların <i>gyrB</i> gen bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görünütüsü.....	141
Şekil 4.46. 16S rRNA gen bölgesi için PCR ürünlerine ait jel elektroforez görüntüsü.....	142
Şekil 4.47. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Aeromonas sobria</i> , SY-AS1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	145
Şekil 4.48. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Aeromonas salmonicida</i> , ATCC 33658 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	146
Şekil 4.49. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Citrobacter sp.</i> , SY-C10 bakterisi nin üremesi üzerine etkileri.....	147
Şekil 4.50. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Edwardsiella tarda</i> , SY-ED1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	148
Şekil 4.51. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Lactococcus garvieae</i> , SY-LG1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	149
Şekil 4.52. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Listonella anguillarum</i> , SY-L24 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	150
Şekil 4.53. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Yersinia ruckeri</i> , E42 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	151
Şekil 4.54. Sinnamik asit veya <i>Bacillus subtilis</i> (BS)' in <i>Streptococcus iniae</i> ATCC 2917 bakterisinin üremesi üzerine etkileri.....	151

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 2.1. Gökkuşuğu alabalığının gereksinim duyduğu protein ve yağ oranları .....	3
Çizelge 2.2. Gökkuşuğu alabalığının esansiyel amino asit gereksinimleri .....	4
Çizelge 2.3. Alabalık yetiştiriciliği için su kalite kriterleri .....	6
Çizelge 2.4. Dünya da en çok bilinen organik asitler .....	7
Çizelge 2.5. Organik asitlerin yem, mide ve bağırsak pH'ı üzerine etkileri .....	15
Çizelge 2.6. Organik asitlerin alabalıklar üzerine etkileriyle ilgili yapılmış çalışmalar .....	17
Çizelge 2.7. Gökkuşuğu alabalıklarında potansiyel probiyotiklerin balıklar üzerindeki etkileri.....	21
Çizelge 2.8. Balıklarda spesifik olmayan sistem mekanizmaları.....	41
Çizelge 2.9. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan bağışıklık arttırıcılar .....	53
Çizelge 3.1. <i>In vitro</i> denemelerde kullanılan alabalık bağırsak izolatları ve balık patojenleri .....	90
Çizelge 4.1. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları .....	92
Çizelge 4.2. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları .....	93
Çizelge 4.3. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti yağ asidi kompozisyonları bulguları.....	94
Çizelge 4.4. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre bağırsaklarda bakteri grupları ile maya ve küflerin (log CFU g <sup>-1</sup> ) toplam sayımları bulguları.....	95
Çizelge 4.5. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre yem, mide ve bağırsak pH değerlerindeki değişimler. ....	95
Çizelge 4.6. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre bağırsakta tripsin, amilaz, lipaz ve alkalin fosfataz ve mide de pepsin enzimleri bulgularındaki değişimler .....	96
Çizelge 4.7. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre iç organ indekslerindeki değişimler. ....	97
Çizelge 4.8. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre serum biyokimyası bulgularındaki değişimler. ....	98
Çizelge 4.9. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre serum antioksidan analiz bulgularındaki değişimler. ....	98
Çizelge 4.10. Deneme 1.2 süresince gruplara göre hematolojik bulgulardaki değişimler. ....	101
Çizelge 4.11. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları .....	113

Çizelge 4.12. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları.....	114
Çizelge 4.13. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti yağ asidi kompozisyonları bulguları.....	115
Çizelge 4.14. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre bağırsaklarda bakteri grupları ile maya ve küflerin (log CFU g <sup>-1</sup> ) toplam sayımları bulguları.....	116
Çizelge 4.15. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre yem, mide ve bağırsak pH değerlerindeki değişimler.....	117
Çizelge 4.16. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre bağırsakta tripsin, amilaz, lipaz ve alkalin fosfataz ve mide de pepsin enzimleri bulgularındaki değişimler.....	118
Çizelge 4.17. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre iç organ indekslerindeki değişimler. .	119
Çizelge 4.18. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre serum biyokimyası bulgularındaki değişimler.....	120
Çizelge 4.19. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre serum antioksidan analiz bulgularındaki değişimler.....	121
Çizelge 4.20. Deneme 2.2 süresince gruplara göre hematolojik bulgulardaki değişimler.	123
Çizelge 4.21. Deneme 3. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları.....	136
Çizelge 4.22. Deneme 3. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları.....	137
Çizelge 4.23. Deneme 3. sonunda gruplara göre tüm balık kortizol ve hematolojik bulgulardaki değişimler.....	138
Çizelge 4.24. Deneme 4. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları.....	139
Çizelge 4.25. Deneme 4. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları.....	139
Çizelge 4.26. Deneme 4. sonunda gruplara göre tüm balık kortizol ve hematolojik bulgulardaki değişimler.....	140
Çizelge 4.27. Disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) bulguları.....	144

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Ülkemizde iç sularda yetiştiriciliği en çok yapılan balık türü gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) dır (TÜİK, 2015). Dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yoluyla elde edilen üretimin giderek artması ve yoğun üretim yapılması stres ve hastalıklara neden olmakta ve sonuçta ekonomik kayıplar yanında çevre ve tüketici yönünden istenmeyen antibiyotik ve diğer kimyasalların kullanımını arttırmaktadır (Yılmaz ve ark., 2016). Antibiyotikler uzun yıllar boyunca kültür balıklarının yemlerinde hastalıkların tedavisinde ve büyüme performansının artırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır (Serrano, 2005). Ancak günümüzde balık ve diğer hayvanların üretiminde antibiyotiklerin kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır (Ng ve Koh 2016). Mevcut durumda antibiyotik kullanımına getirilen kısıtlamalar nedeniyle alternatif yem katkılarının değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Tedavi amaçla da olsa antibiyotik kullanımı bakterilerin antibiyotiğe olan direncini arttırmaktadır. Bununla birlikte üretimin farklı dönemlerinde balıklardan ve balıkların maruz kaldığı uygulamalardan kaynaklanan sorunlar, üretimi ve işletme ekonomisini doğrudan etkilemektedir. Özellikle işletmelerde stok yoğunluğunun fazla olması, su kalitesindeki değişimler, mevsim değişimlerinden kaynaklanan hastalıklar, balık yetiştiriciliğinin en önemli sorunlar arasındadır (Ellis ve ark., 2002; North ve ark., 2006). Bu nedenle sentetik ürünlere alternatif olarak yeme çeşitli katkı maddelerinin ilave edilmesi günümüzde araştırılmakta olan ve araştırılması gereken güncel bir konudur. Balık yemlerinde antibiyotiklere karşı alternatif katkıları arasında tıbbi bitkiler (Yılmaz ve ark., 2012; 2013; 2014; 2016; Yılmaz ve Ergün 2014), organik asitler (Ng ve Koh 2016), probiyotikler (Mohapatra ve ark., 2013; Pérez - Sánchez ve ark., 2014), algler (Nakagawa ve Montgomery 2007), kitinler (Nakagawa, 2007), bitkisel saponinler (Francis ve Becker 2007) ve nükleotitler (Delbert ve ark., 2007) yer almaktadır.

Balık yemine organik asit ve probiyotik ilavesi de son yıllarda balık yetiştiriciliğinde çalışılmakta olan bir konudur. Yeme ilave edilen organik asitlerin ve probiyotiklerin balıkların büyüme performansına, besin değerine, bağışıklık sistemine ve bakteriyel direnç üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Ng ve ark., 2009; Nayak, 2010; Pérez - Sánchez ve ark., 2014; Ng ve Koh 2016). Organik asitler özellikle probiyotik bakterilerin bağırsak florasındaki miktarını arttırmakta ve bağırsak ekosistemini dengelemektedirler. Ayrıca, sindirim sistemini uyararak ve endojenik enzim salgısını



arttırarak da daha fazla besin emilimini sağlamaktadırlar (Vielma ve Lall, 1997; Sarker ve ark., 2007).

Bu doktora tez çalışmasının:

- ❖ Yeme sinnamik asit, probiyotik (*Bacillus subtilis*) ve/veya sinnamik asit + probiyotik *B. subtilis* ilave edilerek bu katkıların antioksidan ve bağışıklığı arttırıcı etkileri ile test edilen bağışıklık parametrelerinde ve antioksidan enzimlerde artış sağlanması,
- ❖ Katkıların antimikrobiyal ve antagonistik etkileri vasıtasıyla bağırsak florasının düzenlenmesi,
- ❖ Katkıların sindirim enzimleri üzerindeki muhtemel arttırıcı etkileri ile besin kullanımını arttırması ve dolayısıyla büyümede artış olması,
- ❖ Katkıların genel balık sağlığını olumlu etkileyerek *Y. ruckeri* bakterisine karşı direnç sağlaması amaç ve hedefleri arasındadır.

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Hakkında Genel Bilgiler

Kuzey Amerika orjinli olan gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) Salmonidae ailesinin bir üyesidir. Sistematik sınıflandırılması aşağıda verilmiştir:

- Alem: Animalia (Hayvanlar)  
Şube: Chordata (Kordalılar)  
Sınıf: Actinopterygii (Işınsal yüzgeçliler)  
Takım: Salmoniformes  
Aile: Salmonidae (Somongiller)  
Cins: *Oncorhynchus*  
Tür: *O. mykiss*

Alabalıklar karnivor (etçil) beslenmektedirler. Yetiştiriciliği yapılan alabalıkların yemleri de bu doğrultuda hazırlanmaktadır. Yemlerdeki protein ve enerji tüm canlılar için olduğu gibi balıklar için de vazgeçilmez kaynaklar arasındadır. Büyüme dönemine göre alabalık yemleri %35-50 ham protein ve %14–24 yağ (Çizelge 2.1.) içermektedir (Hardy, 2002).

Çizelge 2.1. Gökkuşığı alabalığının gereksinim duyduğu protein ve yağ oranları

	Protein (%)	Yağ (%)
<b>Başlangıç yemi</b>	45–50	16–18
<b>Büyütme yemi</b>	42–48	20–24
<b>Anaç yemi</b>	35–40	14–16

Yemden gelen proteinlerin sindirimi veya hidrolizi sonucunda açığa çıkan serbest aminoasitler bağırsak kanalı boyunca vücuda absorbe olur (Hardy, 2002). Devamında kan yoluyla organ ve dokulara taşındıktan sonra dokularda yeni protein sentezleri için kullanılmaktadırlar (Hardy, 2002; Wilson, 2002). Balıklarda büyüme, üreme ve hasarlı bölgelerin tedavisi için devamlı olarak protein veya amino asit tüketimi şarttır (Wilson, 2002). Gökkuşığı alabalığının optimum gelişim ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli olan esansiyel aminoasitler Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Wilson, 2002).

Çizelge 2.2. Gökkuşuğu alabalığının esansiyel amino asit gereksinimleri

Aminoasit	% Protein
Arjinin	3,30
Histidin	1,60
İzolösin	2,40
Lösin	4,40
Lizin	3,70
Metiyonin+Sistin	2,20
Fenilalanin	4,30
Treonin	3,50
Triptofan	0,60
Valin	3,10

Yemden gelen diğer bir enerji kaynağı da yağlar ve onların sindirilmesi sonucu oluşan yağ asitleridir ve balık gelişimi, sağlığı, hücre membran yapısının korunması ve fonksiyonlarının devamı için önemlidirler (Sargent ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda gökkuşuğu alabalıklarının yemlerinde linoleik asite (18:3n-3) % 0,7–1,0 ve n-3 HUFA da % 0,4–0,5 oranlarında ihtiyaç duydukları bildirilmiştir (Sargent ve ark., 2002; Hardy, 2002). Alabalıklar deniz balıklarının aksine linoleik asiti uzatarak ve doymamış hale getirerek eikosapentaenoik (EPA) (C20:5) ve dokosaheksaenoik (DHA) (C22:6) asitleri üretebilirler (Hardy, 2002). Ayrıca alabalıklar fosfolipit ve prostaglandin sentezi için az miktarda araşidonik asit (C20:4) ihtiyacına da sahiptirler (Cho ve Cowey, 1991).

Alabalıklar serin ve temiz tatlı akarsuları sevmekle birlikte günümüzde hem göllerdeki tatlı sularda hemde denizlerdeki kafeslerde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yiğit ve Aral 1999; Tidwell, 2012). Alabalık yetiştiriciliği için gerekli olan su kriterleri Çizelge 2.3.'de verilmiştir (MacIntyre ve ark., 2008; FAO 2016). Türkiye'de 2015 yılında iç su balık üretimi toplam 101,455 ton olarak gerçekleşmiştir ve bu üretimin yaklaşık %99,71 (101,166 ton)'i gökkuşuğu alabalığına aittir (TÜİK, 2015). Ülkemizde 2015 yılında yetiştiricilik yoluyla yapılan deniz balıkları (alabalık üretimi hariç) üretiminin yaklaşık 132,002 ton (TÜİK, 2015) olduğu gözönünde bulundurulduğunda, gökkuşuğu alabalığı üretiminin toplam balık üretimimizin %42 sini kapsadığı görülmektedir. Üretim miktarlarına ve ticaret hacmine baktığımızda ülkemiz için önemi bir tür olan gökkuşuğu alabalığının yoğun üretimi nedeniyle balıklar bir çok hastalığa da açık hale gelmektedir.

Alabalıklarda görülen hastalıklar Furunculosis (etken: *Aeromonas salmonicida*), bakteriyel böbrek hastalığı (etken: *Renibacterium salmoninarum*), Yersiniozis (*Yersinia ruckeri*), streptokokkozis (etkenler: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*), bakteriyel solungaç hastalığı (*Flavobacterium branchiophilum*), bakteriyel soğuk su hastalığı (*F. psychrophilum*), laktokokkozis (*Lactococcus piscium* ve *Lactococcus garvieae*), vagococcozis (*Vagococcus salmoninarum*), kış hastalığı (*Pseudomonas anguilliseptica*), mikobakteriosiz (*Mycobacterium marinum*), edwardsiellozis (*Edwardsiella tarda*), vibriozis (*Listonella anguillarum*, *Vibrio ordalii*), staphylococcozis (*Staphylococcus warneri*), nocardiozis (*Nocardia asteroides*) ve ayrıca *Carnobacterium piscicola*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia vulneris*, *Janthinobacterium lividum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Moritella viscosa*, *Photobacterium damsela* ssp. *damsela*, *Plesiomonas shigelloides*, *Serratia marcescens* ve *Serratia plymuthica* bakterilerinin neden olduğu hastalıklardır (Nicky, 2004). Doktora tezi kapsamında *in vivo* besleme denemesi sonunda balıklar *Y. ruckeri* bakterisinin neden olduğu kızıl ağız hastalığı (Yersiniozis) ile infekte edilmişlerdir.

## 2.2. Yersiniozis (Enterik Kızıl Ağız Hastalığı) Hakkında Genel Bilgiler

Alabalık yetiştiriciliği yapan işletmelerde Yersiniozis (Enterik kızıl ağız hastalığı), özellikle yavru kayıplarına neden olan bakteriyel bir hastalık olup septisemi ile seyretmektedir (Altun ve Diler 1999). Genellikle tatlısularda görülen bir hastalık olmakla birlikte ülkemizde Karadeniz de kafeslerde kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında da ölüme neden olduğu bildirilmiştir (Karataş, 2004). Yetiştiricilik şartlarında balıklarda stresle ilişkili ortaya çıkan akut ve kronik olarak seyreden bu hastalık, akut epizootik enfeksiyonlarında %70'e varan ölümlere neden olmaktadır (Timur ve Timur 2003). Ülkemizde de alabalıklarda ölümlere neden olan bu bakterinin önlenmesine yönelik çalışmalar önemlidir. Dünyada alabalıklarda Yersiniozis hastalığının önlenmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Organik asit ile ilgili çalışmalar henüz çok yeni olup sadece bir çalışmada probionik asit, formik asit ve silikon dioksit karışımının alabalıklarda hemoglobin ve lizozim miktarını arttırdığı ve *Y. ruckeri* ile infekte alabalıkların yaşama oranının organik asitle beslenen balıklarda daha yüksek bulunmuştur (Jaafar ve ark., 2013).

Hematolojik, serum biyokimyasal ve immunolojik analizlerin, balıklarda hastalık dönemlerinde değişim gösterdiği ve hastalıkların balıklar üzerindeki olumsuz etkisinin tespit edilmesinde yaygın kullanımı olduğu bilinmektedir (İspir ve ark., 2004). Yersiniozis görülen gökkuşağı alabalıklarında hasta balıkların RBC, toplam lökosit, Hgb, Hct, toplam

protein, toplam albumin miktarlarında azalmalar görülürken, yüzde küçük lenfosit oranlarında artış, yüzde büyük lenfosit oranlarında azalma, yüzde nötrofil oranlarında akut dönemde artış, subakut dönemde azalma ve trombosit miktarında artış görülmüştür (Altun ve Diler 1999). Yapılan çalışmalardan da görüleceği gibi kan parametrelerinin infekte balıklarda önemli değişimler yaptığı tespit edilmiştir. Doktora çalışması kapsamında balıklar organik asit veya probiyotik ile beslendikten sonra *Y. ruckeri* ile infekte edilmiş ve kan parametrelerindeki değişimler araştırılmıştır.

Bu güne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında balık yemlerinde sinnamik asitin daha önce kullanılmadığı görülmektedir. Ayrıca sinnamik asitin bazı balık patojenleri üzerinde etkili olduğu bildirilse de *Y. ruckeri* üzerindeki etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma kapsamında yeme ilave edilen *B. subtilis* bakterisinin alabalıklarda daha önce hastalık direnci ve bağışıklık parametrelerini arttırmada etkili olduğu bildirilmiştir (Newaj - Fyzul ve ark., 2007). Bu doğrultuda sinnamik asit dışında çalışmada sinnamik asit + *B. subtilis* in birlikte etkisinde araştırılmıştır.

Çizelge 2.3. Alabalık yetiştiriciliğinde uygun görülen su parametreleri (MacIntyre ve ark., 2008; FAO 2016)

ÖZELLİKLER	DEĞERLER	AÇIKLAMA
Sıcaklık (°C)	<20	
pH	6,5-8,5	
Oksijen (O <sub>2</sub> )	9,2-11,5 mg/lt >7 mg/lt	Doyma derecesine yakın Yoğun üretim için uygun
Amonyak (NH <sub>3</sub> )	<0,02 mg/lt	
Zn	<0,05 mg/lt	
Fe	<1 mg/lt	
Mn	<0,01 mg/lt	
Nitrit (NO <sub>2</sub> )	<0,1 mg/lt	
Nitrat (NO <sub>3</sub> )	1 mg/lt	
Cl <sub>2</sub>	<0,003 mg/lt	
Cl <sup>-</sup>	>4 mg/lt	
Karbondioksit (CO <sub>2</sub> )	5-10 mg/L	
Bakır	<0,006 mg/lt <0,03 mg/lt	Yumuşak sular için Sert sular için
Aliminyum	<0,075 mg/lt	-

### 2.3. Organik Asitler Hakkında Genel Bilgiler

Organik asitler bir veya daha fazla karboksil grubu olan organik bileşiklerdir. Bunlar, doymuş düz zincirli monokarboksilik asitleri (C1–C18) ve türevleri olan doymamış (sinamik, sorbik), hidroksilik (sitrik, laktik), fenolik (benzoik, sinamik, salisilik) ve çokkarboksilik (azelaik, sitrik, sukkinik) asitleri içermektedirler (Cherrington ve ark., 1991). Bu asitler genel olarak R-COOH molekül yapısına sahip olup sıklıkla kısa zincirli yağ asitleri, uçucu yağ asitleri veya zayıf karboksilik asitler olarak adlandırılmaktadırlar (Ng ve Koh 2016).

Asitlerin çoğu zayıf asit olup hidrojen iyonlarına ( $H^+$ ) ve anyonlarına ( $A^-$ ) ayrışan asit sayısı oldukça azdır. Asitlerin kuvveti çözünme katsayıları ( $K_a$ ) ile yakından ilişkilidir ve logaritmik olarak  $pK_a$  ( $= -\log_{10} (K_a = [H^+][A^-]/[HA])$  = asit ayrışma sabiti) şeklinde ifade edilmektedir (Ng ve Koh 2016).  $pK_a$  değeri arttıkça asidin ortama bıraktığı hidrojen iyonlarının sayısı da artmaktadır. Bu nedenle  $pK_a$  değeri büyük olan asitler diğer asitlere göre daha kuvetlidir. Dünyada en fazla bilinen organik asitlerin genel özellikleri Çizelge 2.4.'de verilmiştir (Mroz, 2005; Ng ve Koh 2016).

Çizelge 2.4. Dünya da en çok bilinen organik asitler

Organik Asit	Kimyasal Formülü	pKa Değerleri	Moleküler Ağırlık g/mol	Form	Tat
Formik	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,75	46,03	Sıvı	Mayhoş
Asetik	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,6	60,05	Sıvı	Mayhoş
Propionik	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,88	74,08	Yağimsı Sıvı	Mayhoş
Butirik	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4,81	88,12	Yağimsı Sıvı	Kokuşmuş
Laktik	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3,86	90,08	Sıvı	Ekşi Süt
Sorbik	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4,76	112,1	Katı	Tatlı Buruk
Fumarik	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	3,02, 4,76	116,1	Katı	Kokusuz
Malik	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3,40, 5,1	134,1	Katı	Elmamsı
Sitrik	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	3,13, 4,76, 6,49	192,1	Katı	Kokusuz
<b>Sinamik</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>4,44</b>	<b>148,16</b>	<b>Katı</b>	<b>Balımsı</b>

Organik asitler farklı metabolik yollar ve koşullarda çeşitli bakteri türleri ile karbondhidratların mikrobiyal fermantasyonu yoluyla üretilmektedirler. Bazı daha düşük molekül ağırlıklı organik asitler (örneğin asetik, propiyonik ve bütirik asitler) anaerobik

mikrobik topluluklar tarafından yüksek konsantrasyonlarda insanlar ve hayvanlarda görülen kalın bağırsaklarda da oluşabilmektedir (Cummins ve ark., 1987; Macfarlane ve Macfarlane 2003).

Kısa zincirli organik asitler (C1-C7) doğal olarak bitkilerde veya hayvan dokularında bulunmaktadır. Bununla birlikte, gıda ve yem sektöründe ticari olarak kullanılan çoğu organik asit, sentetik olarak üretilmektedir. Organik asitler aynı zamanda potasyum (K), sodyum (Na), kalsiyum (Ca) gibi mineraller ile birleşerek asitlerinin tek veya çift tuzlarına dönüşebilirler (Ng ve Koh 2016).

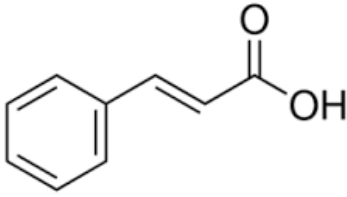
Yağda eriyebilen zayıf organik asitler ve tuzları genel olarak güvenli maddeler olarak kabul edilir ve yüzyıllarca gıdalar ve içeceklerde koruyucu olarak kullanılmışlardır (Russell ve Gould 2003). Organik asitler Avrupa Birliği tüzüğünde hayvan üretiminde izin verilen yem katkı maddeleri olarak yer almaktadırlar. Organik asitler ve tuzları veya bunların kombinasyonları hayvan besiciliğinde antibiyotiklere alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Alp ve ark., 1999; Partanen ve Mroz 1999). Hayvancılık yemlerinde organik asitlerin ticari karışımları Salmonella türleri gibi patojenik bakterileri kontrol altına almak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Immerseel ve ark., 2002).

2015 yılında hayvan yemi endüstrisinde kullanılan asitleştiricilerin küresel piyasa değerinin yaklaşık 1.0 milyar € olduğu tahmin edilmektedir (FEFANA, 2014). Hayvan yemlerinde en çok kullanılan organik asitlerin başında propionik asit yer almaktadır ve ayrıca fumarik, formik ve laktik asitler ve/veya bunların tuzları da kullanılmaktadır. Gıda güvenliği ve hayvan sağlığı açısından en büyük pazar Avrupa'nın (% 41) olup, takiben Birleşik Devletler (% 24) ve Japonya (% 12) gibi gelişmiş ülkeler gelmektedir. Bu durumu destekler nitelikte hayvansal beslemede formik asit/tuz için dünya çapındaki talebin yaklaşık % 67'sinin AB ülkelerinden geldiğini görmekteyiz (FEFANA, 2014; Ng ve Koh 2016). Avrupa'da hayvan yemlerinde büyümeyi teşvik edici antibiyotiklerin kullanılmasının yasaklanması ve antibiyotiklerin dünyanın geri kalanında hastalıklardan koruyucu ajanlar olarak kullanılmasına ilişkin düzenlemelerin giderek sıkılaşması, gelecekte organik asitler gibi alternatiflerin daha fazla kullanılacağına bir göstergesidir (Ng ve Koh 2016).

#### **2.4. Sinnamik Asit Hakkında Genel Bilgiler**

Sinnamik asit (E)-3-phenylprop-2-enoic acid) (Şekil 2.1.) bir organik asit olup bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Ayrıca sinnamik asit anti-fungal, anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-mutajenik, kanser önleyici ve anti-inflamatuar etkilere

sahiptir (Ivanovska ve ark., 1995; Liu ve ark., 1995; Fernandez ve ark., 1998; Said ve ark., 2004; Chamkha ve ark., 2001; Sova 2012; Pontiki ve ark., 2014). Bu özellikleriyle de gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Sinnamik asitin bağışıklık sistemi üzerine etkisinin ise makrofajları aktive ederek olduğu bildirilmiştir (Ivanovska ve ark., 1995). Ancak bu çalışma farelerde yapılmış olup sinnamik asitin balıklar üzerindeki etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Günümüzde antibiyotik, hormon ve diğer sentetik kimyasalların balık yemlerinde kullanımı insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır (Harikrishnan ve ark., 2011). Bu nedenle balık yemlerinde organik asit, esansiyel yağ, tıbbi bitki ve baharat kullanımı günceldir (Ng ve ark., 2009; Citarasu, 2010). Özellikle kullanılan katkı maddelerinin U.S. Food and Drug Administration, Council of Europe veya FAO/WHO Committee on Food Additives tarafından da güvenli katkı olarak kabul görmüş olması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız sinnamik asit U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından kullanımı uygun bir katkı maddesidir (Food, 2010).



Şekil 2.1. Sinnamik asit

## 2.5. Yeme İlave Edilen Organik Asitlerin Etki Şekli ve Etkileri

### 2.5.1. Organik Asitlerin Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

Eskiden lipofilik (yağda çözünebilir) zayıf asitlerin antimikrobiyal aktiviteleri, substrat moleküllerin (aminoasitler, organik asitler, fosfat vs.) hücre içlerine taşınmasını engelleyen membran fonksiyonunun pertürbasyonu (sentez ve taşıma bozukluğu) ile açıklanmaktaydı (Freese ve ark., 1973). Organik asitlerin, mikrobiyal büyümeyi sınırlandırdığına inanılan diğer mekanizmalar ise Cherrington ve ark. (1991) ile Booth ve Stratford (2003) tarafından incelenmiştir. Bu mekanizmalara bakıldığında da yağda çözünebilir zayıf asitlerin en belirgin etki şekli; hücre dışı pH değerinin ortama yayılan hidrojen iyonları (protonlar) sayesinde doğrudan asitlendirilmesi ile gerçekleşmektedir. Ancak, genel görüşe göre, bu asitlendiricilerin çoğunlukla etki şekli, bakterilerin hücre membranlarının içerisinden geçtikten sonra, sitoplazmik pH değerini düşürmeleriyle ilişkilendirilmektedir (Ng ve Koh 2016).



Çoğu bakteri türünde, optimal büyüme için özel pH gereksinimleri bulunmaktadır. Örneğin, bakteriler aşırı asidik durumlarda büyüyemezler ( $\text{pH} < 4.5$ ) (Ng ve Koh 2016). Organik asitler mikroplar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini, çevrenin pH değerini doğrudan düşürerek gerçekleştirmektedirler. Bunu ortamdaki hidrojen iyonunun miktarını artırarak yapmaktadırlar. Dolayısıyla aside duyarlı bakterilerin büyümesini engellemekte ve/veya yavaşlatmaktadırlar. Asetik, sitrik, benzoik, sorbik ve laktik asit gibi zayıf organik asitler genellikle, mikrobiyal büyümeyi sınırlandırmak için yiyecek ve içeceklerin pH değerini düşürmek üzere kullanılmaktadır (Stratford ve Eklund 2003).

Şu an yaygın olarak kabul edilen görüşe göre, organik asitlerin hem bakteristatik hem de bakterisidal etkilerini kapsayan antimikrobiyal özellikleri, organik asitlerin bakterinin yarı geçirgen membranından geçme ve pH nötr sitoplazma içerisinde dağılıma özelliklerine bağlı olduğu bilinmektedir (Cherrington ve ark., 1991; Booth ve Stratford 2003). Farklı moleküler yapılarına rağmen (Çizelge 2.4.), tüm organik asitlerin, mikroorganizmalara karşı benzer bir etki şekline sahip olduğu görülmektedir. Organik asitlerin, çoğunlukla mikroorganizmaları öldürmek için en etkili yapı olan ayrışmamış yapıdayken düşük pH seviyesinde daha etkili olduğu bilinmektedir (Brul ve Coote 1999; Lambert ve Stratford 1999). Bunun nedeni, bir organik asidin ayrışmamış yapısının lipofilik olması ve bir bakterinin hücre membranında pasif olarak difüze olabilesidir. Difüzyon işlemi sitoplazma membranının her iki tarafında ayrışmamış asit konsantrasyonu eşitleninceye kadar devam etmektedir (Cherrington ve ark., 1991; Lambert ve Stratford 1999). Sonuç olarak hücre içerisinde aşırı protonların birikimi, sitoplazmik pH değerini düşürmekte ve dolayısıyla hücre enzimlerinin (Warth, 1991) özellikle de enerji metabolizmasına katkı sağlayan piruvat dekarboksilaz enziminin baskılanması ile bakteriyel hücre metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır (Sava, 2011; Ng ve Koh 2016).

pH değerinin büyüme için optimal fizyolojik aralığın altına düştüğü durumlarda, hücre ölümü gerçekleşmektedir (Smigic ve ark. 2009). Sitoplazmik pH değerinin düşmesi, elektrokimyasal gradientin nötrlenmesine neden olabilmektedir. Besin maddelerinin aktif taşınması için gerekli olan plazma membranındaki pH gradienti ( $\text{DpH}$ ) buna örnek olarak verilebilir (Ng ve Koh 2016). *E. coli*, *Salmonella* ve *Campylobacter* (Dibner ve Buttin 2002) gibi trans-membranöz pH gradyantlarındaki değişiklikleri tolere edemeyen bakteriler, hücresel strese maruz kalır ve en sonunda ölmektedirler (Jensen, 2001). Büyüme için optimal fizyolojik aralıktaki hücre içi pH değerini yenilemek ve fonksiyonel makro molekülleri sürdürmek için, bakteriyel hücre, membrana bağlı  $\text{H}^+$ -ATP aracılığıyla asitler

tarafından salınan aşırı protonları boşaltmaya zorlanmaktadır. H<sup>+</sup>-ATP tarafından protonun boşaltılmasında, adenosin trifosfat (ATP) formunda yeterli metabolik enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır (Holyoak ve ark., 1996). Bu yüzden hücre ATP'nin boşalması sonucunda bakteri en sonunda ölmektedir (Warth, 1991; Ricke, 2003).

ATP'nin boşaltılması, hücre büyümenin engellenmesi veya öldürülmesine neden olan yegane mekanizma değildir. Çünkü, protonun kaldırılması aynı zamanda, düşük pH koşullarında organik asitlerin büyüme inhibisyon mekanizmalarından da sorumlu olan sitoplazma içerisindeki zayıf asit anyonlarının birikmesine de neden olmaktadır (Lambert ve Stratford 1999; Ng ve Koh 2016). Organik asit anyonlarının birikimi, nükleik asitler (Cherrington ve ark., 1990), protein, lipid ve karbonhidratların yanı sıra (Jensen 2001), sitoplazma içerisindeki enzim aktivitesi (dekarboksilaz ve katalaz) ve besin maddesi taşıma sistemleri gibi (Partanen ve Mroz 1999; Ng ve Koh 2016) makromoleküllerin sentezini de engelleyebilmekte ve nihayetinde hücre ölümüne neden olabilmektedir (Ng ve Koh 2016).

Sitoplazma içerisindeki asit anyonlarının önemli oranda birikimi aynı zamanda, bakteriyel hücreler üzerinde hiperozmotik baskıya neden olarak bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir (Roe ve ark. 1998). Sitoplazmada bulunan yüksek anyon konsantrasyonunun, ozmotik basıncı artırarak, hücre üzerindeki turgor basıncını artırma potansiyeli de bulunmaktadır (Kroll ve Booth 1983). Hücre, turgor basıncını sabit bir seviyede tutabilmek için diğer anyon havuzlarını düşürmektedir. Örneğin, hücre içi glutamatlar bu birikimi dengelemektedir (Roe ve ark. 1998). Bu sayede, anyon basıncının perturbasyonu, büyümeyi önleyici etkilere katkıda bulunarak hücre ölümüne neden olabilmektedir (Roe ve ark. 1998).

### **2.5.2. Organik Asitlerin Balıkların Bağırsak Florası Üzerine Etkileriyle İlgili Yapılmış Çalışmalar**

Yeme ilave edilen organik asitlerin, tuzlarının ve/veya organik asit karışımlarının balıkların bağırsak florasına etkileriyle ilgili bazı çalışmalar bildirilmiştir (Ng ve Koh 2016). Örneğin, organik asit takviyeli diyetlerle beslemenin balıkların dışkılarında ve bağırsak yüzeylerindeki üreyebilir bakteri miktarının azaldığı rapor edilmiştir (Ng ve ark., 2009). Benzer olarak, organik asitlerin bağırsak mikrobiyotası üzerine antimikrobiyal etkileri pisi balığı (Park ve ark., 2011), beyaz pasifik karidesi (Silva ve ark., 2013; 2016) ve kırmızı tilapia (Koh ve ark., 2016) balıklarında da çalışılmıştır. Bu çalışmalarda yeme ilave edilen organik asitlerin balık ve karides bağırsaklarında genel olarak sağlığa zararlı

bakteri popülasyonları (*Vibrio* spp. gibi) üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu görülmüştür (Park ve ark., 2011; Silva ve ark., 2013, 2016; Chuchird ve ark., 2015).

### **2.5.3. Organik Asitlerin Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı Üzerine Etki Mekanizmaları**

Yeme ilave edilen organik asitlerin ve/veya onların tuzlarının balıkların yemden gelen besinleri kullanımı ve büyümeleri üzerindeki olumlu etkileri; birinci aşamada yem ve yem içeriğindeki makro ve/veya mikro besin kaynaklarının organik asitler tarafından korunmasıyla gerçekleşmektedir (Ng ve Koh 2016). Çünkü organik asitler bakteri, mantar ve mayalar ile mücadelede yemlerin ve yem bileşenlerinin korunmasında kullanılmaktadır (Ricke, 2003; Skrivanova ve ark., 2006; van Dam, 2006).

Yeme ilave edilen organik asitler yem pH'ını düşürerek zararlı bakteri gelişimini ve depolama esnasında mantarlar tarafından üretilen toksik metabolit (örneğin mikotoksin) oluşumunu önlemeye yardımcı olmaktadır (Ng ve Koh 2016). Özellikle akuatik hayvanlar tarafından yemlerden az miktarda mikotoksin alınması dahi ciddi beslenme ve sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu nedenle, yemlerin asidifikasyon ile hijyenik kalitesinin artırılması depolama esnasındaki besin kayıplarını önlemede yardımcı olmaktadır. Ayrıca yem hijyeninin artırılması dışında organik asitler yemdeki besin içeriklerinin tamponlama kapasitesini azaltırlar (Ng ve Koh 2016). Bu durum, özellikle genç hayvanlarda daha iyi besin sindirimini sağlayan optimal bağırsak pH'ını temin ettiği için önemlidir (Metzler ve Mosenthin 2007).

Karasal hayvanlarda organik asitler, proteolitik enzim aktivitesini destekleyen mide pH'ını düşürür, böylece protein sindirilebilirliği ve hayvan performansını arttırmaktadırlar (Roth ve Kirchgessner 1998; Dibner ve Buttin 2002). Ayrıca, yeme ilave edilen organik asitler mide boşaltım süresini uzatarak proteinlerin daha fazla hidroliz olmasını sağlamakta ve ince bağırsaktan emilen besin miktarını arttırmaktadırlar (Ng ve Koh 2016). Bu durum, yetişkinlere kıyasla pankreatik enzim salgısı ve hidroklorik asit üretimi yetersiz olan genç hayvanlarda daha belirgindir (Freitag, 2007). Mide asiditesinin düşmesinin diğer bir yararlı etkisi, bitki yemi katkı maddelerinde fitat fosforundan yararlanılabilirliğinin artırılmasıdır (Dibner ve Buttin, 2002). Monogastrik hayvanlarda bitkisel hammaddelerin içeriğindeki organik fosforun büyük bir kısmı sindirim sisteminde fitaz aktivitesinin eksikliği nedeniyle sindirilemeyen fitik asit veya fitat formundadır. Organik asitlerin eklenmesi, düşük pH ortamında daha verimli olan mikrobik fitaz aktivitesini indükleyerek fitat fosforunun kullanımını artırabilir (Dibner ve Buttin, 2002; de Wet, 2005).

Yeme organik asit ilavesi ile bağırsak pH'ındaki meydana gelebilecek azalmalar; yemden gelen minerallerin çözünebilirliğini attırarak bağırsaklardan daha fazla emilmelerini sağlamaktadır (Ng ve Koh 2016). Ayrıca, zayıf asitlerin anyonları şelatlayıcı ajanlar gibi, çeşitli katyonları bağlayarak, bağırsak boyunca mineral ve asit kompleksleri oluşturmakta ve bağırsak hücreleri tarafından mineral emilimini arttırmaktadır (Ravindran ve Kornegay 1993).

Yemden gelen besin maddelerinin kullanılabilirliğini arttırmada organik asitler tarafından gerçekleştirilebilecek bir diğer olası etki şekli, mide-bağırsak sistemindeki mukoza çoğalma aktivitesinin doğrudan uyarılması yoluyla (Tappenden ve McBurney 1998). Organik asitlerin bağırsak epitel hücrelerinin büyümesini uyarması besin emilimi kapasitesinin artmasını sağlamaktadır (Topping ve Clifton 2001). Tavuk yemlerinde organik asit ilavesi, onikiparmak ve ince bağırsaktaki villusların uzunluğunu arttırmış ve barsak mukozasındaki kas tabakası kalınlığını da ince bağırsağın tüm bölümlerinde azaltmıştır (Adil ve ark., 2010). Mide-bağırsak sisteminin yapısındaki bu değişiklikler, ince bağırsaktan besin emilimini kolaylaştırabilir ve böylece büyüme performansını geliştirebilmektedir (Adil ve ark., 2010; Samanta ve ark., 2010).

Sonuç olarak, yemden gelen besin maddelerinin kullanımı, sindirim sistemi içindeki zararlı bakterilerin kolonizasyonunu engelleyebilen organik asitlerin güçlü antimikrobiyal etkinliğine bağlanabilir (Kluge ve ark., 2006). Zararlı bakterilerin bağırsak florasındaki miktarının azaltılması bu bakteriler tarafından besin maddelerinin kullanımının engellenerek besin maddelerinden balığın yararlanmasına olanak sağlamaktadır (Partanen ve Mroz 1999; Dibner ve Buttin 2002; Adil ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda balık yemlerine ilave edilen organik asitlerin besin sindirimini ve büyüme performansını etkilediği görülmüştür (Ng ve Koh 2016). Özet olarak organik asitlerin balıklarda besin kullanımı ve sonuç olarak büyüme performansını arttırıcı etkileri:

- ❖ Mide pH'ını düşürerek pepsin aktivasyonunu arttırmaları,
- ❖ Yem ve bağırsak pH'ını düşürerek mineral emilimini arttırmaları,
- ❖ Bağırsaktaki çeşitli katyonları bağlayan şelatlayıcı ajanlar gibi davranarak mineral emilimini arttırmaları,
- ❖ Bağırsaklardaki zararlı bakterilerin kolonileşmesini önleyerek besinlerden yararlanılabilirliği arttırmaları olarak açıklanabilir.

#### **2.5.4. Organik Asitlerin Balıkların Yeme olan Tepkisi Üzerine Etkileri**

Balık yemlerine ilave edilen bazı organik asitlerin yemin lezzetini arttırabildiği bilinmektedir. Tilapia (*Tilapia zillii*) balıklarında yapılan bir çalışmada yeme ilave edilen sitrik ve malik asitin balıkların yeme olan tepkisini arttırmada çok etkili olduğu görülmüştür (Adams ve ark., 1988). Nil Tilapia balıklarında (*Oreochromis niloticus*) yeme ilave edilen sitrik ( $10^{-2}$ - $10^{-6}$  M (Molar)), propionik ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$  M) ve laktik asitin ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$  M) balıkların yeme olan ilgisini önemli oranda arttırdığı,  $10^{-3}$  M asetik ve propionik asit ilavesinin ise yeme olan ilgiyi azalttığı bulunmuştur (Xie ve ark., 2003). Beyaz pasifik karidesi yemine 2g/kg oranında ilave edilen organik asitlerden (format, asetat, propiyonat, laktat, bütirat ve sitrat) propiyonat ve bütiratın yemin cezbediciliğini arttırdığı bildirilmiştir (Silva ve ark., 2013). Ancak, yüksek oranda ( $\geq 50$  g/kg) organik asit (sitrik ve sukkinik) kullanımı yem lezzetini olumsuz etkilemekte ve yem tüketimini düşürmektedir (Fauconneau, 1988; Sugiura ve ark., 1998).

#### **2.5.5. Organik Asitlerin Yem, Mide ve Bağırsak pH'ı Üzerine Etkileri**

Yeme ilave edilen organik asitlerin balıkların mide ve bağırsak pH değerleri üzerine etkileri Çizelge 2.5.'de verilmiştir. Yapılan çalışmalarda, yem pH değeri üzerinde etkili olan organik asitlerin her zaman mide ve/veya bağırsak pH değeri üzerinde etkili olmadığını göstermiştir (Ng ve Koh 2016). Bu durum balıkların normal bağırsak pH'sını korumak için endojen gastrik asit salınımını düzenleyebilme etkisiyle açıklanmaktadır (Sugiura ve ark., 2006). Daha detaylı bakıldığında yemdeki organik asitin,  $H^+ / K^+ - ATP$ azın ve  $Na^+ / bikarbonat$  taşıyıcı membran proteinlerinin mRNA ekspresyonunu değiştirmedeği ve mide asidinin salgılanması ve düzenlenmesiyle ilişkili hormonlardan gastrin ve somatostatinlerin mRNA yoğunluğu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Sugiura ve ark., 2006).

Çizelge 2.5. Organik asitlerin yem, mide ve bağırsak pH'ı üzerine etkileri

Organik Asit	g/kg	Balık Türü	pH değişimi **	Mide	Ön Bağırsak	Orta Bağırsak	Arka Bağırsak	Kaynaklar
Ca-laktat	15	<i>Sciaenops ocellatus</i>	-0,16	-0,01		BE		Castillo ve ark. (2014)
	30		-0,25	-0,25		BE		
Ca-laktat	15		-0,13	-0,32		+0,66a		
PDF	7,5		-0,18	-0,21		+0,21a		
PDF	15		-0,36	-0,18		+0,09a		
Citrik asit	7,5		-0,52	-0,18		+0,64a		
Citrik asit	15		-0,79	-0,29		+0,81a		
PDF	1	<i>Oreochromis niloticus</i>	BE	-0,14	-0,07	-0,00	-0,01	Abu Elala ve Ragaa (2015)
PDF	2		BE	-0,38*	-0,23*	-0,03	-0,11	
PDF	3		BE	-0,47*	-0,45*	-0,05	-0,22	
OAK	1	<i>Oreochromis sp.</i>	-0,06	-0,11		-0,08a		Ng ve ark. (2009)
OAK	2		-0,10	-0,12		-0,32a		
OAK	3		-0,15	-0,22		-0,53a*		
PDF	2		-0,14	-0,20		-0,33a		
OAK	5	<i>Oreochromis sp.</i>	-0,24	-0,03		-0,16a*		Koh ve ark., (2016)
OAK	10		-0,48	-0,01		-0,23a*		
Sitrik asit	30	<i>Labeo rohita</i>	-1,01	-0,00		-0,83a*		Baruah ve ark. (2005)
Asetik asit	50	<i>O. mykiss</i>	-1,00	-0,50	-0,00	-0,00	-0,10	Sugiura ve ark. (2006)
Formik asit	4 mL/k	<i>O. mykiss</i>	-0,50	BE	+0,16		+0,15*	Vielma ve Lall (1997)
	10 mL/k		-1,00	BE	+0,31		+0,41*	
Sitrik asit	20	<i>O. mykiss</i>	-1,75	BE		-0,37b		Sugiura ve ark. (1998)
Sitrik asit	50		-2,43	BE		-0,88b		

\*\*Yemde kontrole göre değişimi göstermektedir, PDF: Potasyum diformat, OAK: Organik asit karışımı, BE: Belirlenmedi \*Kontrole göre istatistiksel açıdan farklı olan grupları göstermektedir, a;bütün bağırsak üzerine, b;bağırsak materyali üzerine etkileri göstermektedir

### **2.5.6. Organik Asitlerin Sindirim Enzimleri Üzerine Etkileri**

Bu güne kadar sucul canlılarda organik asitlerin sindirim enzimleri üzerine etkileriyle ilgili çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin, tilapia balıklarında yapılan bir çalışmada sitrik asitin 10g/kg oranında yeme ilavesi ile mide proteaz aktivitesinde artış sağlanmıştır (Li ve ark., 2009). Ayrıca, aynı çalışmada sitrik asitin mide pH'ında meydana getirdiği değişiklikler sayesinde hepatopankreas ve mide amilaz aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum pankreası uyaran bir hormon olan kolesistokinin salınımının artması ve sonuçta pankreasın sindirim enzimlerini salgılayan ekzokrin bölümünü uyarması ile açıklanabilir.

Ayrıca bu konuda yapılan bir derleme çalışmasında (Ng ve Koh 2016);

- ❖ Organik asitler tarafından mide asitlenmesinin midede pepsin enziminin üretilmesini uyaran sekretin hormonunun konsantrasyonunu artırabileceği hipotezi ileri sürülmüştür.
- ❖ Bununla birlikte organik asit içerikli yemlerle beslenen balıklarda bağırsak sindirim enzimlerinden lösin-aminopeptidaz ve fosfatazlar da artış görülmüştür.
- ❖ Fosfor hidrolizinin hem asit hem de alkalın fosfatazlardan etkilendiği göz önüne alındığında, organik asitler sayesinde artan enzim aktiviteleri ile mineral sindirilebilirliğinin de arttırılabileceği sonucuna varılmıştır.

### **2.5.7. Organik Asitlerin Alabalıklar Üzerine Etkileriyle ilgili Yapılmış Çalışmalar**

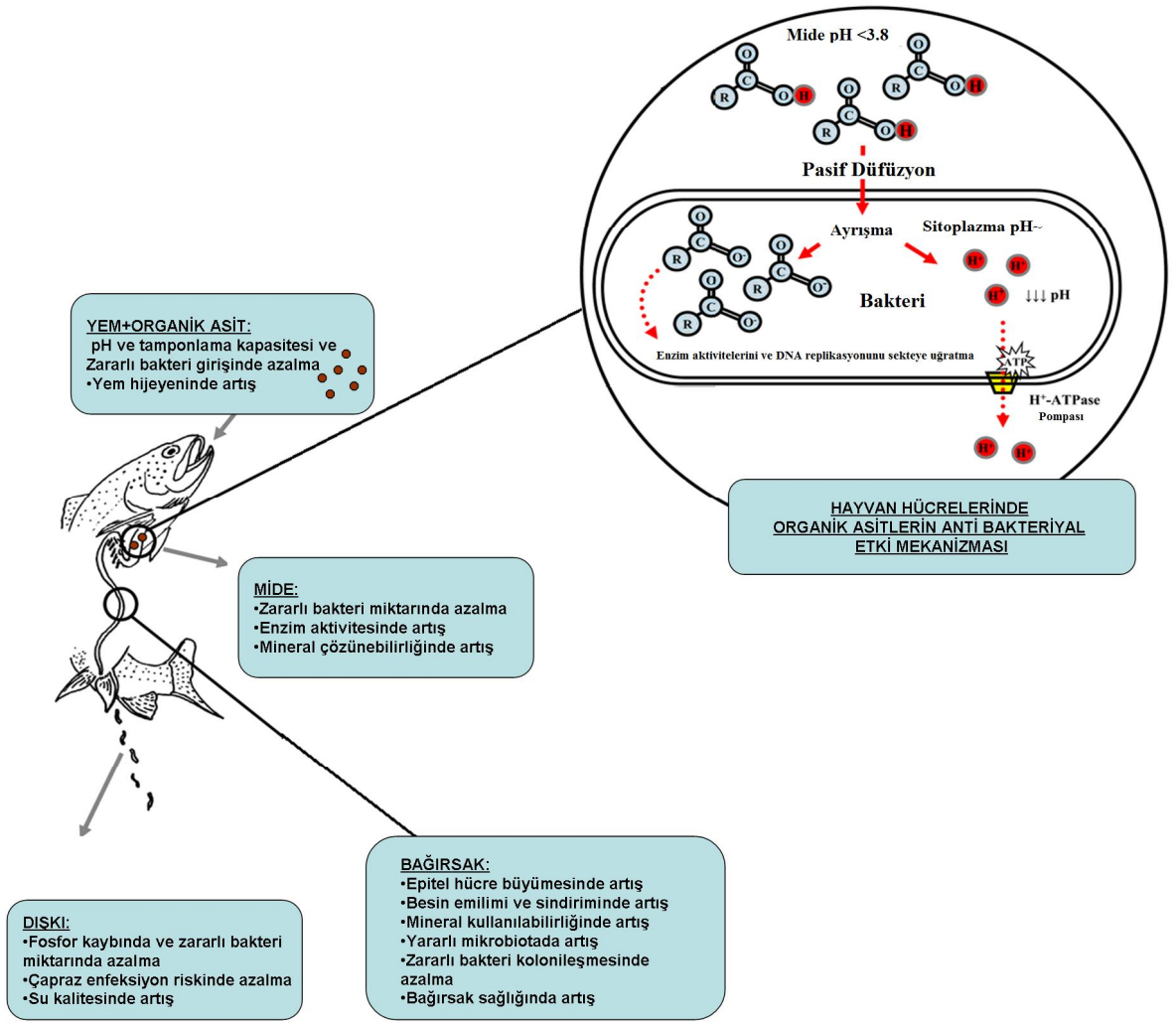
Yeme ilave edilen organik asitlerden sitrik, sodyum sitrat, formik, sodyum diformat, laktik, asetik, sukkinik ve organik asit karışımlarının alabalıklar üzerindeki etkileriyle ilgili yapılmış çalışmalar Çizelge 2.6.'de özetlenmiştir. Genel olarak, alabalık yemlerinde kullanılan organik asitlerin büyüme performansını, mineral emilimini ve minerallerin vücutta tutulmasını ve besin sindirimini arttırdıkları görülmüştür.

Organik asitlerin balıklar üzerindeki olumlu etkileri; bu ve daha önceki bölümlerde belirtilmiştir. Bu kısma kadar organik asitlerin etki mekanizmaları Şekil 2.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Organik asitlerin alabalıklar üzerine etkileriyle ilgili yapılmış çalışmalar

Organik Asit	g/kg	Balık Ağırlığı	Etki	Kaynaklar
Sitrik Asit	0 ve 10	13,2±2,4	Büyümede artış, SBO ve YDO de iyileşme, fosfor emiliminde/tutulmasında artış, çevreye daha az fosfor çıkışı	Hernandez ve ark., 2012
	0 ve 10	2,67±0,01	Daha düşük balık unu içeriği ile organik asit ilavesi sonucunda daha iyi büyüme, fosforun vücutta tutulmasında artış	Pandey ve Satoh 2008
	0 ve 50	~152	Yem tüketimine etki etmeden; kül, kalsiyum, toplam fosfor, çinko ve strontiyum kullanılabilirliğinde artış	Sugiura ve ark., 2001
	0, 4, 8 ve 16	3,0±0,1	Ağırlık artışına etki olmadan fosfor kullanımında ve demir depolanmasında artış	Vielma ve ark., 1999
	0, 20 ve 50	256,4	Kalsiyum ve fosfor kullanılabilirliğinde artış	Sugiura ve ark., 1998
	0 ve 120	-	Yem tüketimi azalırken, protein ve enerji tüketimine etki olmamıştır	Fauconneau 1988
Sitrik Asit ve Sodyum Sitrat	10 ve 50	232,0±37,1	Kalsiyum, fosfor, magnezyum, demir, manganez ve strontiyum kullanılabilirliğinde artış	Sugiura ve ark., 1998
Formik Asit	0, 4 ve 10 mL/kg	~520	Fosfor, magnezyum ve kalsiyum kullanılabilirliğinde ve bağırsak pH'ında artış	Vielma ve Lall 1997
Sodyum Difformat	0 ve 10.6	520	Arpa proteinli ve bazal yemlerin fiziksel kalitesinde, amino asit ve besin sindirilebilirliğinde artış	Morken ve ark., 2011
Laktik Asit	0 ve 10	2,67±0,01	Kemikte çinko birikimini arttırmıştır	Pandey ve Satoh 2008
Asetik Asit	0 ve 50	234,4±24,2	Fosfor sindirilebilirliğinde artış, endojen asit salgılarına ve bağırsak pH'ına etki göstermezken, mide pH'ını azaltma eğilimi göstermiştir	Sugiura ve ark., 2006
Sukkinik Asit	0 ve 120	-	Yem tüketimi azalırken, protein etkinliğinde ve enerji tüketiminde etkisi olmamıştır	Fauconneau 1988
Sodyum Format-Sodyum Bütirat (2:1)	0 ve 10 g	230 ve 950	Bitkisel protein kaynaklı diyetle beslenen balıkların büyüme performansı ve yemden yararlanma üzerine etki göstermezken, besin sindirimini azaltmıştır. Ancak bağırsak sağlığı üzerinde negatif etki göstermemiştir.	Gao ve ark., 2011
Organik Asit Karışımı	0, 5, 10 ve 15	40	10 ve 15 g/kg dozlarında büyüme ve SBO de artış sağlamıştır.	de Wet 2005





Şekil 2.2. Organik asitlerin balıklar üzerindeki muhtemel etki mekanizmaları (Ng ve Koh 2016)

## 2.6. Balık Yemlerinde Kullanılan Probiyotik Katkılar

Günümüzde balık yemlerine probiyotik ilavesi güncel bir konu olup probiyotiklerin biyoyararlılıklarını arttırmada kullanılan katkılar önem kazanmaya başlamıştır (Merrifield ve ark., 2010c). Balık yemlerinde kullanılan probiyotik gram negatif bakteriler (Cins bazında); *Aeromonas*, *Agarivorans*, *Alteromonas*, *Bdellovibrio*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Neptunomonas*, *Phaeobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseobacter*, *Shewanella*, *Synechococcus*, *Thalassobacter*, *Vibrio* ve *Zooshikella* iken gram pozitif bakteriler (Cins bazında); *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brochothrix*, *Clostridium butyricum* (tek tür), *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus acidilactici* (tek tür), *Rhodococcus*, *Streptococcus*,

*Streptomyces* ve *Weissella* bakterileridir (Newaj-Fyzul ve ark., 2014). Bir bakterinin probiyotik olarak kabul görmesi için değerlendirilmeye alınan kriterler (Merrifield ve ark., 2010c):

*Zorunlu Kriterler*

- ❖ Konakçı ve insanlar için patojenik olmamalıdır.
- ❖ Safra tuzlarına ve düşük pH değerlerine dayanıklı olmalıdır.
- ❖ Antibiyotik direnç genlerini barındırmamalıdır.

*Kabul Edilebilir Kriterler*

- ❖ Bağırsak mukusuna yapışabilmeli ve/veya üreyebilmelidir.
- ❖ Bağırsak epitelinde kolonize olabilmelidir.
- ❖ Yemlere ilave edilebilmesi için teşilli olmalıdır.
- ❖ Büyüme üzerinde avantajlı etki göstermelidir.
- ❖ Patojenlere karşı antagonistik etkisi olmalıdır.
- ❖ Sindirim enzimleri veya vitamin üretebilmelidir.
- ❖ Depolamaya karşı dayanıklı olmalıdır.
- ❖ Yem üretim proseslerine dayanıklı olmalıdır.

*Bacillus* ailesi genel olarak yukarıdaki kriterlerin çoğuna sahip olup, gram pozitif çubuk şeklinde tek endosporlu bakterilerle temsil edilmektedir. Bu türler arasında *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. clausii* ve *B. licheniformis* probiyotik olarak yaygın kullanıma sahiptir (Wang ve ark., 2008). Balıklarda yapılan çalışmalarda *B. subtilis* probiyotiğinin bağırsak florasını düzenleyici ve büyüme performansı ile bağışıklığı artırıcı etkisi bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008; Nayak, 2010; Mohapatra ve ark., 2013). Ayrıca spor üretmeleri depolama süresinin uzun olmasını ve bu sayede *Bacillus* türlerinin diğer probiyotiklerden avantajlı olmalarını sağlamaktadır (Hong ve Cutting 2005). Tez kapsamında *B. subtilis* probiyotik bakteri türünün seçilme nedeni gökkuşağı alabalıklarında yapılan çalışmalarda etkili olmasıdır. Örneğin, gökkuşağı alabalıklarının yemine *B. subtilis* AB1 bakterisi eklendiğinde immunolojik parametrelerden respiratöri burst, lizozim ve toplam peroksidaz (myeloperosidaz) aktivitelerinde önemli oranda artış tespit edilmiş ve alabalıkların *Aeromonas sp.* bakterisine karşı direnç kazandıkları bulunmuştur (Newaj - Fyzul ve ark., 2007). Çalışmada kullandığımız *B. subtilis* (ATCC 6633) bakterisi daha önce tilapia (Aly ve ark., 2008; Mohamed ve Refat 2011) balıklarında bağışıklık parametrelerinde ve hastalık direncinde artış sağlamıştır. Ancak yeme *B. subtilis* (ATCC 6633) probiyotiği eklenerek gökkuşağı alabalıklarında *Y. ruckeri* patojenine karşı etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Gökkuşağı alabalıklarında yeme ilave edilen farklı

probiyotik katkılarının etkileri Çizelge 2.7.'de özetlenmiştir. Literatürde probiyotik bakterilerin *Y. ruckeri* patojeni üzerindeki etkisi ile ilgili az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Doktora çalışması kapsamında, alabalık yemine ilave edilen *B. subtilis* probiyotiğinin *Y. ruckeri* patojenine karşı olan etkisi tespit edilmiş ve literatüre katkı sağlanmıştır.



Çizelge 2.7. Gökkuşuğu alabalıklarında potansiyel probiyotiklerin balıklar üzerindeki etkileri

Probiyotik Türü/Türleri	Etki	Kaynak
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Bağışıklık arttırıcı, <i>Aeromonas salmonicida</i> patojenine karşı direnç	Nikoskelainen ve ark., 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> strains, <i>Carnobacterium</i> strains	<i>Vibrio anguillarum</i> patojenine karşı direnç	Spanggaard ve ark., 2001
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> patojenine karşı direnç	Raida ve ark., 2003
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	Bağışıklık arttırıcı	Nikoskelainen ve ark., 2003
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	Bağışıklık arttırıcı	Panigrahi ve ark., 2004
<i>L. rhamnosus</i> JCM 1136	Bağışıklık arttırıcı	Panigrahi ve ark., 2005
<i>Pediococcus acidilactici</i> MA 18 5 M ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-1079	Vertebral kolon sıkışma sendromunda iyileşme	Aubin ve ark., 2005
<i>Aeromonas sobria</i> GC2	Bağışıklık arttırıcı, <i>Lactococcus garvieae</i> ve <i>Streptococcus iniae</i> patojenlerine karşı direnç	Brunt ve Austin 2005
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> B26 ve <i>Carnobacterium divergens</i> B33	Bağışıklık arttırıcı, <i>A. salmonicida</i> ve <i>Y. ruckeri</i> patojenlerine karşı direnç	Kim ve Austin 2006a
<i>C. maltaromaticum</i> B26 ve <i>C. divergens</i> B33	Bağışıklığı ve sitokin gen ekspresyonunu arttırıcı	Kim ve Austin 2006b
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103, <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Bağışıklığı ve sitokin gen ekspresyonunu arttırıcı	Panigrahi ve ark., 2007

Çizelge 2.7.'in devamı.

<i>Bacillus</i> spp. JB-1, <i>A. sobria</i> GC2	Bağışıklık arttırıcı, <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Streptococcus iniae</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio ordalii</i> ve <i>Yersinia ruckeri</i> patojenlerine karşı direnç	Brunt ve ark., 2007
<i>L. sakei</i> CLFP 202, <i>L. lactis</i> CLFP 100, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CLFP 196	Bağışıklık arttırıcı, <i>Aeromonas salmonicida</i> patojenine karşı direnç	Balcazar ve ark., 2007
<i>B. subtilis</i> AB1	Bağışıklık arttırıcı, <i>Aeromonas</i> sp. patojenine karşı direnç	Newaj-Fyzul ve ark., 2007
<i>L. plantarum</i> CLFP 238, <i>L. mesenteroides</i> CLFP 196	Rekabetçi florayı dışlama, <i>Lactococcus garvieae</i> patojenine karşı direnç	Vendrell ve ark., 2008
<i>A. sobria</i> GC2, <i>Brochothrix thermosphacta</i> BA211	Bağışıklık arttırıcı, <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> patojenine karşı koruyucu	Pieters ve ark., 2008
<i>A. sobria</i> A3-51	Bağışıklık arttırıcı, <i>Vibrio harveyi</i> patojenine karşı direnç	Arijo ve ark., 2008
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Büyüme performansı ve larval yaşama oranını arttırıcı	Bagheri ve ark., 2008
Kocuria SM1	Bağışıklık Arttırıcı, <i>Vibrio anguillarum</i> patojenine karşı direnç	Sharifuzzaman ve Austin 2009
<i>E. faecalis</i>	Büyüme performansı, bağışıklık arttırıcı ve hastalık direncinde artış	Rodriguez-Estrada ve ark., 2009
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>B. mojavensis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> patojenine karşı direnç, beyaz kan hücre sayısında, nötrofil, lenfosit ve monosit sayılarında ve hemogloblin miktarında artış	Capkin ve Altinok 2009

Çizelge 2.7.'in devamı.

<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> , <i>E. faecium</i>	YDO ve protein değerlendirme oranlarında artış, bağırsak mikrobiyotasını düzenleme	Merrifield ve ark., 2010a
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>P. acidilactici</i>	Mikrovillus uzunluğunda artış	Merrifield ve ark., 2010b
<i>A. sobria</i> GC2 ve <i>B. subtilis</i> JB-1	<i>Yersinia ruckeri</i> patojenine karşı direnç	Abbass ve ark., 2010
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CLFP 3, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CLFP 25 ve <i>L. mesenteroides</i> CLFP 68	Bağışıklığı düzenleyici gen ekspresyonlarında artış, <i>Lactococcus garvieae</i> patojenine karşı direnç	Pérez-Sánchez ve ark., 2011
<i>Enterobacter</i> sp. (C6-6 ve C6-8)	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> patojenine karşı direnç	Burbank ve ark., 2011
16 farklı probiyotik izolatu	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> patojenine karşı direnç	Burbank ve ark., 2012
<i>L. casei</i> ve <i>L. plantarum</i>	Bağışıklık ve büyümeyi arttırıcı, <i>Yersinia ruckeri</i> patojenine karşı direnç	Andani ve ark., 2012

## 2.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Akvakültürde probiyotik kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda probiyotiklerin en yaygın etkileri özetlenecek olursa (Pérez - Sánchez ve ark., 2014);

- ❖ Rekabetçi bakterilerin bağırsak florasında baskılanmasıdır.
- ❖ Enzimatik sindirime katkı sağlamasıdır.
- ❖ Bağışıklık parametrelerinde arttırmasıdır.

Probiyotik bakterilerin bu etki mekanizmaları aşağıda ayrıntılı olarak alt başlıklarda açıklanmıştır.

### 2.7.1. Probiyotik Bakterilerin Antagonistik Özellikleri

Probiyotikler, patojenik mikroplara karşı antagonistik (gelişimini engelleyici) etki göstermektedirler. Probiyotik bakterilerin bu özellikleri üretmiş oldukları bileşikler yoluyla (Tinh ve ark., 2007). Anti-patojenik aktiviteleri üretmiş oldukları antibiyotiklerin, bakteriosinlerin, sideroforların, lizozimlerin, proteazların yanı sıra pH değişimlerine neden olan organik asitleri, amonyağı ve hidrojen peroksitide üretmelerinden ileri gelmektedir. (Verschuere ve ark., 2000b; Farzanfar, 2006; Sugita ve ark., 2009). Bakteriyosinler bu bileşikler içerisinde en önemli yere sahip olup Laktik asit ve *Bacillus* (bakteriyosin benzeri bileşikler üretmektedirler) bakterileri tarafından patojen bakterilerin çoğalmasını engellemektedir (Vandenbergh, 1993). Bakteriyosinler protein veya protein kompleksleri olup dört ayrı sınıfta değerlendirilebilir (Fooks ve Gibson, 2002; Farzanfar, 2006). Bunlar;

Sınıf 1: antibiyotikler,

Sınıf 2: küçük hidrofobikler, ısıya dayanıklı peptitler,

Sınıf 3: geniş ısıya dayanıklı peptitler ve

Sınıf 4: kompleks bakteriyosinler; probiyotikler + yağ ve/veya karbohidratlardır.

Bakteriyal antagonizim doğada yararlı ve patojen bakteriler arasındaki dengenin korunmasında önemli bir yere sahiptir (Balcazar ve ark., 2004). Akvakültür alanında da antagonizim patojen bakteriler ile mücadelede kullanılmaktadır. Örneğin, rotifer besini içerisine laktik asit ve *Bacillus* spp., sporları ilave edildiğinde rotifer içerisindeki zararlı *Vibrio* spp., türlerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Mohapatra ve ark., 2013).

### 2.7.2. Probiyotik Bakterilerin Rekabetçi Flora Üzerine Etkileri

Probiyotiklerin bağırsak ve diğer doku yüzeylerinde yapışma ve kolonizasyon oluşturma özellikleri sayesinde diğer zararlı rekabetçi flora baskılanmaktadır. Bu da probiyotiklerin zararlı patojenlere karşı mücadele etmelerinin diğer bir yoludur (Ringo ve ark., 2007). Özellikle enterik mukus ve bağırsak duvarı yüzeyine yapışma, balığın patojen bakterilerden korunması için önemlidir (Vine ve ark., 2004). Probiyotiklerin yapışma özelliği spesifik faktörlere; konakçıda hali hazırda yapışmış olan bakteri yüzeyine probiyotiğin yapışabilmesi ve epitel hücrelerdeki reseptör moleküllere ve spesifik olmayan (fiziko-kimyasal) faktörlere bağlıdır (Salminen ve ark., 1996). Bakterilerin bağırsak kanalına yapışabilmesi için pasif kuvvetler, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik, yapısal kuvvetler, lipoteikoik asitler ve adezinler gibi çeşitli stratejiler geliştirdikleri bilinmektedir (Lara-Flores ve Aguirre-Guzman, 2009).

Probiotikler mukus, gastrointestinal sistem, epitel hücreleri ve diğer dokulara tutunarak konak canlıının mikroflorasının bir parçasını oluşturmakta ve bu da konakçının sağlığına veya refahına katkıda bulunmaktadır (Gatesoupe, 1999; Farzanfar, 2006). Bakterilerin yukarıda bahsi geçen dokulara tutunabilme yetenekleri *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiştir. Sonuçta, patojen bakterilerin gereksinim duydukları esansiyel besinler probiyotik bakteriler tarafından tüketilmek ve yaşama ortamları işgal edilmek suretiyle rekabetçi floranın baskılandığı görülmüştür (Verschuere ve ark., 2000b; Mohapatra ve ark., 2013). Besinlerin patojenler tarafından tüketilmesi yerine probiyotik bakteriler bu besinleri yararlı hale getirmektedirler. Ayrıca, yararlı mikrobiyota çoğu zaman gıdalara takviye bir kaynaktır. Probiyotikler mikrobiyal aktiviteler ile vitamin ve esansiyel aminoasit kaynağı olarakta önemli bir role sahiptirler (Mohapatra ve ark., 2013).

Floradaki herhangi bir mikrobik popülasyonun varlığı, aynı ekosistemde bulunan diğer mikroplarla mevcut enerjinin ve kimyasal içeriklerin kullanılmasında rekabet edebilme kabiliyetine bağlıdır (Nakano, 2007). Heterotrof bakteriler su ortamında geniş dağılım gösterirler ve karbon ve diğer enerji kaynakları gibi organik substratlar için rekabet ederler (Mohapatra ve ark., 2013). Mikroorganizmaların büyümesi için en önemli kaynaklardan biri demir olup, yapılan çalışmalarda bir çok patojen bakterinin zararsız bakterilere kıyasla gelişimi için demire ihtiyaç duyduğu görülmüştür (Verschuere ve ark., 2000a). Sideroforlar demir iyonuna özgü şelat oluşturan bileşikler olup zararsız bakterilerde bulunmaktadır (Gatesoupe, 1997). Bu nedenle siderofor üreten bakteriler, serbest demiri ortamdan uzaklaştırıp patojen gelişimini önlediklerinden probiyotik "biyolojik modülatör" olarak kullanılabilirler (Nakano, 2007).



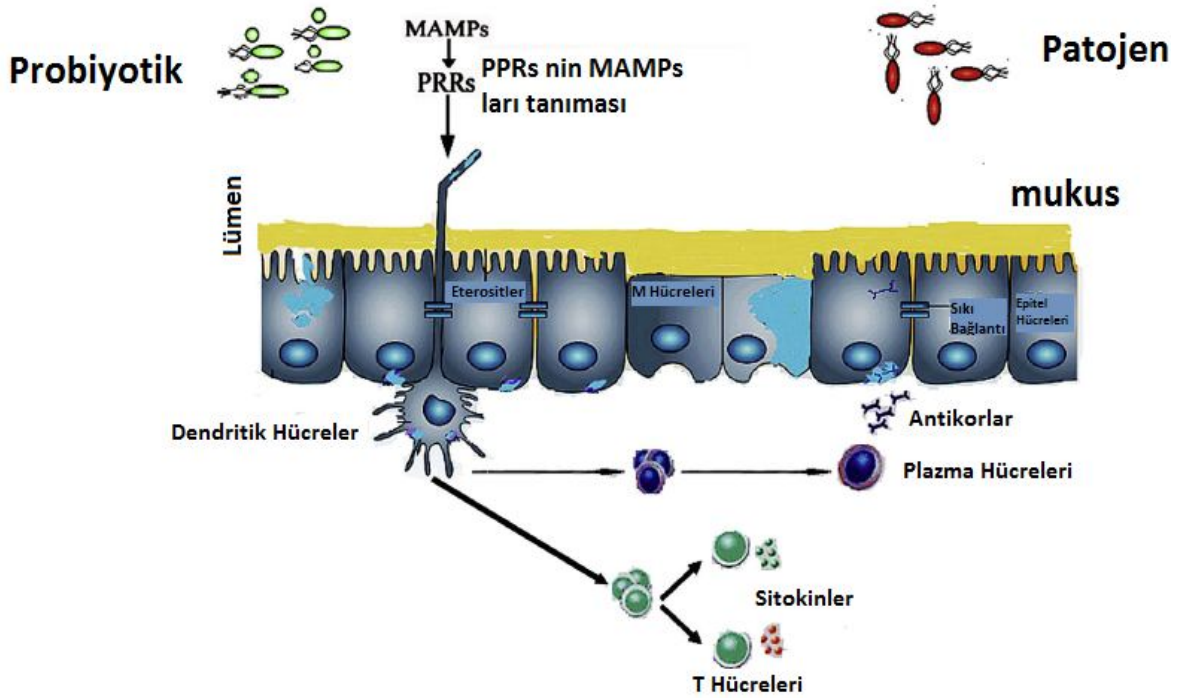
### 2.7.3. Probiyotik Bakterilerin Bağışıklık Yanıt Üzerine Etkileri

Probiyotik bakteriler bağışıklık yanıtı genel olarak üç farklı şekilde etkilemektedir (Farzanfar, 2006):

- ❖ Makrofaj aktivitesinde ve fagositoz kabiliyetinde artış sağlanması
- ❖ Düzenli antikor üretimi arttırması (genellikle immunoglobulin ve interferon)
- ❖ Mukus yüzeylerinde (Örneğin bağırsak duvarı) lokal antikorlarda artış sağlanması

Ayrıca probiyotikler, antibiyotikler ve kemoterapötikler gibi konakçı canlı üzerinde olumsuz etkilere neden olmadan patojenlere karşı koruma sağlayabilmektedirler. Probiyotikler, özellikle larval dönemde balıkların bağışıklığını geliştirerek larvaların doğal dayanıklılık kazanmalarına ve hayatta kalabilmelerine yardımcı olmaktadır. Probiyotiklerin farklı modları, balıkların bağışıklık yanıt üzerinde farklı uyarıcı bir etkiye sahiptir. Örneğin bağışıklık hücreleri, antikorlar, asit fosfataz, lizozim ve antimikrobiyal peptidler üzerindeki etki göstermektedirler (Nayak, 2010).

Mikroorganizma konak canlı tarafından vücuda alındıktan sonra patojen olup olmadığı patern patojen tanımlama reseptörleri (PRRs) tarafından tespit edilmektedir (Şekil 2.3.). PRRs ler hem patojenik hemde patojenik olmayan mikroorganizmalarda bulunan mikrobiyal ilişkili moleküler kalıpların (MAMPs) tanımlanmasını sağlamaktadır. Bunlara örnek olarak lipopolisakkaritler, peptidoglukan, flagellin ve mikrobiyal nükleik asit verilebilir. MAMPs' lerin PRR'lere bağlanması ile hücre içi sinyalleme uyarımı tetiklenir, spesifik sitokinlerin salınması ve sinyallerin bitişik hücelere iletilmesi veya anti-viral, pro veya anti-inflamatuar etkilerin gösterilmesi gibi tepkiler gerçekleşir (Akhter ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Probiyotiklerin konakçındaki bağışıklık artırıcı etkisi (Akhter ve ark., 2015)

#### 2.7.4. Probiyotik Bakterilerin Su Kalitesi Üzerine Etkileri

Gram pozitif bakteriler bağışıklık parametrelerinin geliştirilmesini sağlamanın yanı sıra sucul ortamda su kalitesinin artırılmasında da etkilidir (Mohapatra ve ark., 2013). Özellikle su kalitesinin iyileşmesinde *Bacillus* spp. organik materyalin bakteri biyomasına veya salgısına dönüşmesini engellemektedir (Verschuere ve ark., 2000b).

Probiyotiklerin bazı türleri, özellikle kırmızı alg planktonu gibi bir çok mikroalg türü üzerinde öldürücü etkiye sahiptir (Fukami ve ark., 1997). Su kalitesinde en büyük problemler, amonyak ve nitrit toksisitesinden kaynaklanmakta ve bu durum da nitrifikasyon bakterilerinin balık havuzlarına ilavesi ile düzeltilebilmektedir (Lewis ve Morris, 1986).

Probiyotikler de, akuatik türlerin yetiştirilme suyuna ilave edilerek ortamdaki mikrobiyal türlerin kompozisyonunu arttırmakta ve dolayısıyla su kalitesinin iyileşmesine yardımcı olmaktadır (Mohapatra ve ark., 2013). Örneğin probiyotiklerle yapılan çalışmalardan birinde karides larvalarının yetiştirilme suyuna mikroalg ile birlikte *B. pumilis* ilave edildiğinde amonyak ve nitritin kontrol grubuna göre düşük olduğu bulunmuştur (Banerjee ve ark., 2010).

### 2.7.5. Probiyotik Bakterilerin “Quorum Sensing” Üzerine Etkileri

“Quorum sensing” (QS) bakteri fenotiplerini bakteri hücrelerinin yoğunluğuna göre ayarlamak için bakteri popülasyonlarındaki kimyasal sinyallerin değişimini tanımlar (Reuter, 2016). Daha açık bir ifadeyle bakteri hücresinden diğer bir hücreye gerçekleşen iletişim süreci olarak tanımlanabilir. QS su ürünleri yetiştiriciliğinde enfeksiyonlarla mücadelede yeni bir strateji olarak yerini almıştır (Defoirdt ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Yersinia ruckeri* gibi patojenlerin QS'ini bozmak için çeşitli teknikler bildirilmiştir (Defoirdt ve ark., 2004):

- ❖ Sinyal molekülü biyosentezinin engellenmesi,
- ❖ QS'i algılayan antagonistlerin (doğal olarak ortaya çıkan sentetik halojenli furanonlar, antagonistik QS molekülleri ve daha yüksek bitkiler ve alglerin tanımlanmamış salgıları) uygulanması,
- ❖ QS'nin oksidize halojen antimikrobiyaller ile kimyasal olarak inaktivasyonu,
- ❖ Bakteriyel laktonazlar ve bakteriyel ve ökaryotik asilazlar tarafından QS'nin biyodegradasyonu,
- ❖ QS agonistlerinin uygulanması.

Gram negatif bakterilerin sinyal molekülleri açıl homoserin laktonlar (AHLs) olup yapılan çalışmalarda özellikle *Bacillus* spp., türlerinin AHLs'leri bozundurma enzimi olan laktonaza sahip olduklarını göstermiştir (Dong ve ark., 2000; Molina ve ark., 2003; Dong ve ark., 2004). Ancak akvakültür alanında daha çok yeni olan bu konunun daha detaylı çalışmalarla araştırılmasına ihtiyaç vardır.

### 2.7.6. Probiyotik Bakterilerin Antifungal ve Antiviral Özellikleri

Yılan balığı (*Anguilla australis*, Richardson) kültür ortamından izole edilen *Aeromonas media* (strain A199) bakterisinin *Saprolegnia* sp. fungusuna karşı antagonistik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lategan ve ark., 2004a). Benzer olarak *Aeromonas media* (strain A199) gümüş levreği, *Bidyanus bidyanus* balıklarını saprolegniyozise karşı korumuştur (Lategan ve ark., 2004b).

Eski bir uygulama olmasına rağmen aşı ile viral hastalıklardan korunmada başarı oranı oldukça değişkendir ve virüse karşı bağışıklık süresi şüphelidir (McLoughlin ve Graham, 2007). Bazı probiyotiklerin antiviral özelliklerinin olduğu bilinsede, etki mekanizması henüz tam olarak keşfedilememiştir. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. ve Coryneform bakteri gruplarının IHN (Infectious

Haematopoietic Necrosis) virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (Kamei ve ark., 1988). Benzer olarak karides yemlerine *Litopenaeus vannamei* ilave edilen *Bacillus megaterium* probiyotiği WSS (white spot syndrome) virüsüne karşı direnç sağlamıştır (Li ve ark., 2009).

Bu kısımdan sonraki bölümlerde tez kapsamında analiz edilen parametrelerin balık deneylerindeki önemleri açıklanmıştır.

## **2.8. Balıklarda Büyüme Performansı ve Besin Kullanımı**

Balıklar başta yüzmek olmak üzere, diğer tüm canlılarda da olduğu gibi yaşamsal faaliyetlerini sürdürmede enerjiye ihtiyaç duyarlar (Jobling, 1996). Balıkların su içerisindeki birçok aktivitesi sonucunda oluşan atık ürünlerinin kendilerinden uzaklaşabilmesi için enerji elzemdir. Bu işlemlerin tümü fizyolojik enerji veya hayvansal biyoenerji olarak tanımlanabilir ve organizmada enerjinin kazançları (yeni doku oluşumu vb.), kullanılma oranı (metabolik işlemler) ve kayıpları (feçes veya diğer boşaltım şekilleri) konularını kapsamaktadır (Hoşsu ve ark., 2003). Karbohidratlar, yağlar ve proteinler balıkların yedikleri besinlerdeki üç ana enerji kaynağıdır (Bureau ve ark., 2002). Karbohidratlar özellikle etçil balıkların enerji için kullandıkları en az kaynak olup yemlerde de oranları bu nedenle düşük tutulmaktadır (Sanger ve Stoiber, 2001). Yapılan çalışmalarda proteinden gelen enerji ile yüzmeye hızının süreklilik arz etmediği görülürken, yağdan gelen enerji ile yüzmeye hızının arttığı görülmüştür (Lauff ve Wood, 1996; Alsop ve Wood, 1997). Vücuttaki depo yağının bir gramı balıkta bir gram ağırlık artışı, bir gram protein ise 4-5 gram doku ağırlığı kazanılmasını sağlamaktadır (Hoşsu ve ark., 2003). Bu da balıkların büyümede proteinleri enerjide ise yağları birincil olarak kullandıklarının bir göstergesidir.

Balıklarda büyüme ve gelişme genelde boydaki uzama olarak kabul edilmektedir. Bu durumda boyca uzama ile canlı ağırlık artışı arasındaki oransal ilişkinin değerlendirilmesinde kondüsyon faktörü ( $k=W/L^3 \times 100$ ) kullanılmaktadır. Ancak kondüsyon faktöründeki aşırı artış; şişmanlık (obezite), azalış ise; zayıflık olarak kabul edilmektedir (Timur, 2006). Bu nedenle rasyonlar canlının optimum besin ihtiyacını karşılamalıdır. Gerek yemin hazırlanmasında gerekse de yemleme miktarının hesaplanmasında balığın ihtiyacı göz önünde bulundurulmalıdır. Beslemenin büyüme üzerinde etkili olan en önemli faktörlerden biri yemin kompozisyonu ve canlının ihtiyacına cevap verebilmesidir. Bu noktada yemin içeriğindeki yağ asitleri, aminoasitler, vitaminler ve mineraller büyüme için en önemli besin gereksinimleri olup, yetersizliklerinde balık

büyümesinde gerileme ve daha fazla yem tüketimi söz konusu olacaktır (Hoşsu ve ark., 2003). Yapılacak pilot çalışmalar ile üretilen yemin balıklar tarafından değerlendirilme oranı tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, balıklarda yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) önemli hesaplamalardır. Ayrıca, yemden gelen proteinin değerlendirilme oranının tespit edilmesi için; protein verimlilik oranı (PVO) ve protein kullanım oranı (PKO), yağ için; yağ kullanım oranı (YKO) ve enerji içinde; enerji kullanım oranı (EKO) değerlendirilmektedir (Peres ve Teles, 1999a; Wilson, 2002; Hardy ve Barrows, 2002).

## 2.9. Balıklarda Yağ ve Yağ Asitleri

Balık yetiştiriciliğinde hedef minimum yem ile maksimum büyümenin sağlanması olsa da balık etinin kalitesi de büyük öneme sahiptir. Balık eti kompozisyonu et kalitesini etkileyen en önemli kriter olup, balığın pazarda direkt olarak satışını etkilemektedir. Balığın pişirme işleminden sonra tüketici açısından alınan tat ve genel beğeni yenilebilir kısımlarındaki yağ oranı ile ilişkilidir. Balık etinin bu özelliği yağ asitlerinin uçucu bileşenlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yağlar kadar olmasa da kaslardaki proteinler de organoleptik özellikler açısından etkilidir (Kawai, 1996; Grigorakis, 2007). Özellikle alabalık gibi etçil beslenen balıkların yemine ilave edilen bitkisel kaynaklar esansiyel besinlerin değerlendirilmesini ve enerji sindirimini azaltmakta, esansiyel aminoasit dengesini bozmakta ve et lezzetini olumsuz etkileyebilmektedir (Dias ve ark., 2005). Antibesinsel maddeler içeren bitkisel kaynakların bu etkiyi genellikle rasyonda belirli bir oranın üzerinde kullanıldıklarında gösterdikleri bilinmektedir (Hendricks, 2002).

Yemde kullanılan lipit kaynakları balıkların enerji gereksinimi ve esansiyel yağ asitleri (EFA) açısından yegane kaynaktır. Linoleik ve/veya linolenik tatlusu türleri için, n-3 çoklu doymamış yağ asitlerinden (HUFA); eikosapentaenoik asit (EPA) veya dokosaheksaenoik asitler (DHA) ise deniz balıkları için esansiyeldir (Ishikawa, 2007). Balıkların normal gelişimi, yemden yararlanabilmesi, üremesi ve sağlıklı olabilmesi için n-9, n-6, ve n-3 yağ asitlerinden eikosatrienoik asit (20:3n-9), dihomo- $\gamma$ -linolenik asit (20:3n-6), araşidonik asit (20: 4n-6; AA), eikosapentaenoik asit (20:5n-3; EPA), ve dokosaheksaenoik asitler (22:6n-3; DHA) besinsel öneme sahiptir (Higgs ve Dong 2000; Balfry ve Higgs 2001).

Yetiştiriciliği yapılan balıkların yemlerinde genelde deniz balıkları yağları lipid kaynağı olarak kullanılmaktadır (Jobling ve ark., 2001). Ancak bazı balık türleri, alternatif bitkisel yağ kaynaklarını EFA ihtiyacını karşılamak koşuluyla değerlendirebilmektedir.

Örneğin, keten tohumu yağı balıklar tarafından sentezlenemeyen linolenik (18: 3n-3) ve linoleik (18: 2n-6) asitlere önemli miktarda sahiptir (Jobling ve ark., 2001). Alabalıklarda yapılan çalışmalarda balık yemlerinde keten tohumu ve kolza yağının balık yağına alternatif olabileceği görülmüştür (Drew ve ark., 2007). Ancak balık yemlerinde uzun süreli alternatif kaynakların kullanımının balık sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırılması büyük öneme sahiptir.

Doktora tezi kapsamında, daha önce balık yemlerine ilave edilmemiş sinnamik asitin balıkların büyüme performansı, besin kullanımı ve yağ asit kompozisyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

## **2.10. Balık Besleme Denemelerinde Kullanılan Sağlık Karakteristikleri ve Önemi**

*In vitro* besleme denemelerinde yeme ilave edilen herhangi bir katkının veya hammaddenin balıklar üzerindeki olumlu yada olumsuz etkilerinin belirlenmesinde hematolojik, serum biyokimyasal, immunolojik, antioksidan enzimler ve kortizol gibi çeşitli sağlık karakteristikleri analiz edilmektedir. Ayrıca iç organ indekslerinin, bağırsak ve mide enzimlerinin, bağırsaklarda üreyebilen toplam bakteri sayımının belirlenmesi de balığın genel sağlık durumu hakkında bilgiler verebilmektedir. Doktora tez çalışması kapsamında kan pH değeri de bu kriterlerin içerisinde değerlendirilmiş olup yukarıda bahsi geçen tüm sağlık kriterleri ile ilgili bilgilere aşağıda farklı başlıklar altında yer verilmiştir.

### **2.10.1. Hematoloji ve Hematolojik Analizlerin Önemi**

Hematoloji kan ve kanda meydana gelebilecek bozuklukları inceleyen bilim dalıdır. Bir canlının yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için tükettiği gıdalardan sindirim yoluyla elde ettiği besinleri vücut içerisinde gerekli doku ve organlara taşıyabilmesi gerekmektedir. Alınan besinler ile büyüme, enerji depolayabilme ve sindirim sonrasında geriye kalan ürünleri dışarı atabilme gibi yaşamsal faaliyetler için vücut içerisinde kimyasal bazı maddelerin taşınması gerekmektedir. Tüm bu işlemler kan ve kanın yolunu oluşturan damarlar ile meydana gelmektedir (Timur, 2006).

Hematolojik analizler balık sağlığının genel durumunun belirlenmesinde rutin olarak kullanılan en önemli analizlerden biridir (Yılmaz ve ark., 2016). Hematolojik analizler sonucunda elde edilen tanımlar (Blaxhall ve Daisley 1973);

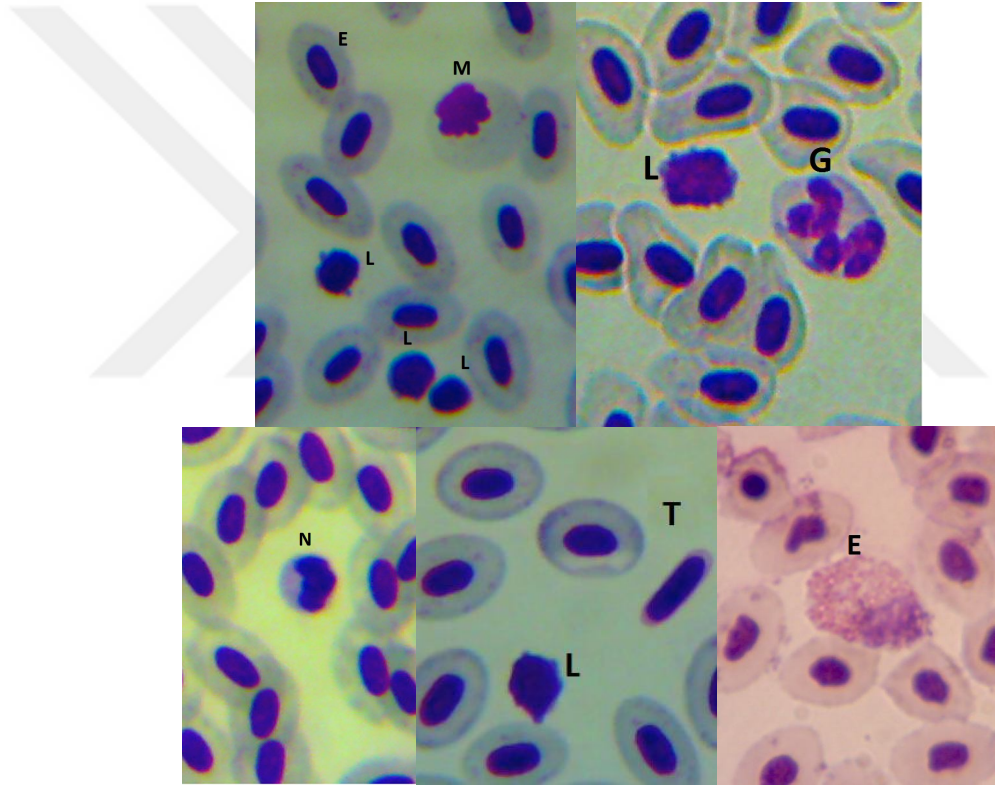
- ❖ Kırmızı kan hücre sayısında ve hematokrit oranında azalmalar ile hemoglobin yıkımı kansızlığın (aneminin) bir göstergesidir. Ayrıca eritrosit

indekslerindeki değişimler (MCV, MCH ve MCHC) ile farklı anemi tipleride tespit edilebilmektedir.

- ❖ Sedimentasyon testi balıklarda insanlarda olduğu gibi hastalıkları hakkında bize bilgi verebilmektedir.
- ❖ Beyaz kan hücre sayısı ve tipleri (lenfosit, nötrofil, monosit, eozinofil ve bazofil) hastalıkların varlığında değişim gösterebilmektedir.

### 2.10.2. Balıklarda Kan Hücreleri ve Bağışıklık Sistemindeki Görevleri

Balıklarda kan hücrelerini (Şekil 2.4.) eritrositler (kırmızı kan hücreleri), lökositler (beyaz kan hücreleri) ve trombositler oluşturmaktadır (Başusta, 2005).



Şekil 2.4. Balıklarda kan hücrelerinin şekilleri (Orjinal) M: Monosit, E: Eritrosit, G: Granülosit, L: Lenfosit, N: Nötrofil, T: Trombosit, E: Eozinofiller

#### 2.10.2.1. Kırmızı Kan Hücreleri (Eritrositler)

Kan içerisinde en yoğun olarak bulunan hücrelerdir. Eritrositlerin şekilleri üstten bakıldığında yassı ve oval olmakla birlikte eğer de olsa ortası çukur bir diski andırabilmektedirler (Başusta, 2005). Kırmızı renkte olan eritrositlerin bu renkleri, globulin proteini ve sarı-kırmızı renklere sahip, demir içerikli hemoglobin pigmentlerinden

kaynaklanmaktadır (Timur, 2006). Eritrositlerin işlevleri arasında en başta geleni bünyelerindeki hemoglobinle oksijen taşımaktır (Roberts, 2001). Ancak balıklarda oksijensiz metabolizma dominant olduğundan oksidatif fosforilasyon sonucunda ATP üretilir (Roberts, 2001).

Eritrositlerin çapı ve kandaki miktarları balık türüne, balığın fizyolojik durumuna, yaşama ortamına, su şartlarına vb. göre değişmektedir. Ancak genelde eritrositlerin çapları 7 ila 36 mikron (Anderson, 1974; Başusta, 2005), miktarları da  $0,06 \times 10^3/\mu\text{l}$  ila  $5,3 \times 10^6/\mu\text{l}$  aralığında değişim göstermektedir (Fange, 1992; Çelik ve ark., 2006; Hrubec ve Smith, 2010). Balıklar herhangi bir patojene maruz kaldıklarında genellikle eritrosit miktarı azalmaktadır. Bu nedenle eritrosit miktarındaki değişimler balıkların sağlıklı olup olmadıklarını göstereceğinden önemli bir kriterdir. Bu kriterin değerlendirilmesinde hücre sayımları ve hematokrit oranından yararlanılmaktadır. Hematokrit, şekilli kan elemanlarının (büyük bir kısmını eritrositler oluşturmaktadır) kan plazmasına olan oranı olarak ifade edilmektedir (Başusta, 2005).

#### **2.10.2.2. Beyaz Kan Hücreleri (Lökositler)**

Beyaz kan hücreleri akyuvarlar (lökositler) olarak adlandırılmaktadırlar. Lökositler yuvarlak veya oval şekillidirler (Başusta, 2005). Balık türüne ve hücrelerin tiplerine göre çapları 4,5 ila 33 mikron aralığındadır (Anderson, 1974; Roberts, 2001; Başusta, 2005). Balıkların kanındaki lökositlerin miktarı 10 ila  $282 \times 10^3/\mu\text{l}$  aralığında değişim gösterebilmektedir (Fange, 1992; Hrubec ve Smith, 2010). Tiplerine göre (Roberts, 2001);

- ❖ Granüler lökositler nötrofil, eozinofil ve bazofil hücreleridir.
- ❖ Granüler olmayan hücreler ise lenfosit ve monositlerdir.

Bu hücreler aynı zamanda balıklarda bağışıklık sisteminde de rol almaktadırlar. Balıklarda bağışıklık sistemini oluşturan hücreler: T lenfositler, B lenfositleri, monositler, polimorfnükleer lökositler (nötrofil, bazofil ve eozinofil), trombositler ve eritrositlerdir (Candan ve Karataş 2010).

Lenfositler spesifik (kazanılmış) bağışıklıktan sorumlu olup, belli bir antijene özgü olan spesifik hücrelerin uyarılması ve aktive olması işlevlerini kapsamaktadır (Diker, 2005). Balık lenfositlerinin ve trombositlerin özelliklerini ve önemini maddeler halinde sıralayacak olursak (Hoar ve ark., 1997; Press, 1998; Diker, 2005; Başusta, 2005; Hrubec ve Smith, 2010; Candan ve Karataş 2010):



#### **2.10.2.2.1. T lenfositler:**

- ❖ Memelilerde timüs ve kemik iliğinde, balıkta ise timüs ve böbrekte olgunlaşmaktadırlar.
- ❖ Lenfositler büyüklüklerine göre ikiye ayrılmaktadırlar: küçük lenfositlerin çekirdekleri dışındaki sitoplazmaları çok dardır. Büyük olanların ise çekirdek çevresinde sitoplazmaları oransal olarak daha fazladır.
- ❖ Lenfositlerin timüste üretileni T lenfosit ve böbrekte üretileni de B lenfosit olmak üzere iki tiptedir ve spesifik (kazanılmış bağışık) yanıtın başlamasında rol alırlar.
- ❖ T lenfositlerin yüzeyinde, antijenleri özgül olarak tanıyan T hücre reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörler; yabancı antijeni, MHC (temel doku uygunluğu bileşeni) antijenlerinin bazı komponentleriyle birlikte olduğunda tanırırlar.

#### **2.10.2.2.2. B lenfositler:**

- ❖ Antijene karşı özgül reseptör olan immunoglobulin (Ig) moleküllerinin sentezlenmesi ve yüzeysel zarı taşımasında görevlidir. B lenfositler spesifik antijenlerle karşılaştıklarında çoğalarak antikor üreten plazma hücrelerine dönüşürler. Bazı aktifleşmiş B lenfositler plazma hücrelerine dönüşmezler ve özgül antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan hafıza hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler aynı antijen ile tekrar karşılaşıncaya kadar aktivasyon göstermeden beklemektedirler. Aynı antijen ile karşılaştıklarında hızla etkileşebilirler ve çoğalarak bağışıklık yanıtın daha hızlı olmasını sağlamaktadırlar.

#### **2.10.2.2.3. Retikuloendotelyal Sistem (RES):**

- ❖ Balıklarda fagositik doku makrofajları retikuloendotelyal sistemi oluşturan özellikle böbrek, dalak ve karaciğer gibi çeşitli organlardaki hücrelerden meydana gelmektedir.

#### **2.10.2.2.4. Mononükleer Fagositler:**

- ❖ Dokuda makrofajlar ve kanda monositler mononükleer fagositler olup, fagositik hücrelerin en önemli grubunu oluştururlar. Ayrıca kanda olgun makrofajlar da mevcuttur. Normalde monositler balık kanındaki en az sayıdaki (%0,1) hücrelerden biridir. Ancak, yabancı bir maddenin vücuda girmesiyle çok

kısa bir sürede sayıları artabilmektedir. Kandaki makrofajlar yabancı partiküller ve/veya mikroorganizmaları sindirerek parçalarlar. Uzun ömürlüdürler ve T lenfositlere antijen sunmada çok önemli rolleri vardır. Makrofajların immün sistem içindeki üç önemli görevi: 1.fagositoz, 2. antijen sunma, 3. sitokin üretimidir.

#### **2.10.2.2.5. Polimorfnükleer Lökositler (PMNL):**

- ❖ Fagositoz yapan diğer hücreleri kapsamaktadır. Çekirdekleri çok lopludur ve sitoplazmalarında bol miktarda granül bulundurmaları nedeniyle bu adı almışlardır.
- ❖ Bu hücreler nötrofiller, eozinofiller ve bazofillerdir. Boyandıkları zaman verdikleri reaksiyona göre isimlendirilmişlerdir. Bazık boyanan hücreler bazofiller, asidik boyanan hücreler eozinofiller ve her iki boyayla da boyanamayan hücreler nötrofillerdir.
- ❖ Makrofajlara göre çok daha kısa ömürleri vardır. Nötrofiller yabancı partikülleri sindirip parçaladıktan kısa bir süre sonra ölürlür. Lökositler, fagositoz yeteneğine sahip olduklarından vücut savunmasında çok önemli bir rol üstlenmişlerdir.

#### **2.10.2.2.6. Nötrofiller:**

- ❖ Balık türüne göre değişebilmekle birlikte lenfositlerden sonra kanda en çok bulunan (%6-8) lökosit hücreleridir.
- ❖ Nötrofiller kan haricinde böbrek, dalak ve yangı lezyonlarında da bulunmaktadırlar.
- ❖ Nötrofiller Peryodik Asit Shift (PAS), myeloperoksidaz, Sudan blask B, benzidin peroksidaz, asit ve alkelen fosfataz pozitif sonuç veren hücrelerdir.
- ❖ Fagositik, kemotaktik ve bakterisidaldirler. Bakteriler ile temasa geçtiklerinde yoğun bir respiratör yıkım yapabilmektedirler.

#### **2.10.2.2.7. Eozinofiller:**

- ❖ Tüm balıklarda bulunmamakla birlikte var oldukları türlerde genel olarak lökositlerin %1-5'ini oluştururlar.
- ❖ Fagositoz özellikleri olmakla birlikte nötrofiller gibi ana görevleri fagositoz değildir.

- ❖ Bu hücreler bazofillerden salınan kemotaktik faktörler ile inflamasyon bölgesine gelirler.
- ❖ Eozinofiller genellikle parazitlerle mücadelede artış gösterirler, PAS pozitif ve asit fosfataz negatif özelliktedirler.

#### **2.10.2.2.8. Bazofiller:**

- ❖ Balıklardaki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir.
- ❖ Sadece bazı balık türlerinin kanında az miktarda bulunmaktadır.

#### **2.10.2.2.9. Trombositler:**

- ❖ Kan pıhtılaşmasında, bağışıklık yanıtta ve inflamasyonda rol almaktadırlar.
- ❖ Balık trombositleri iğ veya oval şekilde olup boyutları küçüktür.
- ❖ Kandaki sayıları 2 ila 310 x10<sup>3</sup>/µl aralığında değişmektedir.

Damar endotelleri zarara uğradığında trombositler hasarlı bölgeye yapışarak toplanır ve geçirgenliği arttıran faktör salgısıyla kompleman aktivasyonunu ve hasarlı bölgede lökositlerin toplanmasını sağlarlar.

### **2.10.3. Bağışıklık Sisteminde Görev Alan Organlar**

Kemikli balıklarda timus, dalak ve böbrek temel lenfoid organlardır. Dalak, böbreğe nazaran daha az hematopoietik ve lenfoid hücre içermektedir (Candan ve Karataş 2010). Ayrıca, arka bağırsakta kemikli balıklarda bağışıklık sisteminde görev alan bir organdır (Press, 1998). Kıkırdaklı balıklarda ise timus, epigonal organ, leydig organ, dalak ve spiral valf bağışıklık sisteminde görev alan organ ve dokulardır (Press, 1998).

Yetiştiricilik açısından bakıldığında kemikli balıkların ön planda olması ve doktora tezi kapsamında kemikli balıkla ilgili çalışılması maksadıyla bu kısımda kemikli balıklar ile ilgili bilgiler verilecektir. Kemikli balıklardaki bağışıklık sistemi ile ilişkili organlar ve görevleri (Hoar ve ark., 1997; Press, 1998; Bone ve Moore 2008; Candan ve Karataş 2010):

#### **2.10.3.1. Böbrek:**

- ❖ Kemikli balıklarda birincil kan üreten (hematopoietik) organdır. İçerdiği lenfosit ve plazma hücreleri ile temel antikor üreten organ özelliği taşımaktadır.

- ❖ Hem ön böbrek (anteriyor) kısmında hemde arka (posteriyor) bölgesinde kan üreten bölgeler vardır. Posterior bölge aynı zamanda sekresyon işlevi üstlenmiştir.
- ❖ Filtrasyon görevi ile birçok antijenin fagositozu yapan makrofajları da bulundurmaktadır.
- ❖ Teleost balıklarda böbrek farklı olgunluktaki kan hücrelerini, endokrin ve salgısal fonksiyonları olan endotelial hücrelerini içermektedir.
- ❖ Ayrıca gökkuşağı alabalıklarında böbrekteki hematopoietik kısmın içinde melano makrofajların dağınık bir yapıda bulunduğu bilinmektedir.
- ❖ Melanin, hemosiderin ve lipofuksin pigmentleri içeren melanomakrofajlar (MM) diğer teleost türlerinde de böbrek, dalak ve karaciğerde toplu olarak bulunmaktadır ve melanomakrofaj merkezleri (MMC) veya agregatları olarak adlandırılırlar.

Fagositik ve radikal temizleyici olan bu hücrelerin kemikli balıkların bağışıklık sistemi içerisindeki rolleri henüz kesin olarak bilinmesede memelilerdeki lenf nodüllerinin ilkel benzerleri oldukları düşünülmektedir.

#### **2.10.3.2. Timus:**

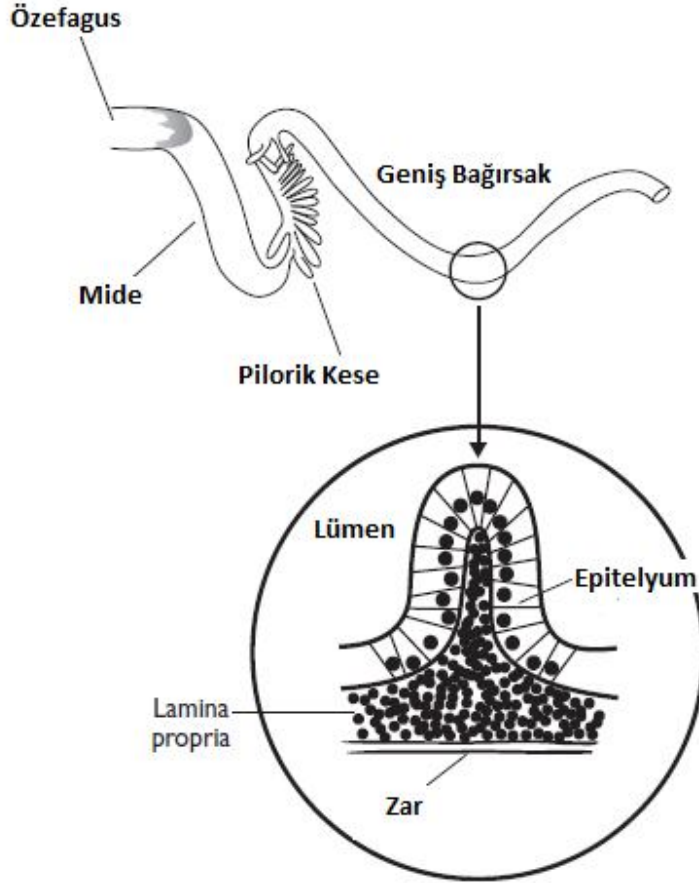
- ❖ Solungaç kemerlerinin dorso-lateralinde ve faringeal epitelyumun altında bilateral bir çift olarak yer alır.
- ❖ Kemikli balıklarda dalak eritropoietik ve sekonder lenfoid bir organ iken, timüs primer lenfoid organdır.
- ❖ Korteks ve medulla çoğu kemikli balıkta yoktur, ancak bazı türlerde dört tabakaya kadar rapor edilmiştir
- ❖ Timus genelde gelişmekte olan lenfositleri içermektedir. Ancak organ içi hücre kinetiği ve göçleri hakkında sınırlı bilgi vardır.
- ❖ Diğer yandan timusta üretilen lenfositler daha sonra sirkülasyona katılan periferik lenfositleri oluşturmaktadırlar. Periferik lenfositler diğer lenfoid organlara göç ederler.
- ❖ Timus T hücrelerinin farklılaştığı ve olgunlaştığı ana organdır. Timusun savunma mekanizmalarına doğrudan dahil olması, bağışıklıktan sonra plazma hücrelerinin ve plak oluşturan hücrelerin görünümüyle kanıtlanmıştır.

#### **2.10.3.3. Karaciğer:**

- ❖ Balıklarda karaciğerin bağışıklık sistemindeki görevi diğer lenfoid organlar kadar etkin değildir.
- ❖ Karaciğer, dalak ve böbrek kadar olmasa da temizleyici görevi olan bir organdır.
- ❖ Karaciğere ait makrofajların bazı kemikli balıklarda fagositoz özellik gösterdiği bildirilmiştir.
- ❖ Ayrıca, karaciğerde doğal öldürücü hücrelere (Natural Killing Cell) benzeyen parankimal hücreler olduğu ancak bu hücrelerin bakteri hücrelerini eritici özelliğinin çok kuvvetli olmadığı bilinmektedir.

#### **2.10.3.4. Bağırsak:**

- ❖ Mide-bağırsak kanalı mikroplara karşı bariyer görevindedir. Bu özelliği üretmiş olduğu mukus ile doğrudan ilişkilidir.
- ❖ Ayrıca, bağı dokusunda (lamina propria) eozinofilik hücreler ve intraepitelial lenfositlerle makrofajlar bulunmaktadır.
- ❖ Antijenler epitellerde intraepitelial makrofajlara nakledilir ve makrofajlar antijenleri işler ve diğer lenfoid hücrelere sunar (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Bağırsaklarda antijenlerin emilimi ve taşınımı (Bone ve Moore 2008)

#### 2.10.3.5. Dalak:

- ❖ Dalak, koyu kırmızı-siyah renge sahip bir organdır.
- ❖ Genellikle midenin altında ve kuruğa doğru yer almaktadır.
- ❖ Kemikli balıkların dalağı, parankimaya uzanan lifli bir kapsüle ve küçük trabeküllere sahiptir.
- ❖ Dalak genel olarak kan hücreleri, makrofajlar ve melano makrofajlar, endotelial hücreler, retiküler hücrelerden oluşmaktadır.
- ❖ Dalağın korteks bölgesinde eritrositler ve trombositler, medulla bölgesinde ise lenfosit ve granulositleri üretilmektedir.
- ❖ Kırmızı pulpa ve beyaz pulpa olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kırmızı pulpada eritrositler ve trombositler, beyaz pulpada ise lökositler meydana gelmektedir.
- ❖ Memelilerde olduğu gibi bu iki kısım birbirinden bağımsız değil, iç içe girmiş durumdadır.

- ❖ Organın çoğunu kaplayan kırmızı pulpa sinüzoidleri destekleyen retiküler hücre ağından oluşmaktadır. Beyaz pulpa ise makrofaj yığınları ve elipsoitlerden oluşmaktadır.
- ❖ Kemikli balıklarda dalağın kan üretimi, antijenlerin indirgenmesi, makromoleküllerin temizlenmesi ve antikor üretimi gibi görevleri vardır.
- ❖ Ön böbreğe göre dalağın spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemdeki rolü, ikinci derecededir.
- ❖ Kemikli balıkların dalağındaki elipsoitler; partiküler veya partiküler olmayan farklı maddeleri (patojenler, eski hücreler, LPS, protein kümeleri, vb.) yakalar.

#### **2.10.4. Balıklarda Bağışıklık Sistemi**

Tüm canlılar gibi balıklar da sucul ortamda birçok mikroorganizmayla birlikte yaşamaktadır. Bu mikroorganizmalar arasından hastalık yapan patojenlerle karşılaştıklarında farklı savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Balıklardaki bağışıklık mekanizmaları spesifik olmayan (doğal) ve spesifik (kazanılmış) kısımları içermektedir (Siwicki ve Anderson, 1993a; Noguchi, 1998).

##### **2.10.4.1. Balıklarda Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi**

Spesifik olmayan olmayan (doğal) bağışıklık sistemi canlının doğal olarak sahip olduğu mekanizmaları içeren ve ikinci kez antijeni hatırlamayan bağışıklık sistemini kapsamaktadır. Balıklarda spesifik olmayan sistem mekanizmaları Çizelge 2.8.'de verilmiştir (Candan ve Karataş 2010). Bu sistem hücrel ve sıvısal savunma sistemlerinden meydana gelmektedir.

Çizelge 2.8. Balıklarda spesifik olmayan sistem mekanizmaları

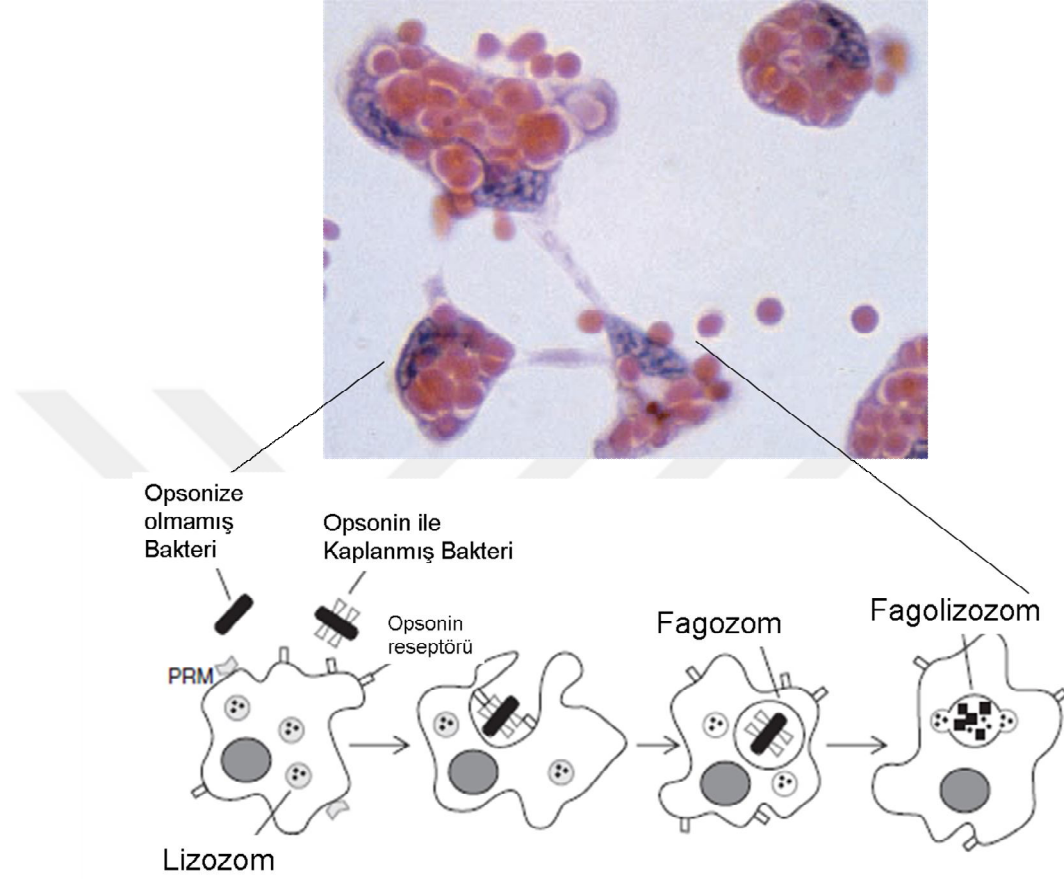
<b>Mikroorganizma Vücuda Girmeden Önce</b>	
<b>Doğal Bariyerler:</b>	Deri
	Mukus
	Solungaçlar
	Bağırsak Florası
<b>Mikroorganizma Vücuda Girdiğinde</b>	
<b>İnflamasyon (Yangı)</b>	
<b>Hücrel Mekanizmalar:</b>	Fagositoz
	Pinositoz
	Makrofaj ve Nötrofil aktiviteleri: Kemotaksi
	Ekstraselüler
	Öldürücü etki
<b>Sıvısal Faktörler:</b>	Lizozim
	Kompleman
	C-reaktif protein
	Transferrin
	Lektinler
	İnterferrin
	Seruloplazmin
	Doğal aglutinler

#### 2.10.4.1.1. Balıklarda Fagositoz

Fagositoz; fagositik özellikteki bir hücrenin herhangi bir maddeyi absorbe ederek sindirmesi olayıdır. Tüm canlılarda en önemli savunma bariyerleri olarak kabul edilmektedir (MacArthur ve Fletcher, 1985). Polimorf nükleer (nötrofil, eozinofil ve bazofil) hücreler ve mononükleer (monosit ve makrofajlar) hücreler fagositik hücreleri kapsamaktadır ve zararlı organizmaların yok edilmesini sağlamaktadırlar (Studnicka ve ark., 1993). Bu hücrelerden nötrofiller ve makrofajlar aktif olarak fagositoz yapan hücrelerdir (Gorczyński ve Stanley, 1999). Fagositoz işleminde yutulan yabancı partiküller



hücre içinde respiratörük yıkım ve lizozomal enzim sindirimi ile yok edilmektedirler (Diker, 2005). Şekil 2.6.'de gökkuşağı alabalığı makrofajları tarafından fagosite olan koyun kanı hücreleri ve temsili olarak fagositozun aşamaları görülmektedir.



Tanıma → Yakalama → Yutma → Parçalara ayırma → Öldürme → Enzimlerle sindirme  
Şekil 2.6. Fagositozun aşamaları (Roberts 2001; Keogan ve ark., 2006)

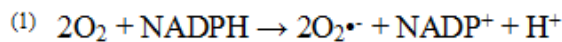
Fagositoz yapan iki hücre çeşidinden nötrofillerin fagositoz yaptıkları mikroorganizmayı öldürme güçleri makrofajlardan daha fazladır, ancak birkaç fagositoz yaptıktan sonra kendileride ölmektedir (Diker, 2005). Ayrıca, hücrenin mikroorganizmaya bağlanma ve içine alma işlemi o mikroorganizmanın kimyasal bileşiminde bağlıdır. Örneğin karbohidrat kaynaklı yapı veya *in vivo* olarak üretilen kapsül birçok patojenik bakterinin (*Aeromonas salmonicida* vb) makrofajlar tarafından ortamdan yok edilmesini zorlaştırmaktadır (Ellis, 1999). Makrofajlar içerisinde parazitik yaşam sürebilen bakterilerden *Renibacterium salmoninarum* da örnek verilebilir (Ellis, 1999). Ayrıca fagositler içerisinde çoğalabilen bakterilerde bulunmaktadır (Antychowicz ve Kozinska, 1993).

Makrofajlar ile nötrofil fagositozunun farkları (Arda, 1985; Barroso ve ark., 2000; Diker, 2005; Heinsbroek ve Gordon, 2007):

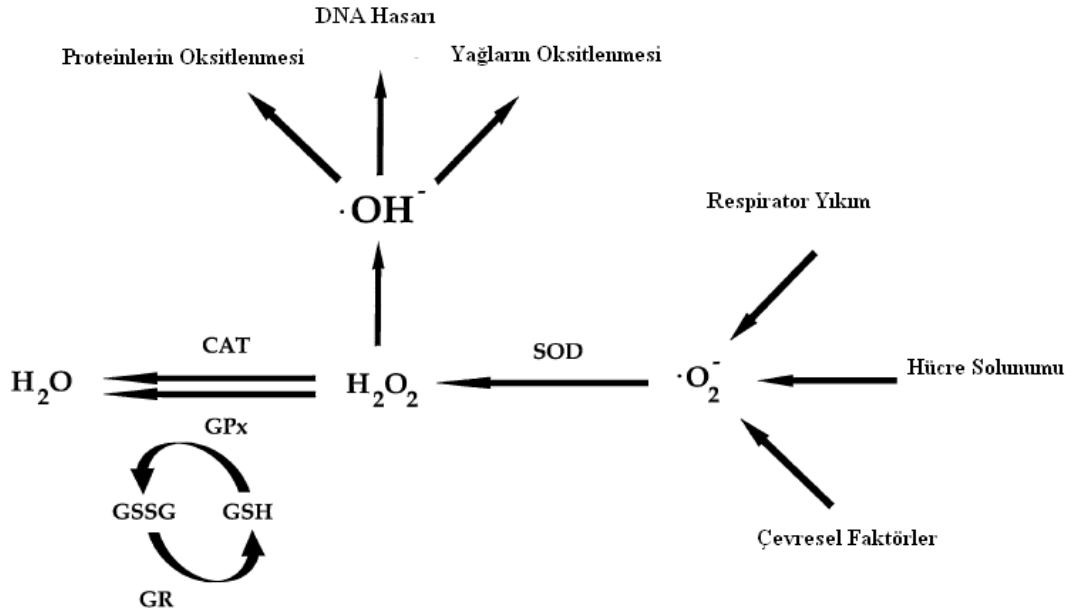
- ❖ Makrofajlar mikroorganizmalarla birlikte vücuda ait yaşlı, ölü, hasarlı hücreleri, bunların artıklarını ve inorganik maddeleride (partiküler karbon gibi) fagosite edebilirken nötrofiller sadece mikroorganizmaları fagosite edebilirler.
- ❖ Makrofajlar yaşamları boyunca sürekli ve defalarca fagositoz yapabilirken nötrofiller birkaç kez fagositoz yapıp ölürlür.
- ❖ Makrofajlarda sindirme ve öldürme aşamasında myeloperoksidaz enzimi yoktur. Bunun yerine nitrik oksit ve hidrojen peroksit bu görevi üstlenmiştir.
- ❖ Makrofajlar nötrofillerden farklı olarak antijen sunabilmektedirler. Ayrıca makrofajlar yara iyileşmesinde etkin rol üstlenmişlerdir. Yaralı bölgedeki ölü hücreleri ve hücre artıklarını uzaklaştırırlar ve dokunun yenilenmesini sağlayan büyüme faktörlerini salgırlar.
- ❖ Makrofajlar, bağışıklık yanıt mekanizmalarında görev alan 100'den fazla proteini sentezlemektedirler. Bu maddelerin bir kısmı fagositoz aşamasında bir kısımda sürekli olarak salgılanmaktadır. Bu ürünler arasında fagositozda salgılanan enzimler; lizozim, kollajenazlar, proteazlar, bağışıklık yanıtın faaliyetlerini düzenleyen sitokinler; interleukin-1, -6, -12 ve komplement molekülleri sayılabilir.
- ❖ Makrofajlar yangıda ve dolaylı olarak bağışıklık yanıtta rol alan prostaglandinlerden pıhtılaşma faktörlerine kadar çok çeşitli maddeleri de salgırlar.

#### **2.10.4.1.2. Balıklarda Solunum Patlaması (Respiratorik Yıkım)**

Balıklarda solunum patlaması olarakta bilinen respiratör yıkım vücuda giren yabancı bir partikülün hücre membranına bağlanmasından birkaç saniye sonra başlamaktadır. Devamında partikülün fagozom içinde yutulmasını takiben fagozom membranında devam etmektedir. Yabancı partikülün membrana bağlanmasıyla NADPH-oksidaz enzimi (membran enzimi) aktive olmaktadır (Gorczynski ve Stanley, 1999; Diker, 2005). NADPH-oksidaz enzimi oksijenden bir elektron ayırarak süperoksit anyon<sup>(1)</sup> oluşmasına neden olmaktadır (Arda, 1985; Zingg ve Azzi, 2005):

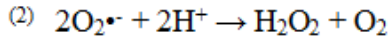


Süperoksit radikal üretimi ve indirgenmesinin şematik hali Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Süperoksit radikal üretimi ve indirgenmesi (Korkmaz ve ark., 2006)

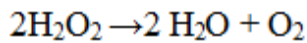
Ayrıca süperoksit radikal üretimi respirator yıkım dışında çevresel faktörler ve hücre solunumu gibi etkilerle üretilmektedir (Korkmaz ve ark., 2006). Devamında süperoksit dizmutaz (SOD) enzimi ile süperoksit anyonlar hidrojen peroksiti<sup>(2)</sup> oluşturmaktadır (Brown ve Netea, 2007):



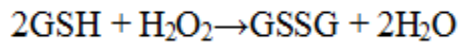
Meydana gelen hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) 3 farklı metabolizmayla (Şekil 2.7. ve Şekil 2.8.) indirgenmektedir:

- (1) Katalaz (CAT) ve glutathion peroksidaz (GPx) enzimleri tarafından indirgenir (Roitt ve Delves, 2001; Wolfe ve Manley, 2006):

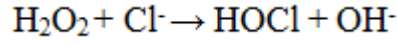
Katalaz ile indirgeme:



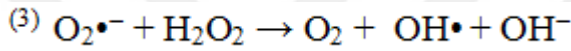
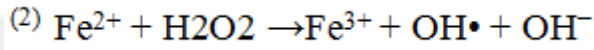
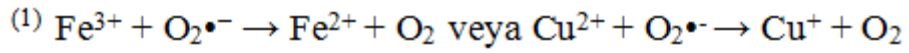
Glutathion peroksidaz ile indirgeme:



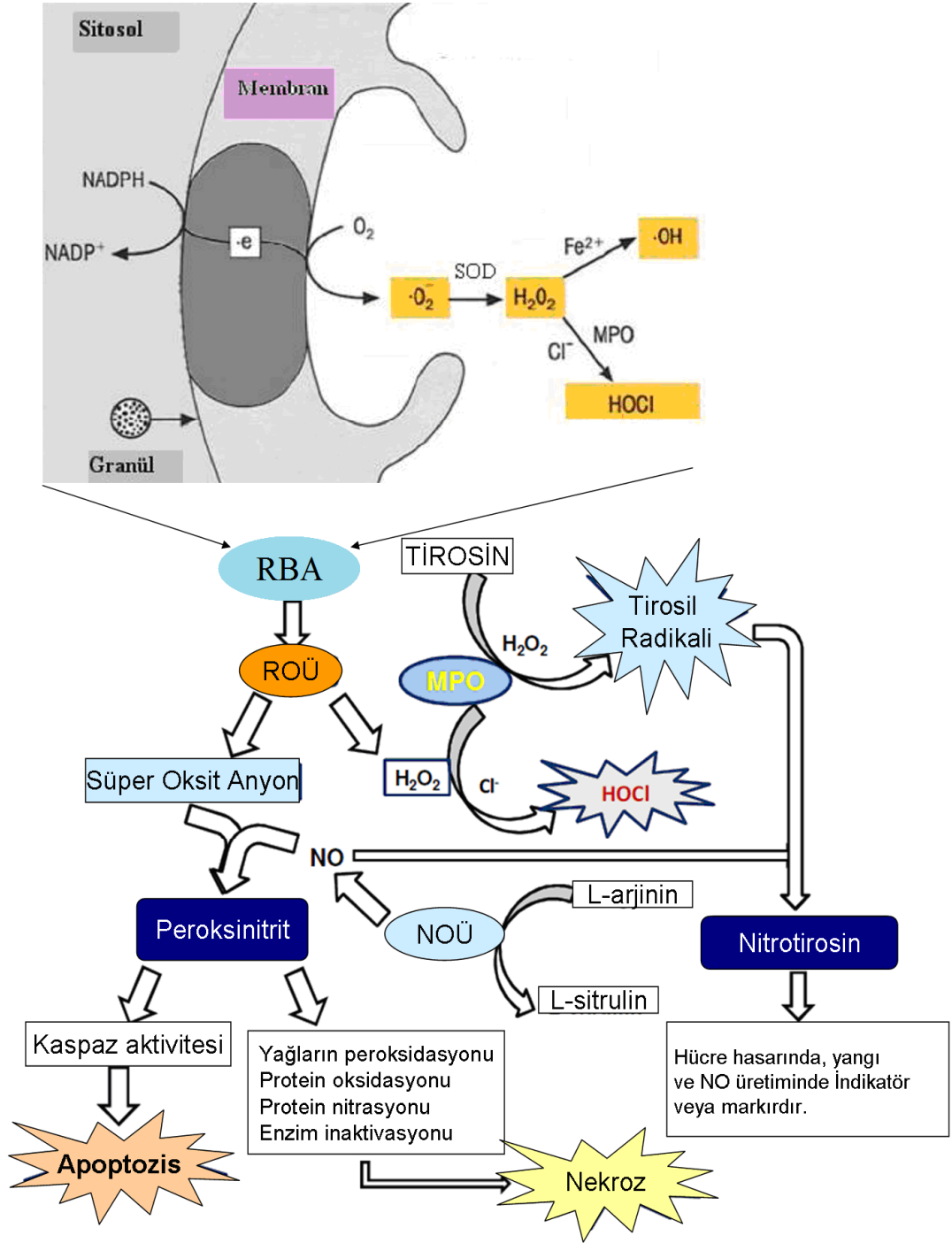
(2) Nötrofil hücrelerinin içerisinde myeloperoksidaz enzimi yardımıyla hidrojen peroksit, klorür (Cl<sup>-</sup>) iyonlarıyla reaksiyona girerek hipoklorit asit iyonlarını oluşturmaktadır (Laurence ve ark., 2006):



(3) Diğer bir mekanizmada hidrojen peroksit Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> vb. gibi metal iyonlarıyla katalizlenen Haber-Weiss indirgenme reaksiyonu ile yüksek toksik etkili hidroksi radikali oluşturmaktadır: Birinci tepkimede demir indirgenir <sup>(1)</sup>, sonrasında Fenton tepkimesi demir iyonları katalizörlüğünde gerçekleşir <sup>(2)</sup> ve en son reaksiyon sonucunda hidroksi radikal oluşmaktadır <sup>(3)</sup> (Gorczyński ve Stanley, 1999):



Yukarıda belirtilen reaksiyonlar oksidatif metabolizma olarak adlandırılmaktadır ve reaksiyonlar sonucunda oluşan hidrojen peroksit, hipoklorit asit veya hipoklorit bakterileri parçalamaktadır (Klebanoff, 1968; Diker, 2005). Ayrıca hipoklorit lizozomal enzimlerin etkiside artırır (Diker, 2005). Hipokloritin oluşmasında görevli protein yapılı myeloperoksidaz enziminin çalışmalarda analiz edilmesi bize nötrofillerin fagolizozomlar içerisindeki mikroorganizmaların öldürülebilme potansiyeli hakkında bize bilgi vermektedir (Siwicki ve ark., 1993; Quade ve Roth 1997). Ayrıca myeloperoksidaz enzimi mantarların hücre içi ölümünde de önemli rol üstlenmektedir (Arceci ve ark., 2006).



Şekil 2.8. Fagositik hücrelerin mikrobisidal mekanizması (Roitt ve Delves, 2001; Srivastava ve Pandey 2015)

Ayrıca düşük pH, lizozim, laktoferrin gibi bakteristatik ve bakterisit faktörler oksijene bağımlı olmayan öldürme mekanizmaları olup anaerobik koşullarda aktivite gösterirler ve proteolitik enzimler ve çeşitli hidrolitik enzimlerle öldürülen mikroorganizmaları sindirerek parçalar ve artık ürünleri hücre dışına bırakmaktadırlar

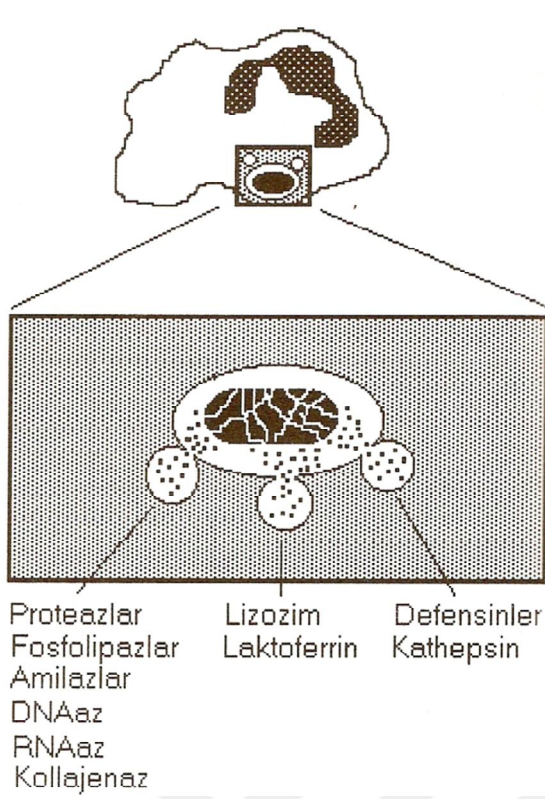
(Candan ve Karataş 2010). Fagositik hücrelerin mikrobisidal mekanizması Şekil 2.8.'de özetlenmiştir (Roitt ve Delves, 2001; Srivastava ve Pandey 2015).

#### **2.10.4.1.3. Balıklarda Lizozomal Enzimler**

Balıklarda lizozim, serumda, bağırsak, deri vb. mukus tabakalarında, lökosit hücreleri açısından zengin karaciğer, dalak ve mide gibi organlarda bulunmaktadır. Beyaz kan hücrelerinden monosit ve nötrofiller ile makrofajlar lizozim açısından oldukça zengin kaynaklardır (Ellis, 1990). N-asetilglukosamin ve N-asetilmuramik olarak bilinen iki adet spesifik substratı olan lizozimin özellikle Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal özelliği vardır (Osserman ve Lawlor, 1966). Lizozim gram negatif bakterilere direkt etki etmesinde komplementler ve diğer enzimler yardımıyla bakterinin hücre duvarı eridikten sonra etkili olabilmektedir (Yano, 1996). Lizozim direkt etkide kan serumunda bulunan bakterileri hedef alır ve onları fagositoza hazırlayan bir madde rolündedir veya direkt olarak polimorfonükleer lökositler ile makrofajları aktive etmektedir (Ellis, 1990).

Hücre içerisinde bulunan lizozomlar, hücre yabancı bir maddeyi yuttuktan sonra fagozomla birleşmekte (bu yapıya fagolizozom denir) ve içindeki enzimleri boşaltmaktadırlar (Şekil 2.6.). Lizozomal enzimler (Şekil 2.9.) bakteri çeperini parçalamak suretiyle birçok mikroorganizma üzerinde öldürücü etki gösterebilirler. Lizozomlar içerisinde bir çok antimikrobiyal maddeler mevcuttur. Bunlar arasında (Diker, 2005);

- ❖ Bakterisidal enzimlerden lizozim; gram pozitiflerin hücre duvarını parçalayarak etki eder,
- ❖ Proteolitik enzimlerden elastaz;
- ❖ Hidrolitik enzimlerden kathepsin;
- ❖ Protein yapılı olan defensin; lipid tabakasına etki ederek bakteri ve mantarların hücre membranını ve zarflı virusları parçalamaktadır,
- ❖ Protein yapıda olan diğer bir etkili madde de laktoferrindir ve demiri bağlayarak bakterinin üremesi için gerekli olan besin tuzunu ortamdan uzaklaştırır.



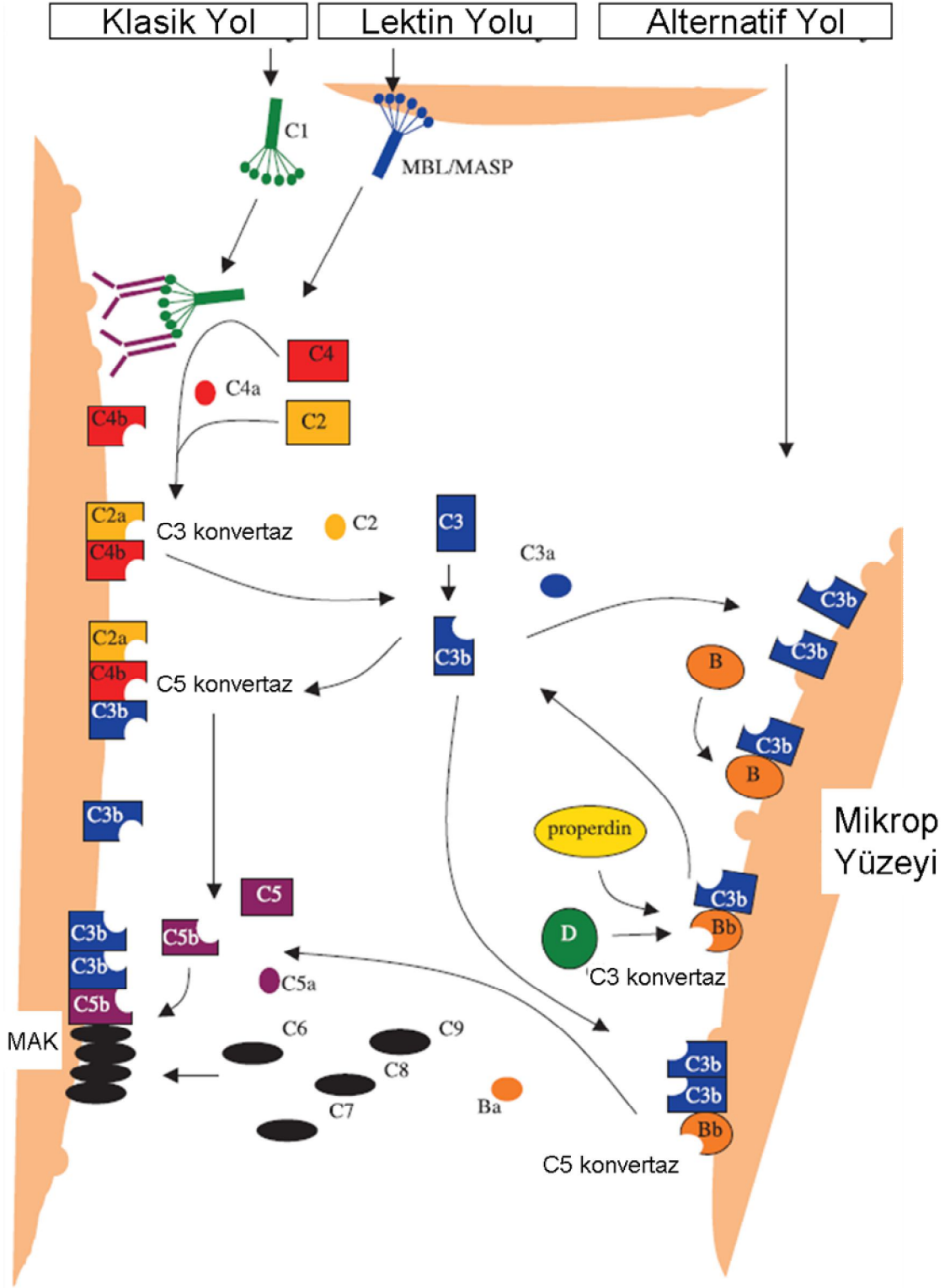
Şekil 2.9. Lizozomal enzimler (Diker, 2005)

#### 2.10.4.1.4. Kompleman

Kompleman terimsel olarak tamamlayan-tümleyen anlamına gelmekte ve omurgalıların kan serumunda bulunan kompleks protein sistemini kapsamaktadır (Candan ve Karataş 2010). Kompleman sistem yaklaşık 35 farklı çözünebilir ve membrana bağlı proteinlerden oluşmaktadır (Holland ve Lambris 2002).

Bu sistem kemikli balıklarda üç ana yol (Şekil 2.10.) ile açıklanabilir (Holland ve Lambris 2002; Candan ve Karataş 2010):

- ❖ Birincisi klasik yoldur ve antijen-antikor kompleksi vasıtasıyla.
- ❖ İkincisi lektin yoludur ve bakteri hücre yüzeyindeki mannanlara mannoz bağlayan lektin (MBL) proteinlerinin bağlanması ile aktive edilmektedir.
- ❖ Üçüncüsü ise alternatif yoldur ve antikordan bağımsız bir şekilde direkt olarak mikroorganizmalar tarafından aktive edilmektedir.
- ❖ Kompleman sistemi kapsayan aktif proteinler mikropların öldürülmesi, fagositoz, enflamatuar reaksiyonlar, immün komplekslerin kaldırılması ve antikor üretiminde rol almaktadırlar.



Şekil 2.10. Koplemen aktivasyonundaki üç ana yolun şematik gösterimi (Holland ve Lambris 2002) MAK: Membran Atak Kompleksi, MBL: MannoZ Bağlayan Lektin, MASP: Mannan İlişkili Serin Proteaz



Ayrıca balıklarda C-reaktif proteinler, transferrin, lektinler, laktoferrin, serüloplazmin, doğal aglütininler ve interferonlar diğer humoral (sıvısal) faktörleri kapsamaktadır.

#### **2.10.4.1.5. Proteinaz**

Humoral (sıvısal) faktörlerden biridir. Proteinaz, proteinleri parçalayan enzimlerin genel adıdır. Patojen bakteriler proteolitik enzimler üreterek içerisine girdikleri konakçının dokularına hasar verirler. Ancak serum ve diğer vücut sıvılarında yer alan proteaz inhibitörleri bu durumu önlemek ile görevlidir (Bowden ve ark., 1997). Ayrıca bu inhibitörler akut faz reaksiyonlarına katılmaktadırlar (Magnadottir, 2006). Daha önce *O. mykiss*, *Salmo salar*, *Salvelinus alpinus*, *Pollachius virens*, *Gadus morhua* ve *Pleuronectes platessa* balıklarında proteaz ile birlikte tripsin benzeri aktivite tespit edilmiştir (Yano, 1996). Ayrıca balık plazması birçok proteaz inhibitörü içermektedir. Bunlar  $\alpha$ 1-antiproteaz,  $\alpha$ 2-antiplazmin ve  $\alpha$ 2-makroglobulin inhibitörleri olup *in vivo* çalışmalarda bakterilerin yaşama kabiliyetlerini sınırlandırmaktadırlar (Ellis, 2001; Newaj - Fyzul ve ark., 2007).

#### **2.10.4.2. Balıklarda Spesifik Bağışıklık Sistemi**

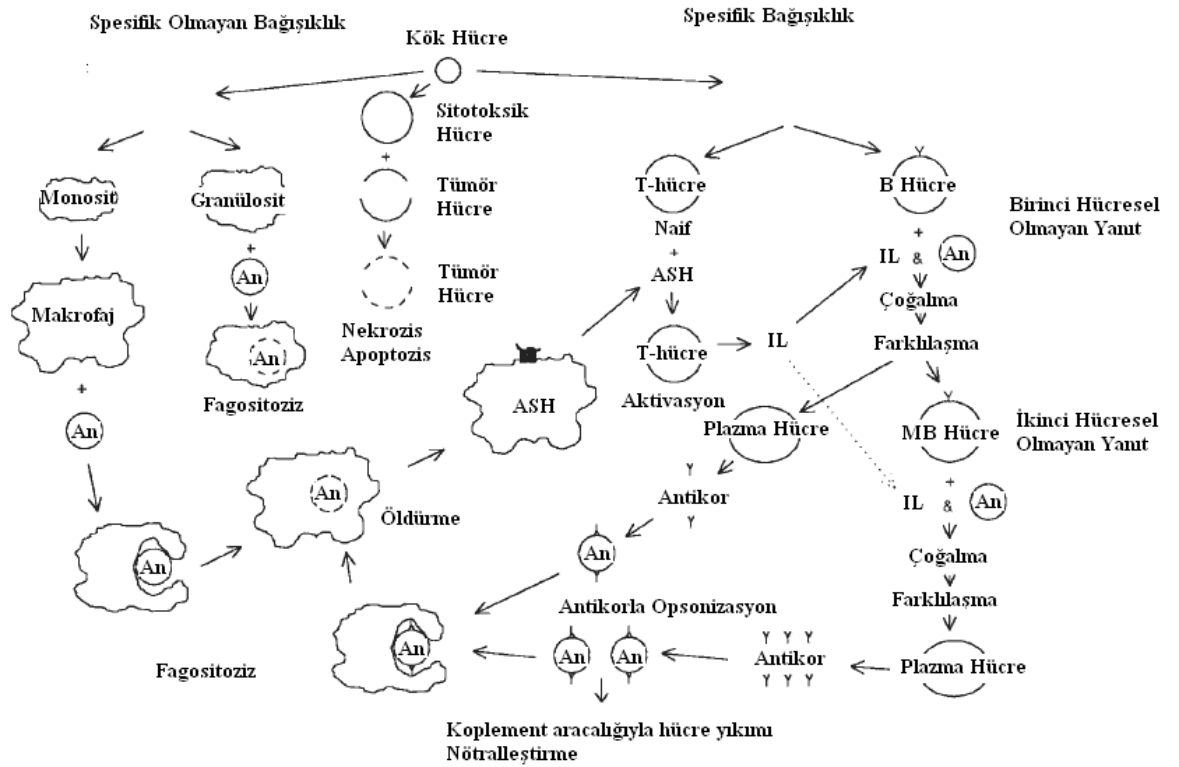
Balıklarda kazanılmış (spesifik) bağışıklık ise (Şekil 2.11.) belli bir antijeni özel olarak tanıyan spesifik lenfositlerin uyarılması ve aktive olmasıyla ortaya çıkmaktadır (Diker, 2005). Bu sistem humoral (hücresele olmayan) immün savunma ve hücresele savunma olmak üzere iki mekanizma altında değerlendirilir (Manning ve Nakanishi, 1996; Kaattari ve Piganelli, 1996). Hücresele olmayan savunma; glikoprotein yapıda olan antikor molekülü immunoglobulinlerin (Ig) ile ilişkili savunma sistemi olup kemikli balıklarda IgM, IgD ve IgT, kıkırdaklı balıklarda ise IgM dir (Roberts, 2001; Candan ve Karataş 2010). Bu sistem B lenfositlerin uyarılmasını takiben antikor üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu antikorların fonksiyonlarına bakılacak olursa (Candan ve Karataş 2010):

- ❖ Antijen - antikor komplekslerini oluşturarak fagositoz aracılığı ile ortadan kaldırılmalarını sağlamaktadır.
- ❖ Patojenleri aglütine ederek hareketsiz hale getirmek ve fagositoza hazırlamaktadır.
- ❖ Toksikantları ve viral etkenleri nötrüleyerek zararsız forma sokmaktadır.
- ❖ Komplemanı aktifleştirmektedir.
- ❖ Patojenlerin mukozaya yerleşmesine engel olmaktadır.

- ❖ Hüresel bağışıklıkta (antikora bağlı) görev almaktadır.
- ❖ Alerjik reaksiyonlarda görevlidir.

Hüresel savunma ise bazı T lenfositlerin uyarılması sonucu gelişen ve başta sitotoksik T lenfositler olmak üzere farklı efektör hücrelerin aktive olması ile sonuçlanan savunma mekanizmasıdır (Stoskopf, 1993; Diker, 2005). Hüresel savunmada makrofajlar spesifik olarak bir antijeni değilde tüm antijenleri fagosite ederek T lenfositlere antijen sunar. Bu sistemde T lenfosit kolonları katil hücrelere, lenfokin üreten hücrelere ve baskılayıcı (supresör) hücrelere dönüşmektedir (Candan ve Karataş 2010).

Bu kısma kadar incelenmiş olan spesifik olmayan ve spesifik bağışıklık sisteminin balıklardaki genel görünüşü Şekil 2.11.'de verilmiştir.



Şekil 2.11. Balıklarda spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi. An: Antijen, ASH: Antijen sunan hücre, IL: interlökin (Noguchi, 1998)

### **2.10.5. Balıklarda Kullanılan Bağışıklık Arttırıcı Katkı Maddeleri**

Balık yemlerine ilave edilerek veya enjeksiyon, banyo gibi diğer uygulamalar ile balıklarda kullanılan bağışıklık arttırıcılara izelge 2.9.'de yer verilmiştir (Sakai, 1999). Günümüzde ise tüm bu katkılara alternatif olarak ve/veya yenilerini geliştirmek amacıyla tıbbi bitkiler (Yılmaz ve ark., 2012; 2013; 2014; 2016; Yılmaz ve Ergün 2014), bitkisel saponinler (Francis ve Becker 2007), probiyotikler (Mohapatra ve ark., 2013; Prez - Snchez ve ark., 2014), algler (Nakagawa ve Montgomery 2007), prebiyotikler (Ringo ve ark., 2010), nükleotitler (Delbert ve ark., 2007) ve organik asitler (Ng ve Koh 2016) ile ilgili çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.



Çizelge 2.9. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan bağışıklık arttırıcılar

<b>Kullanılan Bağışıklık Arttırıcılar</b>
<b>1. Sentetik Kökenli Kimyasallar</b>
1.1. Levamisole
1.2. FK- 565
1.3. Muramyl dipeptide (MDP)
<b>2. Biyolojik Kökenli Maddeler</b>
<b>2.1. Bakteriyal Ürünler</b>
2.1.1. $\beta$ -Glukan
2.1.2. Peptidoglukan
2.1.3. FCA
2.1.4. Lipopolisakkarit
2.1.5. <i>Clastridium butyricum</i> hücreleri
2.1.6. <i>Achromobacter stenohalis</i> hücreleri
2.1.7. <i>Vibrio anguillarum</i> hücreleri
<b>2.2. Polisakkaritler</b>
2.2.1. Kitin
2.2.2. Kitosan
2.2.3. Lentinan
2.2.4. Schizophyllan
2.2.5. Oligosakkarit
<b>2.3. Hayvan ve Bitki Ekstraktları</b>
2.3.1. Ete (Tunicate)
2.3.2. Hde (Abalone)
2.3.3. Kalamar
2.3.4. Quillaja saponin
2.3.5. Meyan kökü
<b>2.4. Besleyici Faktörler</b>
2.4.1. Vitamin C
2.4.2. Vitamin E
<b>2.5. Hormonlar Sitokinler ve Diğerleri</b>
2.5.1. Büyüme hormonu
2.5.2. İnterferon
2.5.3. Laktoferrin
2.5.4. Prolaktin

## **2.10.6. Balıklarda Kan Biyokimyası**

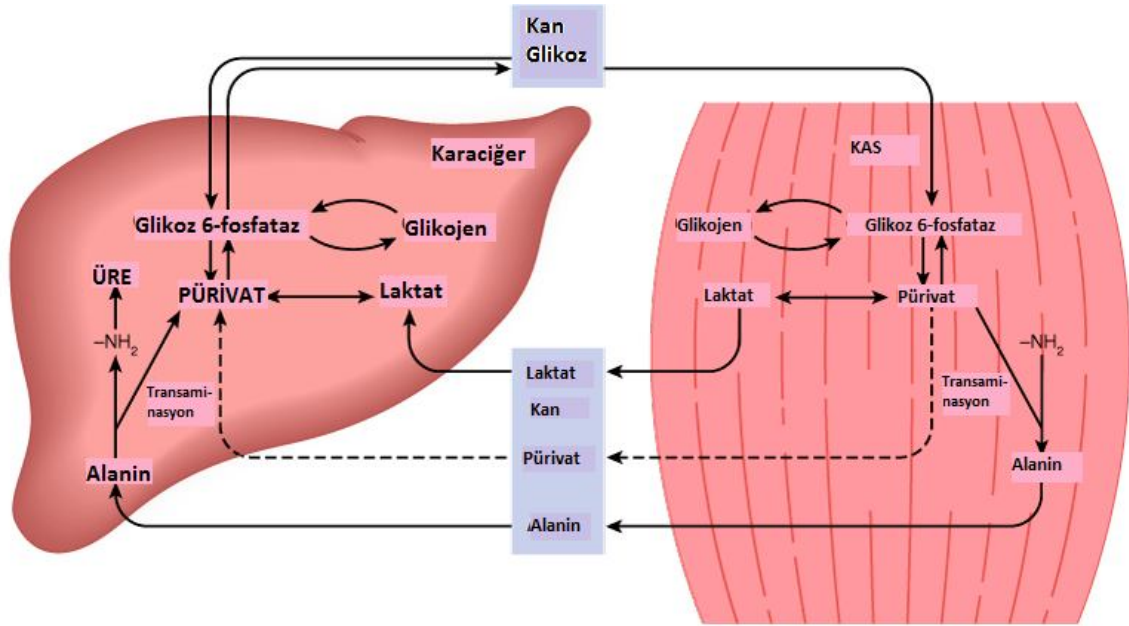
### **2.10.6.1. Plazma**

Kan damarlarının içerisindeki kanın sıvı olan kısmına plazma denilmektedir. Plazma vücuttaki birçok metabolik faaliyette önemli rol oynamaktadır. Plazma içerisinde sindirilmiş besin maddeleri, mineraller, özel salgılar, doku atıkları, enzimler, erimiş gazları ve antikorlar bulunmaktadır. Plazmanın neredeyse %90'ından fazlasını su oluştururken yaklaşık %7'si proteindir. Geri kalan kısmı ise glikoz, inorganik tuzlar, üre ve diğer metabolizma atıklarıdır. Plazma tüm bu yapıları taşımakla görevlidir (Timur, 2006).

Kan plazmasında balıkların sağlık durumu hakkında bize bilgiler veren glikoz, toplam protein, albumin, globulin, bilirubin, üre (BUN), ürik asit, kreatinin, lipaz, amilaz, trigliserit, kolesterol, ALP, GOT, GPT, kreatin kinaz, Ca, Mg, Fe, P ve Cl parametreleri rutin olarak çalışılan biyokimya analizleridir.

### **2.10.6.2. Glikoz**

Kan glikozu balıklar beslenmesi ve stres durumuna bağlı olarak değişebilen önemli bir fizyolojik göstergedir. Özellikle balıkların ellenmesinde, taşınmasında, oksijen azlığında, hastalıklarda ve yoğun stoklamada artış göstermektedir (McDonald ve Milligan, 1992). Kanda artış gösteren glikoz miktarı kaslarda kortizolün, karaciğerde ise adrenalin ve stres hormonlarının tetiklenmesine neden olmaktadır (Morgan ve Iwama, 1997). Stres dışında beslenmeye bağlı olarak glikoz artabilmektedir. Beslenmeden sonra vücuda alınan glikoz önemli bir enerji kaynağıdır ve fazlası; karaciğerde ve kasta glikojen, adipoz dokuda ise trigliserid olarak depolanır (Adam ve Arıçoğlu, 2002). Ancak depo edilen glikoz belirli bir miktarı aştıktan sonra fazla olan kısmı kana tekrar salınmaktadır (Ulukaya, 1998). Bu durumda kandaki glikoz seviyesi tekrardan artmaktadır. Ayrıca balıklarda karbohidrat ağırlıklı besleme nedeniyle de glikoz seviyeri yükselmekte ve insanlardaki diabetik durum gibi olmasada, çoğu zaman balıklarda büyümenin yavaşlamasıyla sonuçlanmaktadır (Wilson, 1994; Moon, 2001). Glikoz metabolizması Şekil 2.12.'de gösterilmiştir (Murray ve ark., 2009).



Şekil 2.12. Glukoz metabolizması (Murray ve ark., 2009)

### 2.10.6.3. Kan Proteinleri

Kan proteinlerini; globulinler, immunoglobulinler (antikorlar), albumin, lipitleri taşıyan lipoproteinler (HDL ve LDL), seruloplazmin (bakır ve kalsiyumu bağlar), vitellogenin (kalsiyum bağlar), transferrin (metalleri bağlar), iyoduroforin (anorganik iyodu bağlar), hormon bağlayan proteinler ve kanın pıhtılaşmasını sağlayan fibronojen ve protrombinden oluşmaktadır (McDonald ve Milligan, 1992; Başusta, 2005; Timur, 2006).

Kandaki toplam protein ve globulin spesifik olmayan bağışıklık sisteminin birer elemanı olarak değerlendirilmektedirler (Magnadóttir, 2006). Balıklarda elleme ve benzeri stres kaynakları ile balıkların uzun süre aç kalması sonucunda plazma proteini baskılanmaktadır (Satchell, 1991; McDonald ve Milligan, 1992). Plazma protein seviyelerindeki artış veya azalışlar kötü su ortamı ve kalitesiz beslenmenin indikatörü olarak değerlendirilebilmektedir (Morgan ve Iwama, 1997).

Albumin ve globulinler birçok balıkta ana plazma proteinlerini oluşturmaktadır. Ancak balıklarda plazma albumin seviyeleri, globulin seviyelerine nazaran daha azdır, ayrıca bazı balıklarda hiç albumin bulunmamaktadır (Gunter ve ark., 1961). Albuminin iki önemli görevinden birincisi serbest yağ asitlerinin taşınması diğeri ise osmotik basıncın kontrolüdür (Satchell, 1991; McDonald ve Milligan, 1992). Globulin ise organizma içerisindeki demirin taşınmasında (Fänge, 1986) ve cinsiyet hormonlarının bağlanmasında görevlidir (Janz ve Weber, 2000). Ayrıca herhangi bir çevresel etkiye, patojene, kimyasala vb., etkenlere maruz kalmadan toplam protein, globulin ve albumin seviyelerindeki artış

balıklarda bağışıklığın güçlendiğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Wiegertjes ve ark., 1996).

#### **2.10.6.4. Kan Yağları**

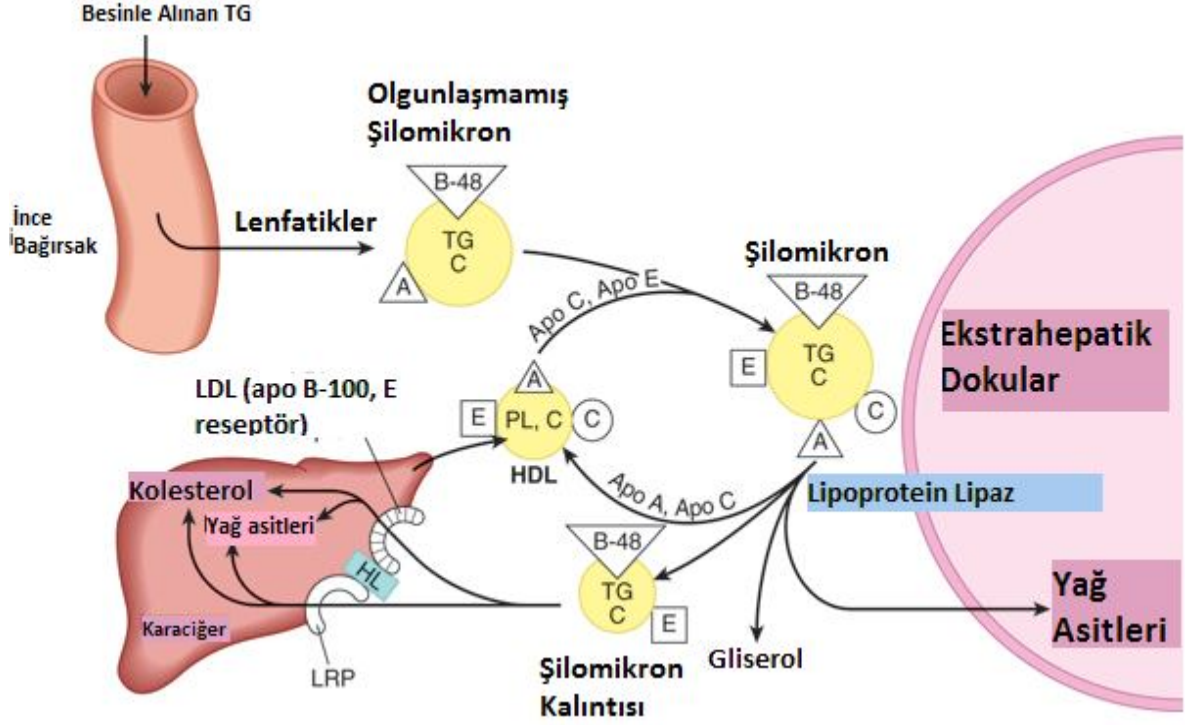
Balıklarda kan yağları; yağ asitlerini, fosfolipitleri ve kolesteroller ile onların esterlerini kapsamaktadır. Özellikle balıklarda trigliseritler ve fosfolipidler en bol bulunan yağ gruplarıdır (McDonald ve Milligan, 1992). Fosfolipidler serbest yağ asitlerinin emilimini arttırmakta ve böylece balıkların daha iyi gelişmesini sağlamaktadırlar (Geurden ve ark., 1997; Hadas, 2003). Trigliseritler ise yağ depolarındaki ve besinlerdeki en çok bulunan yağ kaynağıdır ve enerjinin taşınmasından depolanmasına kadar görevlidir. Kolesterol tüm hücre membranları için esansiyeldir, safra asit ve steroid hormonlarının biyosentezlerine öncülük etmektedir (Gaw ve ark., 1999; Mayes ve Botham, 2003a, 2003b).

Yağlar suda çözünemediklerinden tüm omurgalılarda ve böceklerde plazma içerisinde yer alan proteinler vasıtasıyla taşınmakta ve yağların bu şekline lipoprotein denilmektedir (Jonas, 2002). Lipoproteinler yoğunluklarına göre; şilomikronlar, VLDL, LDL ve HDL olarak sınıflandırılmaktadırlar (Karagül ve ark., 2000). Yağların taşınması insanlarda olduğu gibi balıklarda da endojen ve eksojen olarak meydana gelmektedir (Sheridan, 1988).

Eksojen sistemde besinle alınan yağlar karaciğere taşınmaktadır (Şekil 2.13.). Bu işlev insanlarda olduğu gibi balıklarda da şilomikronlar vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir (Babin ve Vernier, 1989; Mehmetoğlu, 2007). Endojen yağlar ise vücutta sentezlenen yağlardır. Bu yağlar karaciğerde sentezlendikten sonra periferik dokulara taşınırlar (Ulukaya, 1998). VLDL endojen trigliserid bakımından oldukça zengin olup karaciğerde sentezlenmektedir (Şekil 2.14.). VLDL nin görevi karaciğerde sentezlenmiş olan trigliserid ve kolesterolün ekstrahepatik dokulara taşınmasıdır. VLDL özellikle organizmada enerji yükünün fazla olduğu durumlarda artış göstermektedir. LDL ise damar içinde VLDL nin artışı olarak sentezlenmektedir. LDL karaciğerde, ekstrahepatik dokuda ve makrofaj hücrelerinde katabolize edilmektedirler (Babin ve Vernier, 1989; Mehmetoğlu, 2007; Garcia ve ark., 2009).

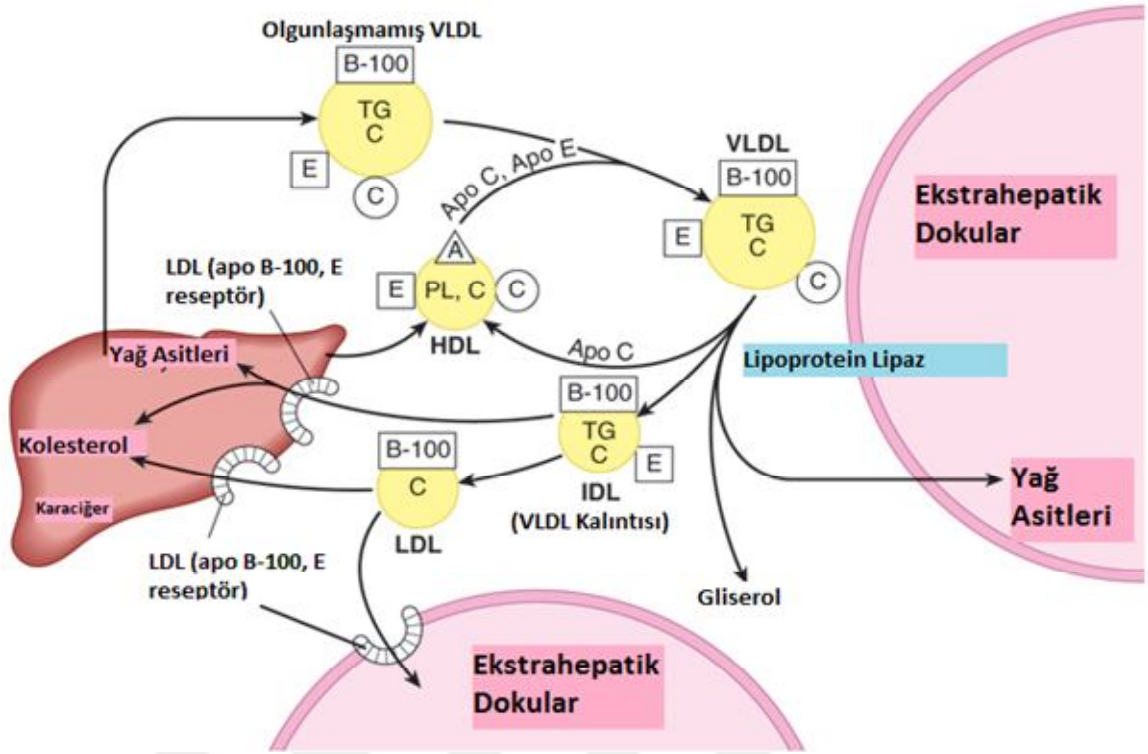
HDL ise karaciğerde katabolize edilmektedir ve en önemli görevi dokulardan karaciğere kolesterolün taşınmasıdır (Şekil 2.15.). Bu olay ters kolesterol taşınması olarak ifade edilir ve safra asitlerinin sentezini arttırmaktadır (Mayes ve Botham, 2003b; Mehmetoğlu, 2007). Balıklarda yağlar optimum gelişim ve enerji için gereklidir. Ancak

fazla tüketilen yağ organlarda depo edilmekte ve balık sağlığını olumsuz etileyerek metabolik dengesizliklerin oluşmasına neden olmaktadır (Luo ve ark., 2005). Bu durum kan yağlarındaki artışla tespit edilebilmektedir.

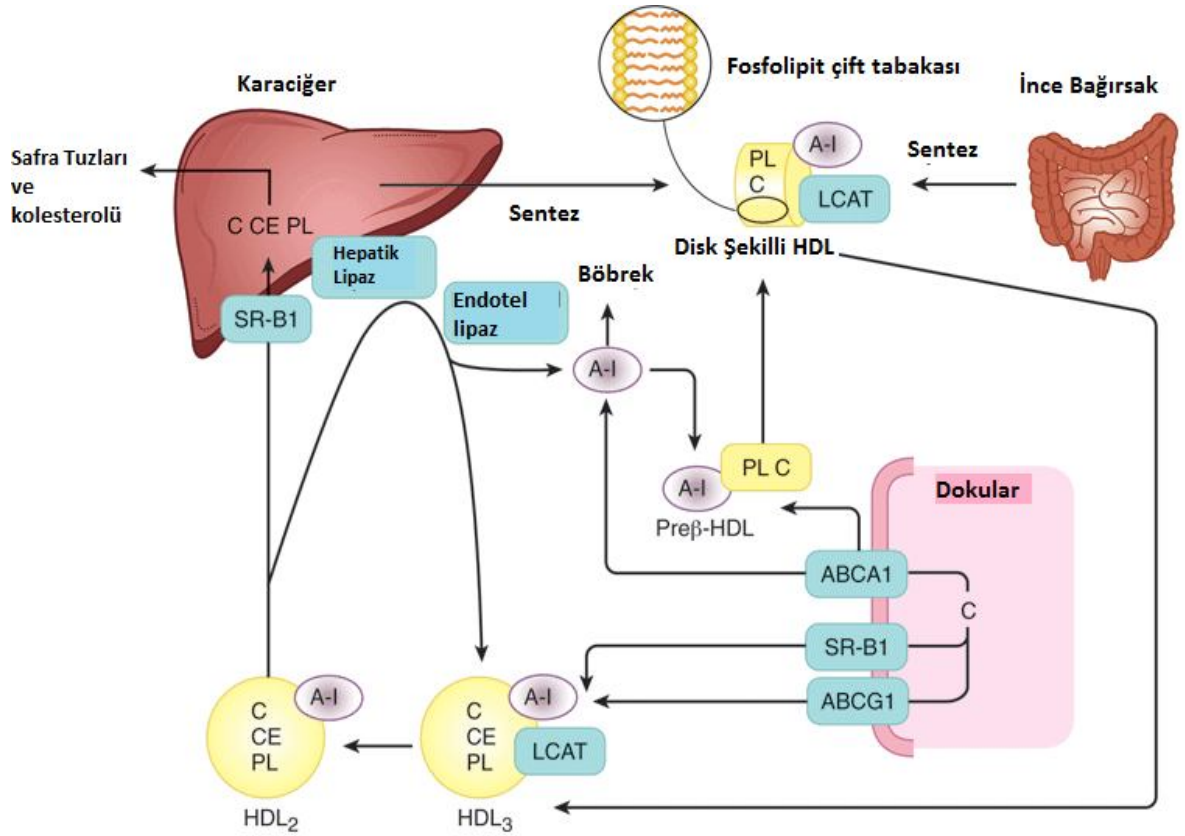


Şekil 2.13. Eksojen yağların metabolizması (Murray ve ark., 2009). A, apolipoprotein A; B-48, apolipoprotein B-48; C, apolipoprotein C; E, apolipoprotein E; TG, triasilgliserol; C, Kolesterol ve kolesterol esteri; PL, fosfolipit; HL, hepatik lipaz; LRP, LDL-reseptör ile ilişkili protein





Şekil 2.14. VLDL metabolizması ve LDL nin üretimi (Murray ve ark., 2009). (A, apolipoprotein A; B-100, apolipoprotein B-100; C, apolipoprotein C; E, apolipoprotein E; TG, triasilgliserol; IDL, orta yoğunluklu lipoprotein; C, kolesterol ve kolesteril esteri; PL, fosfolipit)



Şekil 2.15. HDL metabolizması (Murray ve ark., 2009). (LCAT, lsitein:kolesterol asiltransferaz; C, kolesterol; CE, kolesterol esterleri; PL, fosfolipid; A-I, apolipoprotein A-I; SR-B1, radikal temizleyici reseptörler B1; ABCA 1, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1; ABCG1, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G1.)

### 2.10.6.5. Kan Enzimleri

Balıklarda lipaz, amilaz, GOT, GPT, LDH, ALP ve kreatin kinaz, kan enzimlerini oluşturmaktadır.

Lipaz, yağların sindiriminden görevli olup kaynağını pankreatik dokular oluşturmaktadır (Brix, 2002). Balıklarda pankreas, karaciğer, pilorik seka, mide ve bağırsak lipazın bulunduğu yerlerdir (Chesley, 1934; Tramati ve ark., 2005). Balıklarda serum lipazın kaynağı tam olarak bilinmemekle birlikte; adipoz dokudan sızıntı şeklinde seruma geçtiği düşünülmektedir (Wagner ve Congleton, 2004). İnsanlarda serum lipaz seviyelerindeki artışlar pankreasla ilgili bir sorunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Mehmetoğlu, 2007). Ancak bu durum balıklarda farklı şekillerde yorumlanabilir.

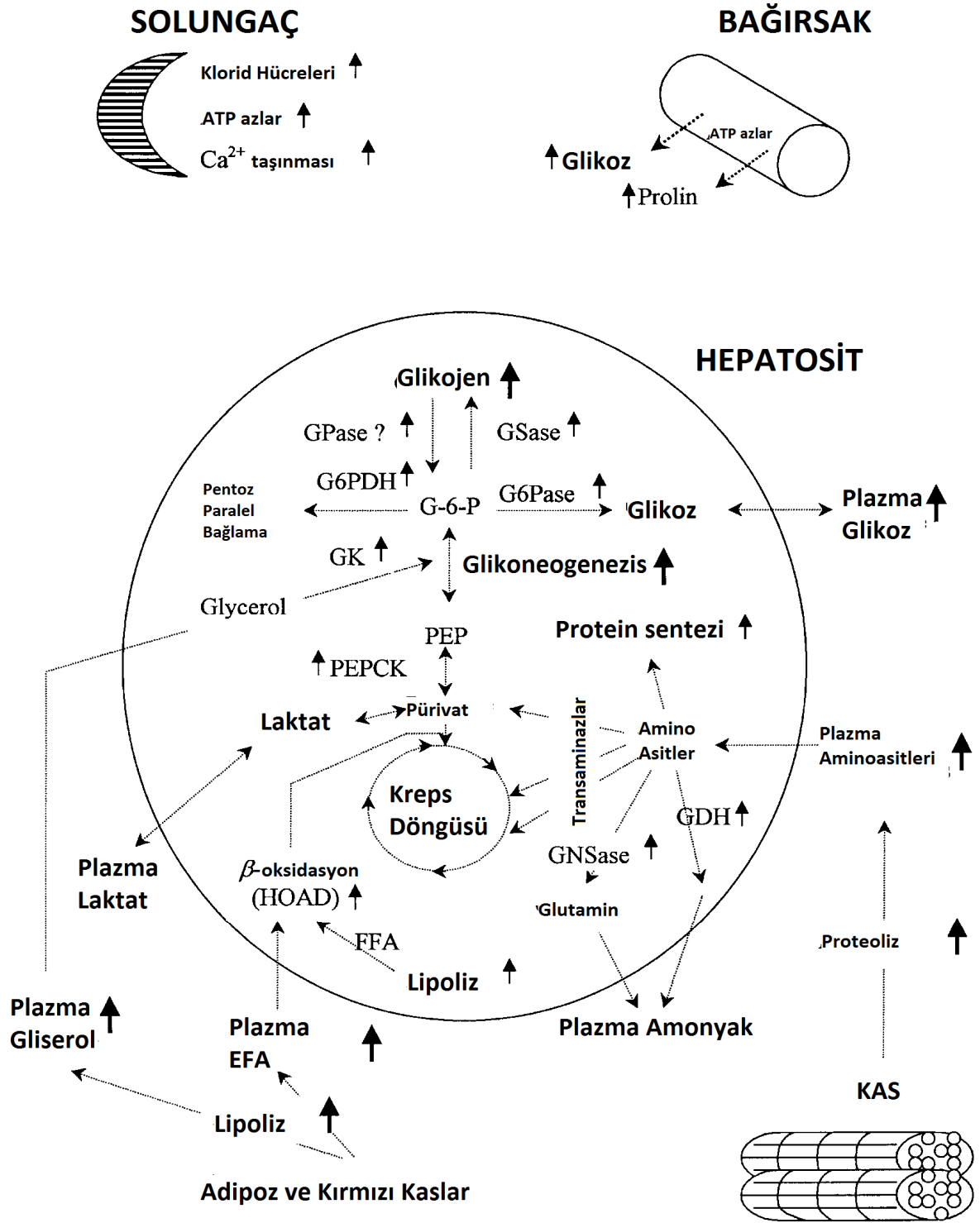
Balıklarda amilaz özellikle pankreastan bağırsaklara salgılanmaktadır ve ayrıca karaciğer, pilorik seka ve safrada da bulunabilmektedir (Chesley, 1934; Papoutsoglou ve Lyndon, 2003). Amilaz, karbohidratların sindiriminde görevli olup balıklarda serum amilaz

seviyesi beslenme tipine veya yaşadıkları bölgeye göre değişebilmektedir (Brix, 2002; Dunham, 2004). Örneğin amilaz aktivitesi hem etçil hem otçul ve otçul balıklarda etçil balıklar da oranla daha fazladır (Wilson, 1994; Fernandez ve ark., 2001; Dabrowski ve Guderley, 2002). Ancak etçil beslenen balıkların yetiştiriciliği yapıldığında, serum amilaz aktivitelerinin aynı türün doğal ortamdan yakalanan bireylerinde daha yüksek olduğu bilinmektedir (Percin ve Konyalioglu, 2008). Balıklarda serumda artan amilaz seviyeleri besinden gelen karbonhidrat kaynaklı olup, normal değerlerin üstüne çıkması; karaciğer ve pankreastaki sorunların göstergesi olarak kabul edilmektedir (Nwamba ve ark., 2006; Hart ve ark., 2010).

Balıklarda serum enzimleri olan GOT, GPT, CK, LDH ve ALP nin seviyelerindeki değişimler doku ve organlardaki hasarların birer göstergesi olarak rutin biyokimya da değerlendirilmektedir (Campbell, 2004). Bu enzimlerden GOT, GPT, LDH ve ALP balıklarda karaciğer enzimleri olup bu dokudaki sorunların tespitinde faydalı birer araçtırlar (Campbell, 2004; Hart ve ark., 2010). Ayrıca balıkların derisinde oluşan lezyonlarda, kas dokusunda ve beyinde oluşan hasarlarda CK ve GOT enzimlerinin seviyeleri serumda artmaktadır (Messenger ve ark., 1992). Bununla birlikte balıklarda artan GOT seviyeleri hızlı büyümeninde bir göstergesi olabilmektedir (Dunham, 2004). Balıklarda hastalık veya herhangi bir kontaminant dışında yaş arttıkça enzim seviyeleride değişebilmektedir. Örneğin balık yaşı arttıkça ALP miktarı azalmaktadır (Stoskopf, 1993). Bununla birlikte serum ALP seviyeleri yemden gelen fosfor miktarıyla ilişkili olarak artış gösterebilmektedir (Eya ve Lovell, 1998).

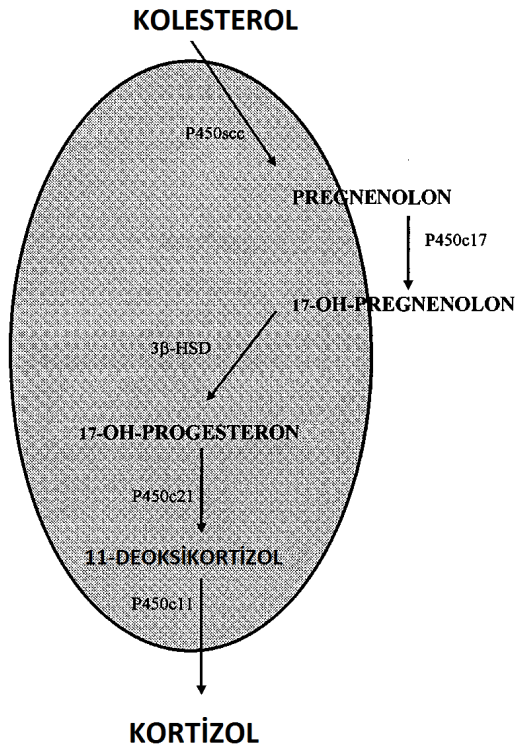
#### **2.10.7. Balıklarda Kortizol**

Balıklarda kortizol diğer canlılarda olduğu gibi stresin göstergesi olan önemli bir hormondur. Kanda katekolaminlerin ve kortizolün artması birincil olarak stresin göstergesi olup bu hormonlar vücuttaki çeşitli dokularda hemen değişiklikler başlatır ve canlının herhangi bir stres kaynağına karşı tepki göstererek korunmasını, hayatta kalmasını ve muhtemel zararın önlenmesini sağlamaktadırlar (Pottinger, 2008). Kortizolün balıklar üzerindeki metabolik etkileri Şekil 2.16.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Kortizolün balıklar üzerindeki metabolik etkileri (Mommsen ve ark., 1999). ?: Muhtemel etkiler, FFA, serbest yağ asitleri; HOAD, 3-hidroksiasil-koenzim A dehidrogenaz; GDH, glutamat dehidrogenaz; GK, gliserol kinaz; GNSase, glutamin sentetaz; GPase, glikojen fosforilaz; GSase, glikojen sentaz; G6Pase, glikoz 6-fosfotaz; G6PDH, glikoz 6-fosfotaz dehidrogenaz; PEP fosfoenolpiruvat; PEPCK, fosfoenolpiruvat karoboksikinaz

Kortizol salgısı hipotalamus-pituitari-interrenal eksenin kontrolü altındadır (Mommsen ve ark., 1999). Ön pituitör bezden salınan adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortizol için ana uyarıcıdır (Jobling, 1996; Mommsen ve ark., 1999). Kortizol, memelilerde böbrek üstü bezlerinden salgılanmaktadır. Ancak balıklarda memelilerde olduğu gibi ayrı bir böbreküstü bezi yoktur. Bunun yerine ön böbreğin posterior kardinal damarlar ve dalları boyunca yayılmış steroidojenik hücreler vardır (Milano ve ark., 1997). Bu steroidojenik hücreler (katekolaminleri salgırlar) kromafin hücrelerine çok yakın bir yerde yer alırlar ve bu hormonların salınımında parakrin kontrolü olasılığını artırırlar (Reid ve ark., 1996). Balıklarda kortizolün biyosentezi (Şekil 2.17.), memelilerdeki benzer olup 21-hidroksilasyon (P450c21), 17-hidroksilasyon (P450c17) ve 3-hidroksi steroid dehidrojenasyon (3-HSD) dahil olmak üzere mikrozomal enzimatik yolları içermektedir (Mommsen ve ark., 1999). Ek olarak, balıklar, kolesterol yan zincir bölünme enzimi (sitokrom P450<sub>scc</sub>, desmolaz) ve deoksikortizol/deoksikortikosteronun 11-hidroksilasyonunu katalize eden 11-hidroksilaz gibi mitokondriyal iç membran monooksijenaz enzimlerine de sahiptirler (Mommsen ve ark., 1999).



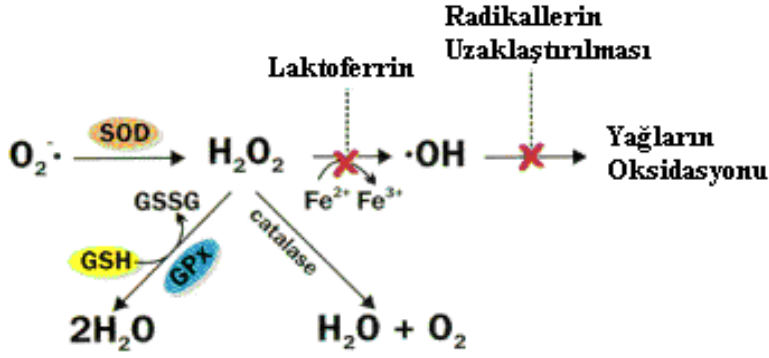
Şekil 2.17. Kemikli balıklarda kortizol biyosentezi (Mommsen ve ark., 1999)

### 2.10.8. Balıklarda Antioksidan Enzimler

Balık yetiştiriciliğinde kullanılan balık yağı bol miktarda doymamış yağ asitlerini (HUFAs) içermektedir. Bu yağ asitlerinde çift bağ sayısının fazla olması oksidasyonu hızlandırmakta ve oksitlenmiş HUFA'lar da balıklarda oksidatif strese neden olan lipid peroksitleri (LPO'ları) içermektedir (Nakano, 2007).

Antioksidan maddeler enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar ile oksidatif stresi önlemek üzere etkilerini göstermektedirler. Enzimatik olan; katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutathion peroksidaz gibi enzimler ile yapılmaktadır. Ayrıca bu sisteme seruplazmin, albumin ve transferrin proteinleride demir ve bakır ile bağ oluşturarak katkı sağlamaktadırlar (Masella ve ark., 2005). Yemle alınan alfa tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), selenyum, çinko, manganez ve fenolik bileşikler gibi mikronutrientler ise enzimatik olmayan mekanizmalarla etki göstermektedirler (Willcox ve ark., 2004; Nakagawa ve ark., 2007).

Örneğin polifenolik bileşiklerden olan flavonoidler demir ve bakır iyonlarıyla şelat oluşturarak bu iyonları indirgemektedirler (Mira ve ark., 2002). Böylece hidroksi radikalın üretiminde yer alan bu iyonlar ortamda indirgenmiş olur. Hidroksi radikal serbest radikaller arasında en aktif ve toksik olandır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ise çok reaktif olamamakla birlikte  $\cdot OH > > > O_2^- \cdot > H_2O_2$  sıralamasıyla zararlıdırlar (Zacks ve ark., 2005). Hidroksi radikal yağların oksidasyonuna, DNA'nın hasara uğramasına ve daha birçok soruna neden olabilmektedir (Keyer ve ark., 1995; Singh ve ark., 2002). Süperoksit radikal ortamda yeterli SOD enzimi varlığında indirgeneceğinden hasara neden olamamaktadır (Keyer ve ark., 1995). Süperoksit radikal SOD enzimiyle hidrojen peroksite ve devamında myeloperoksidaz enzimi tarafından hipoklorite dönüşmektedir (Zacks ve ark., 2005). Şekil 2.18.'de antioksidantların radikallerin uzaklaştırılmasında ve demirin indirgenmesindeki etkisi görülmektedir (RveD, 1997).



Şekil 2.18. Antioksidantların radikallerin uzaklaştırılmasında ve demirin indirgenmesindeki etkisi (R ve D 1997)

### 2.10.9. Balıklarda İç Organ İndeksleri

Balıklarda iç organ indekslerini visserosomatik indeks (VSİ), hepatosomatik indeks (HSİ), iç organ yağı indeksi (İOYİ), safra somatik indeksi (SSİ), dalak somatik indeksi (DSİ) ve kalp somatik indeksi (KSİ) gibi indeksler oluşturmaktadır. Organların vücuda olan oranlarıyla elde edilen indeksler bize balıkların sağlık durumları hakkında bilgiler verebilmektedir.

Balıkların yemden gelen besinleri sindirildikten sonra vücutta çeşitli doku ve organlarda depolanabilmektedir. Örneğin, yemden gelen yağ ile belirli bir oranda etteki yağ miktarı da artış göstermektedir. Ancak beslemede yağ oranı fazla olduğunda, yağ kas dışında karaciğer ve adipoz dokuda da birikebilmektedir (McClelland ve ark., 1995; Peres ve Teles, 1999b). Çipura, levrek ve alabalık gibi balıkların iç organların etrafında besinden gelen fazla yağ depolanmakta ve önemli bir kalite kriteri olarak değerlendirilen iç organ yağlanması tüketicilerin beğenisini olumsuz etkilemektedir (Grigorakis, 2007). Bunun nedeni ise yetiştiricilik yoluyla elde edilen balıkların yağlı yemlerle beslenmesinden kaynaklı iç organ çevresindeki yağların hoş olmayan koku kaynağı olmasıdır (Grigorakis, 1999). Balık temizlenirken iç organlarla beraber yağlı kısımlar uzaklaştırılsa da karın zarında geri kalan bir miktar yağ; pişirmeden sonra balığın lezzetini olumsuz etkileyebilmektedir (Grigorakis, 1999; Grigorakis, 2007). Ayrıca, organların etrafındaki yağlanma organların fonksiyonlarını yerine getirmelerini zorlaştırmakta ve balık sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (McDonald ve Milligan, 1992). Bununla birlikte fazla yağlı yemle beslenen balıklarda sağlık değerlendirme indeksinde azaldığı bilinmektedir (Chaiyapechara ve ark., 2003).

Yağlı yemlerle beslenen balıklarda en başta etkilenen organlardan biride karaciğerdir. Karaciğerin sindirim ve depo görevi (A ve D vitaminleri, yağ ve glikojen) yanı sıra kan hücrelerinin parçalanmasında ve kan kimyasında da önemli rolleri vardır. Ayrıca azotlu boşaltım maddelerinin ve ürenin oluşumuyla ilgilide görevleri olduğu bilinmektedir (Hoşsu ve ark., 2003).

Genellikle akvakültürde üretilen balıkların karaciğerinin aşırı yağlandığı ve renginde açıldığı bilinmektedir (Roberts, 2001). Yemden gelen fazla yağın balık tarafından enerji olarak değerlendirilmeyip organlarda ve dokularda depolanması hem balık sağlığını olumsuz etkilemekte hemde yemden yararlanmayı azaltmaktadır. Balıklarda karaciğerde depolanan yağ miktarı arttıkça karaciğerin ağırlığıda artmaktadır ve bu da hepatosomatik indeks (HSİ) ile tespit edilebilmektedir. Ayrıca direkt olarak karaciğer yağı analizi yapılarak sonuçlar birlikte değerlendirilebilmektedir (Yılmaz ve ark., 2013).

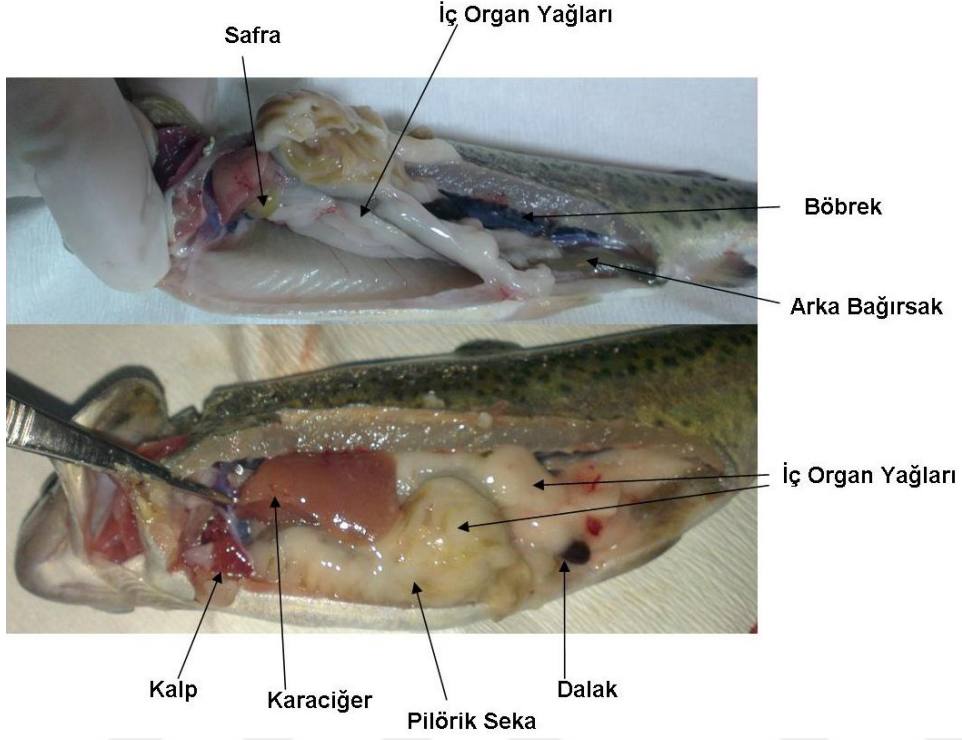
Karaciğerin sindirim görevi safra suyu ile ilişkili olup safra suyu yağı eritebilen safra tuzlarını ve pigmentleri içermektedir. Ayrıca bağırsak pH değerinin ayarlanmasında da görevli olan safra tuzları sindirime yardımcı olur (Timur, 2006). Bu nedenle sindirimle ilişkili çalışmalarda safra ağırlığı ve indeksi bize yararlı bilgiler verebilir. Örneğin gökkuşağı alabalıklarında besleme tipine göre bile safra indeksinin değişebildiği bulunmuştur (Wagner ve ark., 1996). Ayrıca levrek balıklarında yapılan bir çalışmada yeme ilave edilen sindirim arttırıcı bitkisel kaynakların safra indeksini arttırdığı görülmüştür (Yılmaz ve ark., 2013).

Balık çalışmalarında bir diğer önemli indeks ise dalak ağırlığının vücut ağırlığına oranıyla elde edilen dalak somatik indekstir. Dalak olgunlaşmış eritrositlerin parçalandığı, granülosit hücrelerin depolandığı ve üretiminin yapıldığı önemli bir organdır (Anderson, 1974). Özellikle melano-makrofaj üretimi ile balıklarda bağışıklık sistemi için önemli bir role sahiptir (Kumaran ve ark., 2010). Dalak ağırlığı ve dolayısıyla indeksinin balıkların hastalık dönemlerinde (hastalık türüne göre değişebilir) genellikle artış gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda dalak indeksi ile bakteriyel direnç arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Hadidi ve ark., 2008; Wiens ve Vallejo, 2010).

Balıklarda kalp kan dolaşımını gerçekleştirdiğinden diğer önemli bir organdır. Balıklar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda kalp ağırlığı ve indeksi sağlık karakteristiği olarak değerlendirilmiştir. Örneğin, *Aeromonas salmonicida* ile infekte *Salmo trutta trutta* balıklarında kalp somatik indeksinin arttığı (Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2012) *Perca fluviatilis* balıklarınınkinin ise azaldığı (Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2010) görülmüştür. *Salmo salar* balıklarının yemlerinde okside olmuş yağ kaynağı



kullanıldığında kalp somatik indeksinin arttığı bulunmuştur (Hang, 2012). Şekil 1.19.'de gökkuşağı alabalığında yağ ile kaplanmış iç organlar ve yağlı beslenmeden dolayı açık renki karaciğer görülmektedir.



Şekil 2.19. Gökkuşağı alabalığında iç organların görüntüsü (Orjinal)

#### 2.10.10. Balıklarda Bağırsak ve Mide Enzimleri

Balıklarda sindirim enzim aktivitelerinin tespiti sindirim kapasitesinin ve besin ihtiyaçlarının belirlenmesi açısından önemlidir (Ribeiro ve ark., 2008). Balıkların büyüme hızı besin kompozisyonu ve besin alma sürekliliği dışında sindirim kapasitesine, protein sentezi için gerekli olan oksijen varlığına ve/veya metabolik kapasiteye de bağlıdır (Blier ve ark., 1997; Subhadra ve ark., 2006).

Balıkların yemdeki besinleri kullanımı sindirim enzimlerinin farklı organlardaki aktivitelerine bağlıdır (Natalia ve ark., 2004). Sindirim enzimlerinin aktivitesi ve besinleri absorbe etmesi büyümenin artması için yüksek oranda kullanılabilir enerji stoğu sağlamaktadır (Blier ve ark., 1997). Balıklarda sindirimden sorumlu bir çok enzim görev almaktadır. Bu enzimlerden tripsin, amilaz ve lipaz pankreas enzimleridir.

Tripsin proteinlerin karboksil grubunun peptid bağımlı parçalar (Tietz, 1986). Tripsin aktivitesinin etçil ve hem etçil hemde otçul balıklarda otçul balıklara oranla daha fazla olduğu bilinmektedir (Hofer ve Schiemer 1981; Munilla-Moran ve Stark 1990; Chong ve

ark., 2002). Ayrıca balıklarda bağırsaklardan tripsin salgılanma miktarı ile protein sindirilebilirliği arasında pozitif yönlü bir ilişkinin olduğu bilinmektedir (Krogdahl ve ark., 1994).

Karbohidratların sindiriminden sorumlu amilaz enzimi etçil balıkların organlarında hem etçil hem otçul ve otçul balıklara oranla daha düşük miktarda bulunmaktadır (Furne ve ark., 2005). Balıklarda amilaz, nişasta ve kolay sindirilebilir oligosakkaritlerden maltotrioz ve maltozun içindeki glikoz benzeri bağların endohidrolizini katalize etmektedir (Krogdahl ve ark., 2005). Sonrasında disakkaridazlar veya glikosidazlar ile karbohidratların en ufak molekülü olan monosakkaritlere parçalanır ve bağırsak epitelyumu boyunca absorbe olurlar (Infante ve Cahu 2001).

Yağlar absorbe olmadan önce lipaz enzimi tarafından yağ asitleri ve gliserole parçalanır (Borlongan, 1990). Balıklarda yapılan çalışmalarda yemdeki yağ oranı ile bağırsak lipaz aktivitesi arasında herhangi bir pozitif ilişki olmadığını, ancak yemdeki yağ kaynağının ve yağ asitlerinin lipaz aktivitesini değiştirdiğini göstermiştir (Morais ve ark., 2004). Ancak, etçil balıklar daha yağlı beslendiklerinden lipaz aktivitelerinin hem etçil hem otçul ve otçul balıklara oranla daha yüksek olduğu bilinmektedir (Opuszynski ve Shireman 1995; Furne ve ark., 2005).

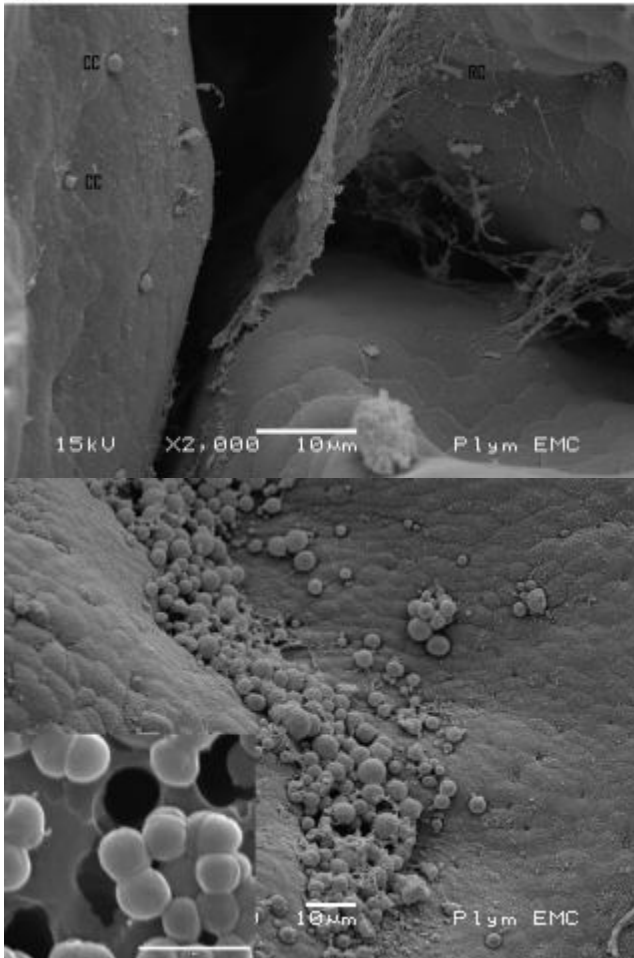
Alkalin fosfataz bağırsak hücre duvarları boyunca yağ ve karbonhidratların absorpsiyonu ve taşınmasıyla ilişkilidir (Fraisse ve ark., 1981). Midenin mide bezleri tarafından salgılanan başlıca proteazlardan biri olan pepsin enzimi protein sindirimini başlatmaktadır (Lauff ve Hofer 1984).

#### **2.10.11. Balıklarda Bağırsak Florası**

Balıklarda doğal bağırsak florası bir çok çevresel faktöre bağlı olarak değişebilmektedir. Bu faktörler arasında suyun kimyasal özellikleri, sıcaklık, tuzluluk, stres, balık yaşı, yem, beslenme tipi ve yaşadığı ortamdaki mikrobiyotanın durumu sayılabilir (Ringo ve Birkbeck 1999; Merrifield ve ark., 2009). Ancak genel olarak bakıldığında aerob veya fakültatif anaerob bakterilerin balıkların bağırsak florasına hakim oldukları bilinmektedir (Ringo ve ark., 1995). Balık bağırsaklarındaki bakteri popülasyonunun gram örnek başına  $10^8$  aerobik ve  $10^5$  anaerobik bakterilerden oluştuğu bulunmuştur (Ringo ve ark., 1995). Yapılan çalışmalarda *Oncorhynchus* türlerinde genel olarak *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. Flavobacterium/Cytophaga ve Coryneforms bakteri gruplarının hakim olduğunu göstermiştir (Ringo ve ark., 1995; Ringo ve Birkbeck 1999).

Bağırsaklar patojen bakterilerin balığa geçişi için uygun bir kaynaktır. Bağırsaktaki bakteriler arasında sürekli bir yerleşme ve yayılma mücadelesi vardır. Bağırsak mikrobiyotası olası patojen bakterilere karşı balığın önemli bir savunma aracıdır. Bu nedenle bağırsaktaki faydalı bakterilerin yoğunluğu önemlidir. Bu noktada bağırsak florasındaki yararlı bakteri miktarını arttırmak için balık yemlerine probiyotik ve prebiyotik ilavesi yapılmaktadır (Nayak, 2010; Akhter ve ark., 2015).

Gökkuşaağı alabalığı normal bağırsak florasının (Merrifield ve ark., 2009) ve probiyotik (*Pediococcus acidilactici*) ilave edildikten sonraki bağırsak florasının (Merrifield ve ark., 2010b) elektron mikroskop görüntüleri Şekil 2.20.'de verilmiştir.



Şekil 2.20. Gökkuşaağı alabalığı bağırsak florasının elektron mikroskop görüntüleri (Merrifield ve ark., 2009; Merrifield ve ark., 2010b). Üst görüntüde CC:kok benzeri bakteri hücresi, RC; çubuk bakteri hücresi, alt görüntüde probiyotik (*Pediococcus acidilactici*) kolonizasyonu görülmektedir

### **2.10.12. Kan pH değeri**

Kan pH değeri balıkların sağlık karakteristiklerinden biri olarak değerlendirilebilen bir diğer önemli parametredir. Memelilerde olduğu gibi balıklarda kan pH değerini alkaline olacak şekilde tamponlamaktadır (Daxboeck ve Davie 1986). Kan pH değerinin alkaline olmasını hidroksit iyonları sağlarken, asitleştirme eğilimine hidrojen iyonları, karbondioksit ve karbonik asit neden olmaktadır (Ronzio, 2003). Balıklarda kan pH değerinin stres durumlarında genelde azaldığı görülmüştür (Perry ve Bernier 1999; Ronzio, 2003).



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Deneme Yeri

Bu tez çalışması, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Canlı Kaynaklar Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Denemeler iki farklı kapalı devre sisteminde yürütülmüştür. İki sistemde çökeltme havuzu, kaba filtrasyon, kum filtre, biyolojik filtre ve ısıtma-soğutma ünitelerinden (Tuna Mac<sup>®</sup>, Çanakkale) oluşturulmuştur. Yavru balık denemeleri 21 L kapasiteki plastik tanklarda, genç balık denemeleri ise 140 L hacmindeki fiberglas tanklarda yapılmıştır. Denemeler de günlük olarak %10-15 oranlarında su değişimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca otomatik zamanlayıcılar yardımıyla 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır.



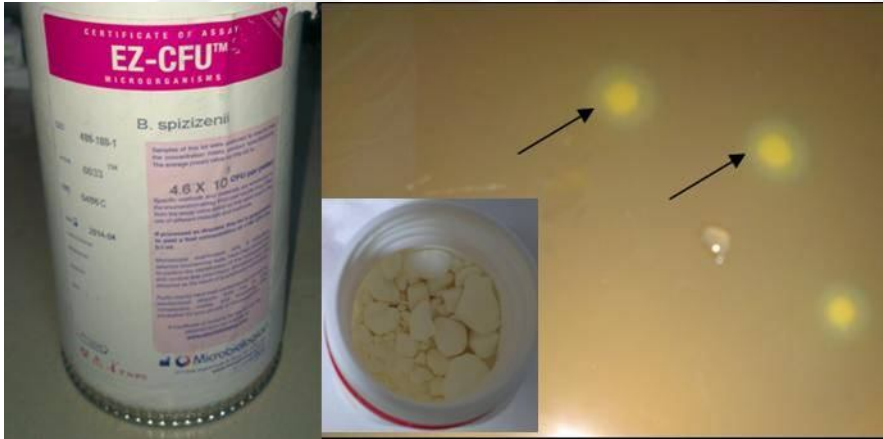
Şekil 3.1. Denemenin yürütüldüğü kapalı devre sistemlerin görüntüsü

### 3.2. Deneme Materyalleri ve Deney Sistemleri

Araştırmada balık materyali olarak gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır (Şekil 3.2.). Balıklar üniversite yakınındaki Keskin Alabalık (Evciler Köyü/Bayramiç) firmasından temin edilmiştir. Herbir deneme için balıklar ikişer hafta süre ile deneme koşullarına adapte edilmişlerdir. Denemelerde son yağlama işlemi yapılmamış ticari ekstrude yem (Anatolian Sea 4mm, %50 Protein/% 4 yağ ve 1mm, %55 Protein/%4 Yağ Uğurlu Balık, Aydın, Türkiye) kullanılmıştır. Toz formundaki sinamik asit (Aldrich W228826 trans-Cinnamic acid natural, ≥99%, FCC, FG, Şekil 3.3.) ve PBS içerisinde hazırlanmış *Bacillus subtilis* (0486C, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC® 6633™\* EZ-CFU, Şekil 3.3.) sporları (nihai üründe:  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>) aşağıda denemelerde belirtilen oranlarda balık yağı içerisinde yemlere emdirilerek ilave edilmiştir. Spor oluşturmak için *B.subtilis* hücreleri Manganez Sülfat (MnSO<sub>4</sub>) içerikli Nutrient Agar besi ortamında 35 °C de 5 gün inkübasyona bırakılmış ve devamında agar üzerinden izole edilen koloniler 80 °C de 15 dakika ısıtma maruz bırakılmıştır (Odlaug ve ark., 1981). Devamında spor yoğunluğu  $10^{10}$ /mL olacak şekilde PBS içerisinde hazırlanmıştır. Katkı maddelerinin ilave işleminden sonra nihai yemlerin besin kompozisyonu genç balıklar için %43 protein, %17 yağ, %8,8 kül ve %9 nem; yavru balıklar için %50 protein, %14 yağ, %8,5 kül ve %8,7 nem olarak analiz edilmiştir. Çalışmada toplam 6 deneme (Genç balıklarda: Deneme 1.1, Deneme 1.2, Deneme 2.1, Deneme 2.2, Yavru balıklarda: Deneme 3 ve Deneme 4) yapılmıştır. Bu denemeler iki farklı amaca göre aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında sinamik asit ve *B.subtilis* bakterisinin alabalık bağırsak izolatları ve bazı balık patojenleri üzerine antimikrobiyal etkilerini görmek için *in vitro* denemeler de yapılmıştır.



Şekil 3.2. Denemelerde kullanılan alabalıkların görüntüsü (orjinal)



Şekil 3.3. Sinamik asit ve *Bacillus subtilis* (ATCC® 6633)'in MYP (Mannitol-Egg-yolk-Polymyxine Agar) besiyeri üzerindeki görüntüsü (orjinal)

### 3.2.1. Deneme 1

#### 3.2.1.1. Deneme 1.1

Sinnamik asit yeme %0 (kontrol), %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarda ilave edilmiş ve toplamda 5 deneme grubu ile deneme yürütülmüştür. Her deneme tankında 30 adet alabalık olmak üzere toplamda 450 adet (5 grup X 3 tekerrür X 30 balık/tekerrür) genç alabalık ( $17,49 \pm 0,08$  g) kullanılmıştır. 60 günlük besleme denemesi sonunda balıkların

büyüme performansları, besin kompozisyonları, toplam karaciğer yağ miktarı, iç organ indeksleri, bağırsak ve mide enzimleri, bazı serum biyokimyasal parametreleri (trigliserit, kolesterol, GOT, GPT, LDH, ALP), yem, mide ve bağırsak pH miktarları, bağırsak mikrobiyotası ve antioksidan enzimler analiz edilmiştir.

### **3.2.1.2. Deneme 1.2**

Sinnamik asit yeme %0 (kontrol), %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarda ilave edilmiş ve toplamda 5 deneme grubu ile deneme yürütülmüştür. Her deneme tankında 30 adet alabalık olmak üzere toplamda 450 adet (5 grup X 3 tekerrür X 30 balık/tekerrür) genç alabalık (17,01±0,05 g) kullanılmıştır. 60 günlük besleme denemesi süresince serum kortizol analizi, immunolojik analizler, hematolojik analizler, serum biyokimyası analizleri ve kanda pH analizleri ile deneme sonunda 20 gün süren yaşama oranı testi yapılmıştır.

### **3.2.2. Deneme 2**

#### **3.2.2.1. Deneme 2.1**

Daha önceki denemelerde yeme ilave edilen sinnamik asit içerikli yemlere bu denemede *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ilave edilmiştir. Bu durumda deneme grupları %0 (kontrol), %0 sinnamik asit + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,025+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,05 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,075 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ve sinnamik asit %0,15+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> şeklinde dizayn edilmiştir. Her deneme tankında 30 adet alabalık olmak üzere toplamda 540 adet (6 grup X 3 tekerrür X 30 balık/tekerrür) genç alabalık (21,63±0,21 g) kullanılmıştır. 60 günlük besleme denemesi sonunda deneme 1.1 deki analizler bu deneme de de yapılmıştır.

#### **3.2.2.2. Deneme 2.2**

Bu denemede gruplar %0 (kontrol), %0 sinnamik asit + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,025+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,05 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinnamik asit %0,075 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ve sinnamik asit %0,15+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> şeklinde dizayn edilmiştir. Her deneme tankında 30 adet alabalık olmak üzere toplamda 540 adet (6 grup X 3 tekerrür X 30 balık/tekerrür) genç alabalık (20,58±0,35 g) kullanılmıştır. Analizler 60 günlük besleme denemesi süresince ve deneme sonunda Deneme 1.2 deki gibi yapılmıştır.



### 3.2.3. Deneme 3

Sinnamik asit yeme %0 (kontrol), %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarda ilave edilmiş ve toplamda 5 deneme grubu ile deneme yürütülmüştür. Her deneme tankında 30 adet alabalık yavrusu (1,04±0,01 g) olmak üzere toplamda 450 adet (5 grup X 3 tekrür X 30 balık/tekrür) alabalık yavrusu kullanılmıştır. Balıklar küçük olduğundan 60 günlük besleme denemesi sonunda balıklarının büyüme performansı, hematolojik analizleri, besin kompozisyonu analizleri ve kortizol testleri bakımından grupların etkisi değerlendirilmiştir.

### 3.2.4. Deneme 4

Üçüncü denemede yeme ilave edilen sinamik asit içerikli yemlere dördüncü denemede *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ilave edilmiştir. Bu durumda deneme grupları %0 (kontrol), %0 sinamik asit + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinamik asit %0,025+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinamik asit %0,05 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>, sinamik asit %0,075 + *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> ve sinamik asit %0,15+ *Bacillus subtilis*,  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> şeklinde dizayn edilmiştir. Her deneme tankında 30 adet alabalık yavrusu (1,03±0,01 g) olmak üzere toplamda 540 adet (6 grup X 3 tekrür X 30 balık/tekrür) alabalık yavrusu kullanılmıştır. 60 günlük besleme denemesi sonunda Deneme 3 teki analizlerin aynısı yapılmıştır.

### 3.3. Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Analizleri

Denemede sıcaklık, oksijen, tuzluluk ve iletkenlik analizleri için YSI Pro2030 su analiz cihazı kullanılmış ve parametreler günlük olarak takip edilmiştir. Suyun pH ölçümleri ise HANNA (HI 2221) masa üstü pH metre ile günlük olarak yapılmıştır. Toplam Amonyak , Nitrit ve Nitrat Optizen POP UV/VIS spektrofotometre ile haftalık olarak ölçülmüştür.

### 3.4. Büyüme Performansı, Yemden Yararlanmanın ve İç organ İdekslerinin Hesaplanması

Deneme 1.1, Deneme 2.1, Deneme 3 ve Deneme 4'de büyüme performansı ve yemden yararlanmanın hesaplanmasında aşağıdaki analizler kullanılmıştır:

$$\text{Canlı Ağırlık Artışı CAA (\%)} = (\text{Son Ağırlık gr} - \text{Başlangıç ağırlığı gr}) / \text{Başlangıç Ağırlığı} \times 100 \quad (3.1)$$

Spesifik Büyüme Oranı:  $SGR (\%Gün^{-1}) = [Ln (\text{Son ortalama ağırlık gr}) - Ln (\text{Başlangıçtaki ortalama Ağırlık gr})] / \text{Deneme gün sayısı} \times 100$  (3.2)

Yem Dönüşüm Oranı:  $FCR = \text{Yem Tüketimi (gr)} / \text{Ağırlık Kazanımı (gr)} \times 100$  (3.3)

Besleme denemelerinde ölüm gerçekleşmediğinden ölü balık ağırlığı hesaba katılmamıştır. İç organ indekslerinin (balık ağırlığı içerisinde ilgili organ ağırlığı yer almamaktadır) hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

**Visserosomatik İndeks (%)** =  $VSİ = \text{İç organ ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.4)

**Hepatosomatik İndeks (%)** =  $HSİ = \text{Karaciğer ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.5)

**Dalaksomatik İndeks (%)** =  $DSİ = \text{Dalak ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.6)

**Safrasomatik İndeks (%)** =  $SSİ = \text{Safra ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.7)

**Kalpsomatik İndeks (%)** =  $KSI = \text{Kalp ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.8)

**İç Organ Yağı İndeksi (%)** =  $İOYİ = \text{İç organ yağının ağırlığı (g)} / \text{Balık ağırlığı (g)} \times 100$  (3.9)

### 3.5. Kimyasal Besin Madde Analizleri

Besin madde analizleri (kuru madde, protein, yağ ve kül) için kullanılacak yöntemler aşağıda yer almaktadır. Protein, yağ ve kül analizleri kuru madde de analiz edilmiş ve yüzde oranları da kuru madde içerisindeki yüzde oranları olarak gösterilmiştir.

#### 3.5.1. Kuru Madde Analizi

Analiz için darası alınan alüminyum folyo kaplara iç organları çıkarılan balıklar tartılmış ve 70 °C'de ağırlıkları sabit kalana kadar etüvde (Selecta) kurutulmuşlardır (AOAC, 1998). Kuru madde yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Devamında protein, yağ ve kül analizleri için örnekler öğütülerek homojen hale getirilmiştir.

$$\text{Kuru Madde (\%)} = 100 - [(\text{örnek ağırlığı} + \text{folyo kabın ağırlığı}) - (\text{kurutma işleminden sonraki kap ağırlığı})] / [(\text{örnek ağırlığı} + \text{folyo kabın ağırlığı}) - \text{folyo kabın ağırlığı}] \times 100 \quad (3.10)$$

### 3.5.2. Protein Analizi

Protein miktarlarının belirlenmesi için Kjeldahl metodu kullanılmıştır (AOAC, 1998). Homojen örneklerden yaklaşık 0,5 g alınarak cam sindirim tüplerine konmuş ve üzerlerine 1 adet katalizör tablet ve 15 ml sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ilave edilmiştir. Protein sindirim işlemi BUCHI marka K-436 model infrared yakma sisteminde gerçekleştirilmiştir. Örnekler soğuduktan sonra BUCHI marka K-350 model distilasyon sistemine alınmış ve distilasyondan sonra 0,1 mol hidroklorik asit (HCl) ile titre edilmişlerdir. Protein yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ham Protein} = (\text{Titrazyonda harcanan} - \text{Kör örnek}) \times 0,1 (\text{HCl çözeltisinin normalitesi}) \times 14,007 (\text{Azotun miliekivalen ağırlığı}) \times 6,25 (\text{Faktör}) / \text{Örnek ağırlığı} \times 100 \quad (3.11)$$

### 3.5.3. Yağ Analizi

Yağ analizi için Folch ve ark. (1957) bildirdikleri metot kullanılmıştır. Homojen balık ve yem örneklerinden 0,5 gram, karaciğer örneklerinden 0,25 g kapaklı deney tüplerine tartılmış ve üzerine metanol-kloroform karışımından ilave edilmiştir. Bir gece karanlıkta bekleyen örnekler süzme işleminden geçirildikten sonra ilk tartımı yapılan deney tüplerine alınmış ve azot evaporatöründe 40°C su banyosu içinde metanol-kloroform uzaklaştırılmıştır. Devamında tüpler desikatöre alınmış ve tartımları yapılmıştır. Ham yağ miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ham Yağ Miktarı} = \text{Cam balon ağırlık değişimi (g)} / \text{Örnek ağırlığı (g)} \times 100 \quad (3.12)$$

### 3.5.4. Kül Analizi

Kül analizinde homojen hale getirilmiş 0,5 g örnek darası alınmış porselen krozelere tartılmıştır. Daha sonra 525°C'de 12 saat boyunca kül fırınında (Nüve, MF 120) yakılan örneklerin (AOAC, 1998) ağırlık değişiminden kül içerikleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Ham Kül İçeriği} = \text{Porselen krozenin ağırlık değişimi (g)} / \text{Örnek ağırlığı (g)} \times 100 \quad (3.13)$$

### **3.5.5. Yağ Asidi Analizi**

Yağ asidi analizleri Slover ve Lanza (1979)'e göre yapılmıştır. Yağ analizi sonucunda elde edilen yağlara metanolik 0,5 N Sodyum hidroksit (NaOH) ilave edilmiş ve kaynama taşı atılarak soğutucu bağlanmış su banyosunda 15 dk kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. Soğutucunun üzerinden BF<sub>3</sub> reaktifi ilave edilmiş ve 5 dk daha kaynatılmıştır. Heptan ilave edilmiş, 1 dk daha kaynatılmıştır. Devamında örnekler Balon jöje içerisinde doymuş Sodyum klorür (NaCl) ile çalkalanmış ve üstteki heptan fazından mikro pipetle 1-2 ml. alınarak cam viallere aktarılmıştır.'devamında örnekler gaz kromatografisine (GC) enjekte edilerek yağ asitleri kompozisyonu tespit edilmiştir. Yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisi (Shimadzu GC-2014) ile, 30 mx0.25 mm kapillar kolon kullanılarak ayrılmış ve tanımlanmıştır. Pikler, bilinen standartlara (Supelco 37 Component FAMES Mix) göre tanımlanmıştır. Verilerin elde edilmesinde yağ asidi metil esterleri toplam yağ asitlerinin yüzdesi şeklinde hesaplanmıştır.

### **3.6. Balıklardan Kan Örneklerinin Alınması ve Analizleri**

Her deneme süresince her 20 günde bir her tanktan 3 adet olmak üzere toplamda 9 balık/grup olacak şekilde balıklardan kan alınmıştır. Balıklar deneme tanklarından rastgele hızlıca yakalandıktan sonra, en kısa sürede doğal bir bayıltıcı olan ve yaygın olarak kullanılan karanfil yağı (20 mg/L) bulunan kova içerisinde bayıltılmıştır (Iversen ve ark., 2003). Bayıltma işleminin sonuna balıkların anüs yüzgecinin hemen arkası alkolle temizlenmiş (kana mukoza karışmasını önlemek amacıyla) ve sonra 2,5 ml lik plastik enjektör yardımıyla kaudal venadan kan alınmıştır (Şekil 3.4.). Alınan kan örnekleri K<sub>3</sub>EDTA ve jelli serum tüpleri içerisine pay edilmiş ve hematolojik, immunolojik ve serum biyokimyasal analizleri yapılmıştır. Serum analizleri için jelli tüplere alınan kan 5000 g devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum – 80 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.



Şekil 3.4. Balıklardan kan örneklerinin alınması (Orjinal)

### 3.6.1. Hematolojik Analizler

Hematolojik analizler için ön denemeler yapılmıştır. Kırmızı kan hücre sayısı (RBC) Thoma lamında, hemoglobin analizi cyanomethemoglobin metodu ile spektrofotometrede ve hematokrit analizi mikrohematokrit yöntemi ile hematokrit santrifüjünde analiz edilip (Blaxhall ve Daisley 1973), elde edilen sonuçlar otomatik kan sayım cihazı (Mindray/BC 3000 Plus) sonuçları ile karşılaştırılmış ve sonuçların istatistiksel olarak benzer oldukları tespit edilmiştir. Devamında kırmızı kan hücre sayısı (RBC), hematokrit ve hemoglobin analizleri otomatik kan sayım cihazı ile yapılmıştır. Eritrosit indeksleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Lewis ve ark., 2006):

#### Eritrosit indeksleri

##### Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV)

Ortalama eritrosit hacmi aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Hct: Hematokrit, RBC: Kırmızı Kan Hücre Sayısı

$$MCV (fl) = Hct \times 10 / RBC(10^6 \mu L^{-1}) \quad (3.14)$$

### **Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin (MCH)**

Eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Hb: Hemoglobin

$$\text{MCH (pg)} = [\text{Hb (g dL}^{-1}) \times 10] / \text{RBC}(10^6/\text{mm}^{-1}) \quad (3.15)$$

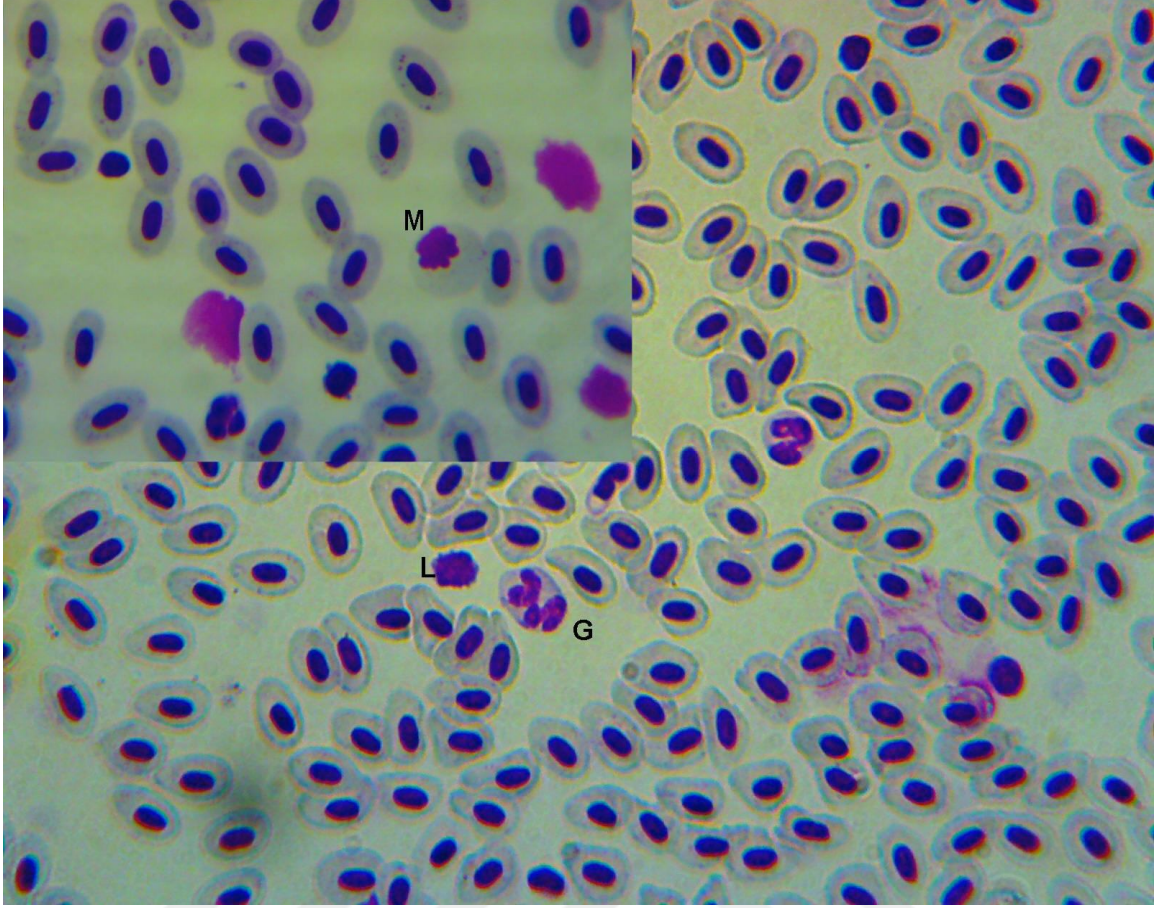
### **Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC)**

Eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonu aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{MCHC (g}^{-1}) = [\text{Hb (g dL}^{-1}) \times 100] / \text{Hct} \quad (3.16)$$

### **3.6.2 Beyaz Kan Hücre Sayısı ve Tipleri**

Beyaz kan hücre sayısı daha önce literatürde bildirilen yöntemler ile indirekt olarak hesaplanmıştır (McKnight, 1966; Yılmaz ve ark., 2016). Beyaz kan hücre tipleri ve sayımı için lamın üzerine alınan bir miktar kan yayma yapılarak örnekler hazırlanmıştır. Devamında oda sıcaklığında kurutulmuş ve May-Grünwald-Giemsa boyama işlemlerini takiben akan su altında yıkanmıştır. Boyanan örnekleri daimi preparasyonu hazırlandıktan sonra immersiyon yağı kullanılarak 1000X büyütmede 100 lökosit hücresi sayılarak lökosit hücrelerinin (lenfosit, nötrofil ve monosit, Şekil 3.5.) yüzde oranları ve beyaz kan hücre sayımları belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Yayma preparattaki hücre tiplerinin mikroskopik görüntüsü (M: Monosit, G: Granülosit, L: Lenfosit, Orjinal)

### 3.6.3. İmmunolojik Analizler

#### 3.6.3.1. Respiratöri Burst Aktivitesi

Fagositlerin respiratöri burst aktivitesi Stasiak ve Baumann (1996) bildirdiği metotda bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. Analizde herbir balık için 50 µL kan örneği poli-l-lizin kaplı 96 plaka içerisine yerleştirilmiştir. Devamında örnekler 1 saat inkübasyona bırakılmış ve üst faz atılıp örnekler HBSS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra herbir kuyucuğa 100 µL % 0,2 NBT solüsyonu ilave edilmiş ve plaka 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Devamında hücreler %100 metanol ile 5 dakika fikse edilmiş ve 3 kez % 70 lik metanol ile yıkanmışlardır. Plakalar kuruduktan sonra herbir kuyucuğa 60 µL 2 M potasyum hidroksit ve 70 µL DMSO ilave edilmiş ve okumalar multiskan spektrofotometrede (Thermo Multiskan Go) 620 nm de yapılmıştır.

### 3.6.3.2. Süperoksit Anyon Üretimi

Süperoksit anyon üretiminin tespit edilmesi için Siwicki ve Anderson (1993a) metodunda bazı değişiklikler yapılmıştır. Kısaca poly-L-lysine solüsyonuyla kaplı mikrotiter plaklara 50 µl kan örneği konularak 1 saat oda sıcaklığında beklenilmiştir. Devamında plakalar HBSS ile yıkanmış ve NBT solüsyonu (içerisinde *Y. ruckeri* E42,  $1,5 \times 10^8$  bulunan) eklenmiştir. Plaka 150 g de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir. Devamında respiratöri burst aktivitesindeki gibi analize devam edilmiştir.

### 3.6.3.3 Fagositik İndeks ve Aktivite

Fagositik aktivite daha önce literatürde bildirilen mikroskopik sayım yöntemine göre yapılmıştır (Siwicki ve Anderson 1993b). Bu amaçla 100 µl kan örneği ve 100 µl *Y. ruckeri* E42 ( $1,5 \times 10^8$ /PBS) süspansiyonu karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında bir miktar kan lam üzerine ilave edilmiş ve sürme preparat hazırlanmıştır. Preparatlar etil alkol (%95) ile fikse edildikten (5 dakika) sonra ve giemsa boyası ile 10 dakika boyanmıştır. Ardından mikroskopta 1000X büyütmede 100 hücre sayılarak % fagositik aktivite hesaplanmıştır. Fagositik indeks için ise fagositik hücrelerin yuttukları bakteri miktarı sayılarak aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Fagositik aktivite} = \frac{\% \text{Bakteri yutmuş fagositik hücre sayısı}}{\text{Toplam fagositik hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.17)$$

$$\text{Fagositik indeks} = \frac{\% \text{Bakteri yutmuş fagositik hücre sayısı}}{\text{Yutulmuş bakteri sayısı}} \quad (3.18)$$

### 3.6.3.4. Lizozim Aktivitesi

Lizozim aktivitesinin tespit edilmesi için Nudo ve Catap (2011) bildirdikleri metot kullanılmıştır. Kısaca 25 µl serum örneği 175 µl *Micrococcus luteus* süspansiyonuna (pH 5,8) eklenmiştir ve 96 plakada örnekler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Okumalar 450 nm de multiskan mikropilaka okuyucuda yapılmış ve standart kullanılarak (L6876 Sigma, Lysozyme from chicken egg white) µg/mL olarak standart eğriden hesaplanmıştır.



### **3.6.3.5. Myeloperoksidaz Aktivitesi**

Myeloperoksidaz aktivitesi literatürde bildirilen metotlarda bazı değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir (Quade ve Roth 1997; Kumari ve Sahoo 2006). Analiz için 10 µl serum örneği 90 µl HBSS solüsyonu ile seyreltilmiştir. Devamında bu karışıma 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride ve hidrojen peroksit içeren solüsyon ilave edilmiş ve reaksiyon 2 dakika sonra 35 µl sülfirik asitle durdurulmuştur. Okumalar 450 nm' de multiskan mikropilaka okuyucuda yapılmıştır. Sonuçlar 450 nm olarak veya sülfirik asit ilave edilmeden kinetik olarak devam ettirilip U/L olarak verilmiştir.

### **3.6.3.6. Serum Toplam Antiproteaz Aktivitesi**

Serumda toplam antiproteaz aktivitesi literatürde bildirilen metotlar ile yapılmıştır (Ellis, 1990; Magnadóttir ve ark., 1999). Kısaca 10 µl serum örneği tripsin solüsyonunda inkübe edilmiş ve sonrasında 1 mL azocasein solüsyonu ilave edildikten sonra reaksiyon 500 µl %10 luk triklorik asit ile durdurulmuştur. Örnekler 10 000 g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 100 µl üst faz 100 µl 1 N NaOH ile karıştırılmış ve okumalar 450 nm de multiskan spektrofotometrede yapılmıştır.

### **3.6.3.7. α1-Antiproteaz Aktivitesi**

Analiz Newaj - Fyzul ve ark. (2007) bildirdikleri metotda bazı değişiklikler yapılarak yapılmıştır. Kısaca 10 µl serum örneği 100 µL tripsin ve 90 µL Tris-HCl (pH 8.2) solüsyonu ile 1 saat inkübe edilmiştir. Devamında 2 mL Nabenzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide HCl ilave edilmiş ve 15 dakika inkübasyondan sonra reaksiyon 500 µL %30 luk asetik asit ile durdurulmuştur. Okumalar 450 nm de spektrofotometrede (Optizen POP UV/VIS Spectrophotometer) yapılmıştır.

### **3.6.3.8. Hemolitik Komplement**

Hemolitik komplement analizi için Sunyer ve Tort (1995) ile Lim ve ark. (2009) bildirdikleri metotlarda bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu analiz için koyun kanı soğuk potasyum fosfat tamponu (PBS+++ ) ile 4 kez yıkanmış ve yoğunluk  $5 \times 10^7$  hücre/mL olarak ayarlanmıştır. Devamında serum örneklerine 96 plaka içerisinde 2 katlı seyreltme uygulanmıştır. Herbir kuyucuğa 160 µL PBS ve 40 µL koyun kanı ilave edilmiştir. Örnekler 20 °C de 2 saat inkübasyon sonucunda 4 °C de 800 g de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstfaz 415 nm de multiskan spektrofotometrede okunmuştur.

### **3.6.4. Kortizol Testi**

Kortizol testleri genç balıklarda serumda ve yavrularda tüm balıkta (Barcellos ve ark., 2007) ticari kit (Diametra) ile multiskan mikropılaka okuyucuda yapılmıştır. Yavruların kortizol analiz için balıklar yakalanır yakalanmaz (10-15 saniye içerisinde) 20 mg/L karanfil yağı ile bayılmış (Iversen ve ark., 2013) ve 10-30 saniye sıvı nitrojen içerisinde tutulmuştur (Barcellos ve ark., 2007). Devamında CRYO tüplere alınarak -80 °C'de analiz edilinceye kadar depolanmıştır. Örneklerin ekstraksiyonu için herbir örnek 2 mL PBS içerisinde homojen hale getirilmiş ve üzerlerine etil eter ilave edilmiştir. Devamında tüpler karıştırılıp santrifüj edildikten sonra sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve donmayan kısım yeni tüpe konmuş ve sıvı nitrojen ile azot evaporatöründe etil eter uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakta kortizol testi ticari kit protokolüne göre yapılmıştır.

### **3.6.5. Biyokimyasal Analizler**

Kan serumu ayrıldıktan sonra analizler kit (Bioanalytic) kullanılarak spektrofotometrede (Optizen POP UV/VIS) yapılmıştır (Yılmaz ve Ergün 2012). Denemede glikoz, albumin, globulin, toplam protein, trigliserit, kolesterol, GOT, GPT, LDH ve ALP biyokimyasal parametreleri belirlenmiştir.

## **3.7. Antioksidan Savunma Sistemi Analizleri**

### **3.7.1. Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAK)**

Toplam antioksidan kapasitesi daha önce balıklarda da bildirildiği gibi ticari kit (Cayman, 709001) kullanılarak analiz edilmiştir (Saera-Vila ve ark., 2009). Bu amaçla 96 çukur plakalara 10 µL serum, 10 µL metmyoglobin ve 150 µL kromojen iki tekrarlı olarak konmuştur. Reaksiyon 40 µL hidrojen peroksit solüsyonu ile başlatılmış ve 5 dakikalık inkübasyondan sonra multiskan spektrofotometrede okumalar 750 veya 405 nm de yapılmıştır. Sonuçlar Trolox, mM olarak verilmiştir.

### **3.7.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi**

Katalaz aktivitesi literatürde bildirilen metotlar yardımıyla spektrofotometrik olarak yapılmıştır (Goth, 1991). Bu amaçla 10 µL serum, 1 mL substrat ile tepkimeye sokulmuş ve tepkime 1 mL amonyum molibdat solüsyonu ile sona erdirilmiştir. Okumalar spektrofotometrede 405 nm de yapılmış ve sonuçlar kU/L olarak hesaplanmıştır.

### 3.7.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Tez örneklerin SOD analizleri Sigma 19160 SOD kiti kullanılarak yapılmıştır (Bui ve ark., 2014). Kısaca 20 µL serum üzerine 200 µL WST solüsyonu ilave edilmiş ve üzerlerine 20 µL enzim solüsyonu konarak örnekler 37 °C de 20 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Devamında okumalar 450 nm de yapılmıştır. Sonuçlar % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir.

### 3.8. Balıkların *Y.ruckeri* ile infekte edilmesi, balıklarda yaşama oranı ve LD50'nin hesaplanması

Denemelerden önce *Y. ruckeri* E42 bakterisinin alabalıklarda LD50 değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla PBS içerisinde *Y. ruckeri* E42 bakteri miktarı  $3 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$  ve  $3 \times 10^2$  cfu/mL olarak ayarlanmış ve her bir doz için 30 adet balığın her birine 100 µL olacak şekilde insülin iğnesiyle karın içine enjekte edilmiş ve ölümler 20 gün izlenmiştir. Sonrasında Probit analizi ile LD50 değeri hesaplanmıştır.

Yaşama oranı testi için deneme sonlarında balıklara insülin iğnesi yardımıyla herbir balığa 100 µL (*Y. ruckeri* E42,  $3 \times 10^8$  cfu/mL PBS) olacak şekilde patojen enjekte edilmiştir. Devamında balık ölümleri 20 gün boyunca takip edilmiştir. Yaşama oranı sonuçları % olarak verilmiştir.

### 3.9. Aglütinasyon

Aglütinasyon testi için Evenhuis ve ark. (2014) ve Yıldırım ve ark. (2003) bildirdikleri metotlarda bazı değişiklikler yapılmıştır. Kısaca *Y. ruckeri* E42 24 saat TSB besiyerinde üretilmiş ve devamında formalin ilave edilerek 3 saat bekletilmiştir. Ölü hücreler 2100 g de 10 dakika santrifüj edilmiş ve iki kez PBS ile yıkanmışlardır. Analiz için 96 plaka içerisinde serum örneklerine 2 katlı seyreltme uygulanmıştır. Seyreltmeden sonra herbir kuyucuğa 50 µL bakteri hücre süspansiyonu (McF # 1,5) ilave edilmiştir. Plakalar plastik film ile kaplanıp 16 °C de 16-18 saat inkübe edilmiş ve sonuçlar  $\log_2$  olarak verilmiştir.

### 3.10. Bağırsak Mikrobiotası ve pH analizleri

Çalışma süresince sinamik asit ve sinamik asit + probiyotik (*Bacillus subtilis*) in balık bağırsak mikrobiotası üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile toplam bakteri, toplam maya küf, koliform ve laktik asit bakterilerinin sayımı yapılmıştır. Yaklaşık 1 gram bağırsak örneği için her tanktan 3 balığın (toplam herbir grup için 9 balık, n=3) ön

bağırsağı birleştirilmiş, 9 katı oranında steril PBS ilave edilmiş ve steril cam homojenizatörler yardımıyla bağırsak örnekleri homojen edilmiştir. Devamında 9 katlı seyreltmeler yapılmıştır. Sayımlar yayma ve dökme plak yöntemleriyle (Anonim, 2005) ve daha önce alabalıklarda bildirilen yöntemler kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir (Merrifield ve ark., 2010b; Giannenas ve ark., 2012; Šyvokienė ve Vosylienė 2013):

Toplam mezofil aerobik bakteri (TMAB) sayımı: Toplam mezofil aerobik bakteri sayımı Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 35 °C de yapılmıştır. *B.subtilis* benzeri koloniler izole edilerek teşhis kısmında belirtildiği gibi tayin edilmiştir.

Toplam heterotrofik aerobik bakteri sayımı: Toplam heterotrofik aerobik bakteri sayımı Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 22 °C de yapılmıştır. *B.subtilis* benzeri koloniler izole edilerek teşhis kısmında belirtildiği gibi tayin edilmiştir.

Koliform Sayımı: Besiyeri olarak MacConkey (MA) Agar kullanılmış ve inkübasyon 35 °C de yapılmıştır.

Toplam *Enterobacteriaceae* sayısı: Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar besiyeri kullanılmış ve inkübasyon 35 °C de yapılmıştır.

Toplam maya ve küf sayımı: Toplam maya ve küf sayımında Potato Dextrose (PTA) Agar kullanılmış ve inkübasyon 22 °C de yapılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin sayımı: Laktik asit bakterilerinin sayımı için *Lactobacillus* Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar kullanılmış ve inkübasyon 35 °C de yapılmıştır.

pH analizleri balık yemi, bağırsak ve mide örnekleri tartıldıktan sonra 10 kat saf su ile seyreltilmiş ve homojen hale getirildikten sonra (TissueLyser LT) pH ölçümleri masa üstü pH metre (HI 2221) ile yapılmıştır (Nya ve Austin 2011).

### **3.11. Bağırsak ve Mide Enzimleri**

Analizlerden önce bağırsak ve mide örnekleri soğuk saf su içerisinde homojen hale getirilmiş (TissueLyser LT) ve 30 000 g de 4 °C de 30 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich Mikro 200R). Üst fazlar analizlerde kullanılmaya kadar -80 °C de depolanmıştır. Herbir örnek için protein Bradford (1976) metoduna göre analiz edilmiştir.

Bağırsak enzimlerinden tripsin için 0,1 M sodyum klorür (NaCl) ve kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) içeren Tris tamponu hazırlanmış ve analizler 30 °C de 10 dk inkübasyon uygulanarak Faulk ve ark. (2007) de bildirdikleri gibi mikropalakada yapılmıştır.

$\alpha$ -amilaz analizi için Jiang ve Wang (2012) de bildirdikleri metotda bazı değişiklikler yapılmıştır. Kısaca %2 lik nişasta solüsyonu ile aynı oranda bağırsak homojenizatı 1 saat

inkübe edilmiştir. Sonrasında aynı oranda renk reaktifi ilave edilen örnekler 5 dakika kaynayan suya maruz bırakılmış ve buz üzerinde reaksiyon durdurulmuştur. Herbir örnek üzerine saf su ilave edilmiş ve okumalar 540 nm de yapılmış ve sonuçlar maltoz standardı kullanılarak hesaplanmıştır.

Lipaz analizinde German ve ark. (2004) bildirdikleri metot kullanılmıştır. Bu amaçla bağırsak homojenizatları tris-şokalat tamponu ve metoksietanol ile 15 dakika inkübasyona bırakılmış devamında p-nitrofenil miristat ilave edilen örnekler vorteksle karıştırılarak 15 °C de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Herbir örneğe aseton/heptan karışımı ilave edildikten sonra örnekler 6100 g de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Okumalar 405 nm de yapılmıştır.

Alkalen fosfataz analizi için gerekli seyreltme yapılmış 40 µL bağırsak homojenizatı ile 200 µL PNPP substratı 96 kuyucuklu plakalarda 24 °C de inkübasyona bırakılmış ve okumalar 10 dakika boyunca birer dakika arayla kinetik olarak 405 nm de mikropilaya okuyucuda yapılmıştır.

Pepsin analizinde Worthington (1993) un bildirdiği metot kullanılmıştır. Örnekler %2 hemoglobin solüsyonu ile 35 °C de 10 dakika inkübe edilmiş ve devamında reaksiyon TCA ile durdurulmuştur. Devamında örnekler 12000 g de 5 dakika santrifüj edilmiş ve okumalar 280 nm de yapılmıştır.

### **3.12. *Bacillus subtilis* ve *Yersinia ruckeri* Bakterilerinin Teşhisi**

*Bacillus subtilis* bakterisinin bağırsak florasına yerleşip yerleşmediğinin tespit edilmesi için TSA agar da 35 °C de *Bacillus* benzeri üreyen 900 adet koloni izole edilmiş ve devamında Gram pozitif, basil görünümlü, spor oluşturan bakteriler şüpheli *Bacillus* olarak değerlendirilmiş ve ticari Gram pozitif identifikasyon kiti ile (BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit) izole edilen bakterilerin *Bacillus subtilis* olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Ticari kit ile *Bacillus* benzeri üreyen tüm koloniler *Bacillus subtilis* olarak tespit edilmiştir. *Y. ruckeri* E42 ile infekte edilen balıklardan ölenlerin kızıl ağız hastalığından mı öldüklerinin tespit edilmesi amacıyla ölen balıkların dalaklarından TSA agara ekim yapılmış ve izole edilen 600 adet koloninin konvansiyonel mikrobiyolojik testler uygulanarak *Y. ruckeri* olup olmadıkları tespit edilmiştir (Austin ve Austin 2007; Altun ve ark., 2013). Yapılan testler sonucunda izole edilen tüm koloniler *Y. ruckeri* olarak değerlendirilmiştir. *Bacillus subtilis* olarak izole edilen kolonilerden rastgele seçilen 9 adet bakteri izolatu ve balıklara deneme sonlarında infekte edilmek için kullanılan *Yersinia ruckeri* suşu moleküler yöntemler ile teşhis etmek için kullanılmıştır. Tüm

izolatlar Nutrient Borth besiyerine ekilmiş ve 22 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerden alınan örnekler PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) üretici firma yönergeleri doğrultusunda kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve evrensel bakteri primer setleri S-20 (5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3') ve A-18 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') PCR için kullanılmıştır. PCR karışımı (50 µL); yaklaşık 50 ng kalıp DNA, her bir primerden 0,4 µM, PCR Master Mix (2X) ve nükleaz içermeyen su içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon, termal döngü cihazında (Biometra); ilk denatürasyon 95 °C 3 dk., 25 döngü olarak 95 °C 30 sn., 56 °C 1 dk., 72 °C 1 dk. ve son uzama adımı 72 °C 4 dk. olacak şekilde programlanarak gerçekleştirilmiştir (Innis ve ark., 2012). Bu koşullarda saf olarak elde edilen izolatların DNA'larının; 16S rRNA geninin yaklaşık 540 bp'lik bölgesi ve *gyrB* geninin yaklaşık 1390 bp'lik bölgesi çoğaltılmıştır (Suau ve ark., 1999). PCR ürünleri, amplifikasyon sonunda TAE ile hazırlanmış ve 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1,5'lik (w/v) agaroz jelde 40 dakika 90 V altında elektroforeze tabi tutulmuştur. PCR ürünleri UV transillüminatör cihazında görüntülenmiş ve 100 bp DNA Ladder ile bantların yaklaşık uzunlukları hesaplanmıştır (Innis ve ark., 2012). PCR ürünleri BM Labosis firması tarafından çift yönlü olarak dizilenmiş, elde edilen diziler GenBank (NCBI) veritabanında sorgulanmıştır.

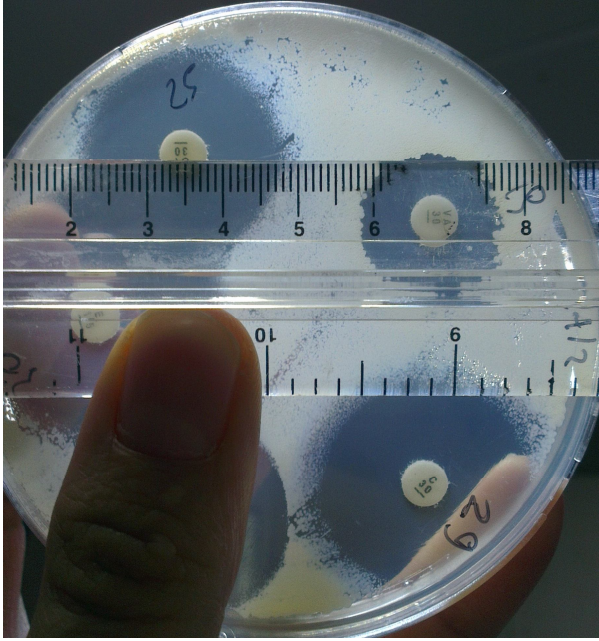
### **3.13. *In vitro* Denemeler**

Çalışma kapsamında bazı *in vitro* denemeler de yürütülmüştür. Bu denemelerde sinnamik asitin gökkuşağı alabalığı bağırsak izolatlarına ve bazı balık patojenlerine, sinnamik asit+*B.subtilis* üst fazının ise bazı balık patojenlerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve sıvı kültür inhibisyon testleri yapılmıştır.

#### **3.13.1. Disk Difüzyon Testi**

Disk difüzyon testi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) standartları uygulanmıştır (CLSI, 2005; Miller, 2003). Bu amaçla balık patojenleri Çizelge 10 de verilen uygun sıcaklık ve sıvı besiyerlerinde üretilerek yoğunlukları 0.5 McFarland olarak ayarlanmıştır. Devamında bakteri türleri için uygun katı besiyeri (Çizelge 10) üzerine yoğunluğu ayarlanmış (0.5 McFarland) sıvı besiyerlerinde üremiş bakterilerden steril pamuk svab ile geçiş yapılmıştır. Geçiş yapıldıktan sonra disk difüzyon testi için steril diskler katı besiyeri üzerine konularak, sinnamik asit (2 mg/disk) ve antibiyotik

diskler (OXOID, Streptomycin, Eritromisin, Forfenikol, Trimethoprim/sulphamethoxazole 1:19, Oxytetracycline, Doxycycline, Gentamicin, Amoxicillin/clavulanic acid, Vancomycin ve Chloramphenicol) yerleştirilmiştir. Gerekli inkübasyon sıcaklık ve sürelerinden sonra (Çizelge 10) oluşan zonlar ölçülmüştür (Şekil 3.6.). Sınnamik asitin zon çaplarına göre etkisini belirlemek için  $\geq 20$  mm zon güçlü inhibisyon,  $< 20-12$  mm arası orta dereceli inhibisyon ve  $< 12$  mm ise inhibisyon etkisinin olmadığı kabul edilmiştir (Rota ve ark., 2008).



Şekil 3.6. Antibiyotik ve sınnamik asit disklerinin zon çapları ölçüm görüntüsü (Orjinal)

### 3.13.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu analizi Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) tarafından belirtilen metotlar ile yapılmıştır. Çözücü olarak DMSO (%5) kullanılmıştır. Sınnamik asit stok solüsyonu (2000  $\mu\text{g/mL}$  pH nötrlemesiz) ve (5000  $\mu\text{g/mL}$  pH nötrlemeli) uygun üreme besi ortamı içerisinde hazırlandıktan sonra 100  $\mu\text{l}$  besi ortamı 100  $\mu\text{l}$  stok solüsyonu ilave edilerek 96 plakalar içerisinde iki katlı seyreltmeler (2000-1,95  $\mu\text{g/mL}$ , 5000-2,44  $\mu\text{g/mL}$ ) yapılmıştır. Devamında kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$  bakteri süspansiyonu ( $10^5$  CFU/mL) ilave edilmiştir. Kontrol kuyucuklarına:

- 1-Sadece 200  $\mu\text{l}$  bakterili besi ortamı
- 2- DMSO ve her sınnamik asitin her bir konsantrasyonlarını içeren 200  $\mu\text{l}$  bakterisiz besi ortamı
- 3-Sadece 200  $\mu\text{l}$  bakterisiz besi ortamı konulmuştur.

Devamında plakalar optimum üreme sıcaklıklarında ve besi ortamlarında 24 saat inkübatör de üremeye bırakılmıştır. MİK değeri üremeyi inhibe eden konsantrasyona bakılarak belirlenmiştir.

### 3.13.3. Sıvı Kültür İnhibisyon Testi

Sıvı kültür inhibisyon testi için literatürde bildirilen 96 çukur plakada yapılan standart metotlar kullanılmıştır (Kongnum ve Hongpattarakere 2012; Nakayama ve ark., 2009; Khouiti ve Simon 1997). Test için balık patojenleri Çizelge 10 de verilen uygun sıcaklık ve sıvı besiyerlerinde üretilmiş (CLSI, 2005, Miller, 2003) yoğunlukları  $1 \times 10^6$  CFU/mL olarak ayarlanmıştır (Kongnum ve Hongpattarakere 2012). *B. subtilis* bakterisinin antimikrobiyal üst fazın elde edilmesinde literatürde bildirilen metotlar kullanılmıştır (Touraki ve ark., 2012; Balcazar ve Rojas-Luna 2007; Kongnum ve Hongpattarakere 2012). Bu amaçla *B. subtilis* kültürü 250 mL Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besi yerini içeren 500 mL erlende 36 °C de 24 saat üretilmiştir. Devamında *B. subtilis* bakterilerini içeren sıvı besiyerleri steril falkon tüpleri içerisinde 2142 xg de 10 dakika santrifüj (Nüve NF 400) edilmiştir ve bakteri kolonilerinin çökmesi sağlanmıştır. Çökme işleminden sonra içerisinde probiyotik bakterilerin üremesi sonucu meydana gelen antimikrobiyal bileşenleri içeren üst fazlar dikkatlice alınarak önce 0,45-µm millipor filtreden sonra steril 0,22-µm millipor filtreden geçirilmişlerdir. Probiyotik bakterilerin üretimiyle elde edilen bu üst faz asidik özellik gösterdiğinden (Schoster ve ark., 2013) üst fazın patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal etkileri, pH nötrlemesi yapılarak araştırılmıştır. pH nötrlemesinde literatürde bildirildiği gibi 5N sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmış ve üst fazın pH sı 6.9 olarak ayarlanmıştır (Kongnum ve Hongpattarakere 2012).

Sinnamik asitin *B.subtilis* bakterisinin üst fazı ile birlikte etkisinin tespiti için bakteri üs fazının içerisinde 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüştür. Devamında *B.subtilis* bakterisinin ve sinnamik asit+ *B.subtilis* üst fazlarından plakalara 40 µl ilave edilmiş ve üzerine yoğunluğu  $1 \times 10^6$  CFU/mL olarak ayarlanmış balık patojenlerini içeren sıvı besiyerlerinden 160 µl ilave edilmiştir. Okumalar 600 nm de yapılmıştır. Okumalar mikropkaka okuyucuda saatlik olarak 36 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen okuma sonuçları ile çizilen grafiklerden *B.subtilis* bakterisinin ve sinnamik asit+*B.subtilis* bakterisinin birlikte etkisinin balık patojenleri üzerindeki antagonistik etkileri analiz edilmiştir. Analizler herbir bakteri türü için 3 farklı zamanda, iki tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve elde edilen sonuçların ortalamaları alınmıştır.



Çizelge 3.1. *In vitro* denemelerde kullanılan alabalık bağırsak izolatları ve balık patojenleri

Bakteri	Açıklama	Gen Bankası Erişim Numarası	Üreme Ortamı	(°C)
<i>Aeromonas sobria</i> SY-AS3	Bİ	KY126831	MH	22
<i>Acinetobacter johnsonii</i> SY-AJ	Bİ	KY126836	MH	22
<i>Bacillus nealsonii</i> SY-BN9	Bİ	KY126832	TS	37
<i>Bacillus pumilus</i> SY-BP15	Bİ	KY126833	MH	37
<i>Bacillus subtilis</i> SY-BS19	Bİ	KY077683	MH	37
<i>Bacillus subtilis</i> SY-BS20	Bİ	KY078783	MH	37
<i>Bacillus thuringiensis</i> SY-BT11	Bİ	KY127450	MH	37
<i>Citrobacter freundii</i> , SY-CF14	Bİ	KY126840	MH	37
<i>Enterobacter sp.</i> , SY-EN560	Bİ	KX388232	MH	22
<i>Lelliottia amnigena</i> SY-LA18	Bİ	KY126834	MH	37
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> SY-LX12	Bİ	KY078822	MH	37
<i>Pseudomonas putida</i> SY-PP21	Bİ	KY126830	MH	22
<i>Shewanella baltica</i> , SY-S145	Bİ	KX388237	MH*	22
<i>Flavobacterium spartansii</i> SY-FS1	-	KY386294	TS	22
<i>Aeromonas sobria</i> SY-AS1	Patojen	KY126835	MH,TS	28
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> , ATCC 33658	Patojen	-	MH,TS	22
<i>Citrobacter sp.</i> , SY-C10	Patojen	KX388233	MH,TS	28
<i>Edwardsiella tarda</i> SY-ED1	Patojen	KY126838	MH,TS	28
<i>Edwardsiella tarda</i> SY-ED14	Patojen	KX388234	MH,TS	28
<i>Lactococcus garvieae</i> , SY-LG1	Patojen	KY118086	MH,TS	24
<i>Listonella anguillarum</i> , SY-L24	Patojen	KX388236	MH,TS*	24
<i>Streptococcus iniae</i> ATCC 2917	Patojen	-	BH	37
<i>Yersinia ruckeri</i> , E42	Patojen	KX388238	MH,TS	22
<i>Lactobacillus plantarum</i> , BC 7321	Koleksiyon	-	MRS	30
<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC 6633	Koleksiyon	-	MH	37
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	Koleksiyon	-	MH,TS	37

\*%1,5 tuzlu besi ortamı, MH:Muller Hinton besi ortamı, Bİ: Bağırsak İzolatı, BH: Brean Heart besi ortamı, TS:Triptic Soy besi ortamı.

### 3.14. İstatistiksel Analizler

Bu doktora tezi kapsamında deneme gruplarından elde edilen veriler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde verilerin normal dağılım göstermesi ve homejen olması

durumunda Tukey çoklu karşılaştırma testi, normal dağılım göstermeyen, homejen verilerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve homojen olmayan verilerin karşılaştırılmasında Tamhane testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 19 (IBM SPSS Statistics 19) programı kullanılarak  $p<0,05$  önemlilik seviyesinde değerlendirilmiştir.



## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları

Tüm denemelerde suyun sıcaklığı 15,5-16,5 °C, oksijeni 7,6-7,9 mg/l, iletkenliği 400-450  $\mu\text{s cm}^{-1}$ , pH 7,5-7,8, toplam amonyak 0,01-0,015 mg/l, Nitrit 0,02-0,04 mg/l ve Nitrat 0,7-0,9 mg/l aralıklarında tespit edilmiştir.

#### 4.2. Deneme 1.1.

##### 4.2.1. Büyüme Performansı Bulguları

Deneme sonunda balıkların ortalama başlangıç ağırlığı (OBA), ortalama son ağırlığı (OSA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çalışma sonucunda %0 (kontrol), %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarında sinnamik asit içerikli yemlerle beslenen gökkuşacağı alabalık yavrularının büyüme performansında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir değişim olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.1. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
OBA (g)	17,51±0,03	17,41±0,10	17,53±0,01	17,44±0,10	17,54±0,02
OSA (g)	47,34±0,50	46,61±0,38	46,54±0,13	46,01±0,87	46,24±0,89
CAA (%)	170,35±2,93	167,64±2,12	165,55±0,87	163,86±3,68	163,61±5,34
YDO	0,86±0,01	0,87±0,01	0,88±0,00	0,89±0,02	0,89±0,03
SBO (% gün <sup>-1</sup> )	1,66±0,02	1,64±0,01	1,63±0,01	1,62±0,02	1,61±0,03

##### 4.2.2. Besin Kompozisyonu ve Karaciğer Yağ Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen sinnamik asitin besin kompozisyonu (Çizelge 4.2.) bulgularından kuru madde, protein, yağ ve kül ile karaciğer yağı üzerine istatistiksel olarak bir etkisinin olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.2. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
Kuru Madde (%)	29,40±0,47	29,75±0,44	29,59±0,36	29,17±0,39	29,38±0,09
Protein (%)	16,59±0,21	16,08±0,16	16,58±0,30	16,39±0,27	16,17±0,30
Yağ (%)	9,43±0,33	9,81±0,25	9,81±0,25	9,75±0,29	10,21±0,24
Kül (%)	2,73±0,09	2,74±0,07	2,71±0,03	2,67±0,04	2,76±0,04
Karaciğer Yağ Oranı (%)	6,46±0,39	5,64±0,42	5,79±0,53	5,59±0,63	5,42±0,48

\*Protein, yağ ve kül sonuçlarının oranları kuru madde içerisinde % olarak gösterilmiştir.

#### 4.2.3. Yağ Asidi Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen sinnamik asitin yağ asitleri üzerine etkileri Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Deneme gruplarının yağ asitleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.3. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti yağ asidi kompozisyonları bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
C14:0	1,96±0,08	2,14±0,02	2,12±0,02	2,12±0,02	2,10±0,04
C14:1	0,01±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
C16:0	14,22±0,21	14,37±0,35	14,17±0,13	14,09±0,09	14,32±0,38
C16:1	3,40±0,22	2,65±1,14	3,53±0,23	3,74±0,07	3,43±0,31
C18:0	20,97±2,21	30,08±1,69	20,06±3,13	25,07±2,03	28,93±2,00
C18:1n9C+T (n-9)	18,03±2,60	11,99±1,68	20,89±2,91	16,92±2,07	12,35±1,40
C18:2n6c (n-6)	15,02±0,40	15,85±0,11	15,42±0,26	15,62±0,07	15,53±0,22
C18:3n6 (n-6)	2,82±0,08	3,07±0,07	3,01±0,04	2,99±0,04	3,05±0,02
C18:3n3 (n-3)	0,49±0,05	0,54±0,00	0,49±0,01	0,53±0,01	0,50±0,03
C20:1n9	2,81±0,11	2,97±0,03	3,11±0,13	3,08±0,05	2,88±0,03
C20:2	1,35±0,02	1,41±0,05	1,39±0,05	1,38±0,02	1,37±0,03
C20:3n6 (n-6)	0,57±0,03	0,57±0,02	0,57±0,01	0,56±0,01	0,61±0,06
C20:3n3 (n-3)	0,75±0,07	0,64±0,05	0,61±0,05	0,59±0,02	0,62±0,03
C20:4n6 (n-6)	0,33±0,05	0,39±0,01	0,40±0,01	0,39±0,01	0,38±0,01
C20:5n3 (n-3)	2,15±0,14	1,93±0,12	1,95±0,17	1,83±0,01	1,86±0,04
C22:0	-	-	0,02±0,02	-	0,01±0,01
C22:1n9	1,05±0,07	1,06±0,01	1,06±0,02	1,06±0,03	1,02±0,05
C22:2	1,91±1,59	0,04±0,00	0,34±0,16	0,15±0,04	0,63±0,29
C23:0	0,17±0,03	0,19±0,04	0,16±0,02	0,20±0,03	0,20±0,04
C22:6n3 (n-3)	11,98±1,16	10,10±0,70	10,66±1,06	9,69±0,14	10,16±0,53
Total ω-3	37,32±2,04	46,78±1,34	36,54±3,23	41,48±1,99	45,57±1,65
Total ω-6	62,68±2,04	53,22±1,34	63,46±3,23	58,52±1,99	54,43±1,64
Total ω-9	1,70±0,15	1,14±0,07	1,78±0,22	1,42±0,12	1,20±0,08
SFA	25,30±2,61	18,69±0,58	28,62±2,76	24,82±2,04	19,72±1,02
USFA	37,38±2,18	34,54±0,82	34,84±1,15	33,71±0,07	34,71±0,71
USFA/SFA	5,55±0,22	5,23±0,03	5,45±0,06	5,31±0,04	5,46±0,19
Σ MUFA	15,37±1,31	13,20±0,87	13,71±1,27	12,63±0,17	13,15±0,57
Σ PUFA	18,74±0,45	19,88±0,17	19,40±0,28	19,55±0,13	19,57±0,17
DHA/EPA	21,89±2,56	16,01±1,71	25,06±2,88	21,05±2,08	16,26±1,32

#### 4.2.4. Bağırsak Mikrobiyotası Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen sinnamik asitin bağırsaklardaki bakteri grupları üzerine etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla bağırsaklarda *Enterobacteriaceae*, koliform, laktik asit ve toplam heterotrofik aerobik bakterileri ile maya ve küflerin de sayımları yapılmıştır (Çizelge 4.4.). Deneme sonunda sinnamik asit ilavesinin bağırsak florasında analiz edilen bakteri grupları ile maya ve küfler üzerine istatistiksel olarak herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.4. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre bağırsaklarda bakteri grupları ile maya ve küflerin ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) toplam sayımları bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
Toplam heterotrofik aerobik bakteri	6,39±0,16	6,18±0,27	6,16±0,26	6,52±0,11	6,77±0,17
Maya ve küf	5,02±0,32	3,96±0,14	4,09±0,21	4,37±0,33	5,33±0,69
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,39±0,61	4,73±0,83	4,73±0,15	5,37±0,33	6,07±0,33
Koliform	5,31±0,29	4,39±0,90	4,35±0,17	4,87±0,38	5,37±0,33
Laktik asit bakterileri	1,33±0,20	1,36±0,23	1,49±0,25	1,38±0,25	1,49±0,25

#### 4.2.5. Yem, Mide ve Bağırsak pH Bulguları

Deneme sonunda sinnamik asitin yem, bağırsak ve mide pH değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir. 60. gün sonunda mide ve bağırsak pH değerleri tüm gruplarda benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.5. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre yem, mide ve bağırsak pH değerlerindeki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
Yem pH	5,89	5,87	5,82	5,76	5,77
Mide pH	6,69±0,07	6,85±0,05	6,62±0,02	6,69±0,03	6,75±0,04
Bağırsak pH	6,90±0,06	6,89±0,09	6,74±0,03	6,81±0,02	6,83±0,09

#### 4.2.6. Bağırsak ve Mide Enzim Bulguları

Deneme sonunda sinamik asitin bağırsak ve mide enzimlerinden tripsin, amilaz, lipaz, alkalen fosfataz ve pepsin değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.6.'de gösterilmiştir. Bağırsak enzimlerinden tripsin, amilaz ve lipaz gruplar arasında istatistiksel olarak fark göstermezken, alkalen fosfataz %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,075 sin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük çıkmıştır ( $p<0,05$ ). Mide pepsin bulgularına bakıldığında %0,075 sin grubunda kontrol, %0,025 sin ve %0,150 sin gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır ( $p<0,05$ ). Ancak, pepsin değeri %0,050 sin grubu ile diğer tüm gruplar benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.6. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre bağırsakta tripsin, amilaz, lipaz ve alkalen fosfataz ve mide de pepsin enzimleri bulgularındaki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
Tripsin (U/mg protein/min)	1,22±0,08	1,55±0,13	1,27±0,07	1,64±0,19	1,91±0,25
Amilaz (mU/mg protein)	75,27±11,01	61,40±8,36	73,23±7,54	55,88±8,75	47,37±6,31
Lipaz (uMol/mg protein/min)	0,14±0,01	0,16±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01	0,14±0,01
Alkalen fosfataz (U/mg protein/min)	0,35±0,03 <sup>a</sup>	0,19±0,02 <sup>b</sup>	0,17±0,02 <sup>b</sup>	0,21±0,04 <sup>b</sup>	0,25±0,03 <sup>ab</sup>
Pepsin (U/mg protein/ min)	21,24±3,15 <sup>b</sup>	21,42±2,09 <sup>b</sup>	25,80±3,14 <sup>ab</sup>	33,58±1,38 <sup>a</sup>	22,55±2,80 <sup>b</sup>

#### 4.2.7. İç Organ İndeks Bulguları

Deneme sonunda sinamik asitin iç organ indekslerinden visserosomatik indeks (VSİ), hepatosomatik indeks (HSİ), iç organ yağı indeksi (İOYİ), safra somatik indeksi (SSİ), dalak somatik indeksi (DSİ) ve kalp somatik indeksi (KSİ) değerleri üzerine etkisi

Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Deneme sonunda deneme gruplarının iç organ indeksleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.7. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre iç organ indekslerindeki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025sin	%0,050sin	%0,075sin	%0,150sin
VSİ	13,74±0,50	11,74±0,60	12,44±0,36	11,65±0,58	13,51±0,66
HSİ	1,29±0,07	1,14±0,06	1,24±0,05	1,38±0,04	1,57±0,15
İOYİ	3,51±0,44	2,65±0,13	3,09±0,45	2,74±0,58	2,49±0,29
SSİ	0,39±0,03	0,36±0,04	0,32±0,03	0,30±0,03	0,29±0,02
DSİ	0,16±0,02	0,21±0,02	0,14±0,01	0,22±0,02	0,16±0,02
KSİ	0,20±0,02	0,20±0,01	0,21±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01

#### 4.2.8. Serum Biyokimyası Bulguları

Deneme sonunda sinamik asitin serum biyokimyasal parametrelerden trigliserit (TRİ), kolesterol (KOL), glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT), glutamik pirüvik transaminaz (GPT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalen fosfataz (ALP) üzerine etkileri Çizelge 4.8.'de verilmiştir. TRİ miktarının %0,050 sin, %0,075 sin ve %0,150 sin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük çıktığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). KOL miktarının ise tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür ( $p>0,05$ ). GOT ve GPT miktarlarının 0,075 sin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük çıktığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca GPT miktarının %0,075 sin grubunda %0,050 sin ve %0,150 sin gruplarına göre de istatistiksel olarak daha düşük çıktığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). LDH miktarının ise %0,050 sin, %0,075 sin ve %0,150 sin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük çıktığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). ALP miktarının %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrol ve %0,150 sin gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük çıktığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



Çizelge 4.8. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre serum biyokimyası bulgularındaki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025 sin	%0,050 sin	%0,075 sin	%0,150 sin
TRİ (mg/dL)	98,66±2,33 <sup>a</sup>	85,83±6,19 <sup>ab</sup>	70,39±5,11 <sup>b</sup>	70,42±3,85 <sup>b</sup>	76,75±4,59 <sup>b</sup>
KOL (mg/dL)	244,31±7,00 <sup>a</sup>	195,19±17,01 <sup>a</sup>	202,59±13,10 <sup>a</sup>	216,60±19,45 <sup>a</sup>	207,61±19,89 <sup>a</sup>
GOT (U/L)	80,26±3,94 <sup>a</sup>	67,31±3,99 <sup>ab</sup>	65,37±7,19 <sup>ab</sup>	57,56±3,13 <sup>b</sup>	72,46±6,31 <sup>ab</sup>
GPT (U/L)	10,07±0,81 <sup>a</sup>	9,08±0,88 <sup>ab</sup>	10,57±1,03 <sup>a</sup>	6,33±0,36 <sup>b</sup>	10,77±1,13 <sup>a</sup>
LDH (U/L)	893,81±48,84 <sup>a</sup>	787,51±28,15 <sup>ab</sup>	617,70±52,97 <sup>c</sup>	657,01±19,54 <sup>bc</sup>	633,72±42,66 <sup>bc</sup>
ALP (U/L)	318,85±18,31 <sup>a</sup>	202,08±18,25 <sup>b</sup>	214,34±12,53 <sup>b</sup>	237,04±16,26 <sup>ab</sup>	293,34±21,34 <sup>a</sup>

#### 4.2.9. Serum Antioksidan Analiz Bulguları

Deneme sonunda sinnamik asitin serum antioksidan analizlerinde toplam antioksidan kapasitesi (TAK), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) üzerine etkileri Çizelge 4.9.'de gösterilmiştir. Deneme sonunda TAK miktarı %0,150 sin grubunda kontrol ve %0,025 sin grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). SOD enzim aktivitesi ise %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,075 sin gruplarında kontrol ve %0,150 sin grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek bulunmuştur. CAT enziminin deneme sonunda tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

Çizelge 4.9. Deneme 1.1. sonunda gruplara göre serum antioksidan analiz bulgularındaki değişimler

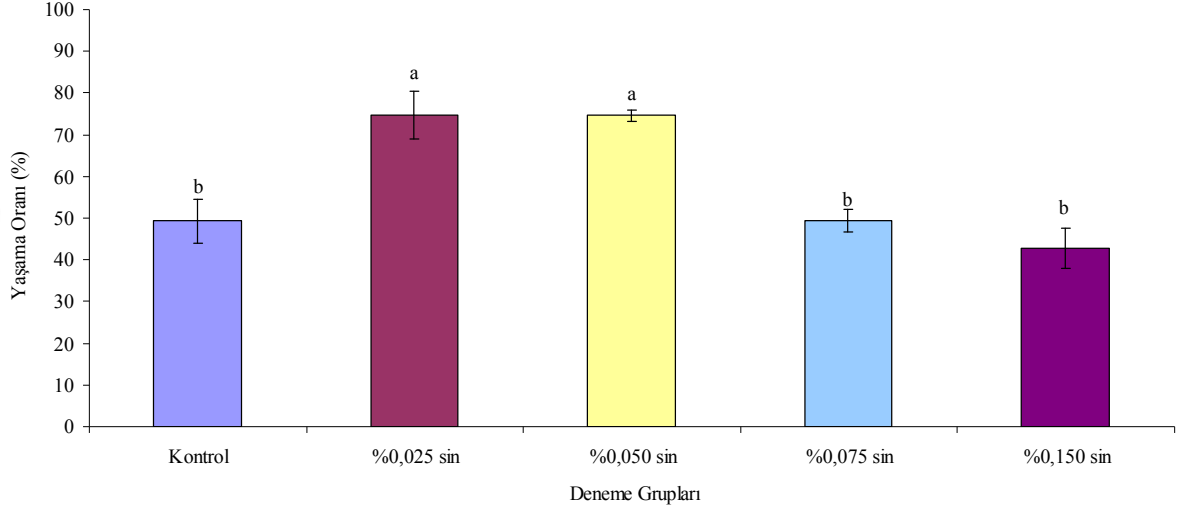
Parametreler	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025 sin	%0,050 sin	%0,075 sin	%0,150 sin
TAK (Trolox, mM)	0,120±0,005 <sup>b</sup>	0,122±0,014 <sup>b</sup>	0,140±0,007 <sup>ab</sup>	0,153±0,008 <sup>ab</sup>	0,158±0,004 <sup>a</sup>
SOD (%inhibisyon)	73,68±0,84 <sup>c</sup>	88,03±1,17 <sup>a</sup>	81,36±0,51 <sup>b</sup>	82,85±0,36 <sup>b</sup>	76,51±0,69 <sup>c</sup>
CAT (kU/L)	102,47±8,01 <sup>a</sup>	129,13±8,78 <sup>a</sup>	97,54±5,43 <sup>a</sup>	129,83±5,99 <sup>a</sup>	112,78±11,45 <sup>a</sup>

### 4.3. Deneme 1.2.

#### 4.3.1. LD50 ve Yaşama Oranı Bulguları

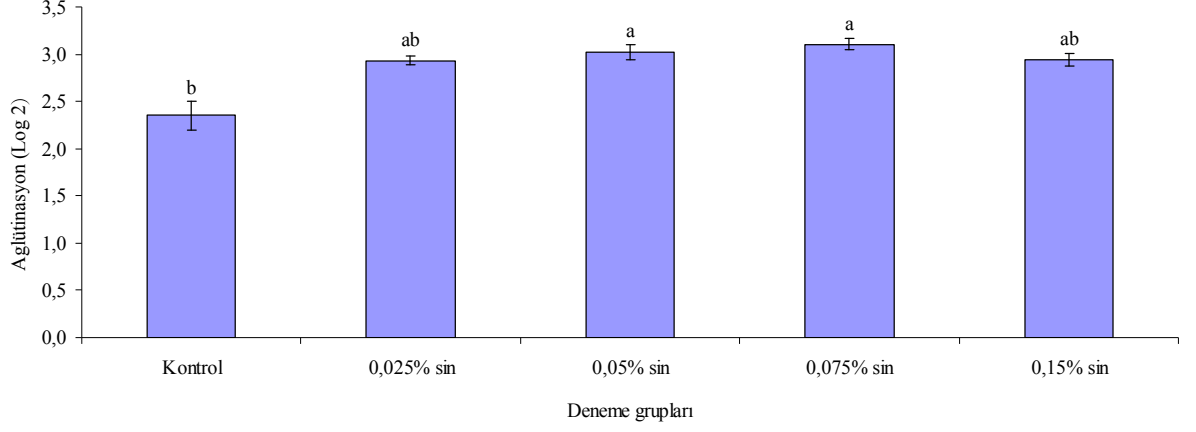
Denemelerden önce LD50 nin hesaplanması için balıklara  $3 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$  dozajlarında *Y.ruckeri* enfekte edilmiş ve yaşama oranları sırasıyla %53,33, %43,33, %40,00, %36,66, %33,33, %30,00 ve %26,67 olarak bulunmuştur. Sonrasında Probit analizi ile LD50 değeri  $3 \times 10^8$  olarak hesaplanmıştır.

Deneme sonunda sinnamik asitin hastalık direnci üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla balıklar *Yersinia ruckeri* bakterisi ile infekte edilmişlerdir. Devamında 20 gün boyunca balıklardaki yaşama oranları izlenmiştir. Deneme grupları arasındaki yaşama oranları Şekil 4.1.'de görüldüğü gibidir. Deneme sonunda %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının kontrol ve diğer sinnamik asit gruplarına göre istatistiksel olarak yaşama oranını arttırdığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.1. Deneme 1.2 sonunda *Y.ruckeri* ile infekte edilmiş alabalıkların gruplar arasındaki yaşama oranlarındaki değişimler

Aglütinasyon testi sonucunda (Şekil 4.2.) hayatta kalan balıkların tümünde *Y.ruckeri* karşı aglütinasyon oluşturdukları bulunmuştur. Ancak sinnamik asit içeren %0,050 ve %0,075 gruplarının kontrol grubuna göre aglütinasyon miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.2. Deneme 1.2 sonunda gruplara göre aglütinasyon bulgularındaki değişimler

#### 4.3.2. Hematolojik Bulgular

Deneme süresince gruplar arasındaki hematolojik bulgulardan eritrosit miktarı (RBC), hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonunda (MCHC) meydana gelen değişimler Çizelge 4.10.'de verilmiştir. Deneme 1.2. süresince besleme grupları arasında RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak deneme sonunda MCHC değerinin %0,150 sin grubunda kontrol ve %0,025 sin gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, deneme sonunda balıklar *Y.ruckeri* ile infekte edildikten 20 gün sonra (çalışmanın 80. günü) hematolojik analizlere tekrar bakılmıştır. 80. günde %0,050 grubunun RBC ve Hct değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

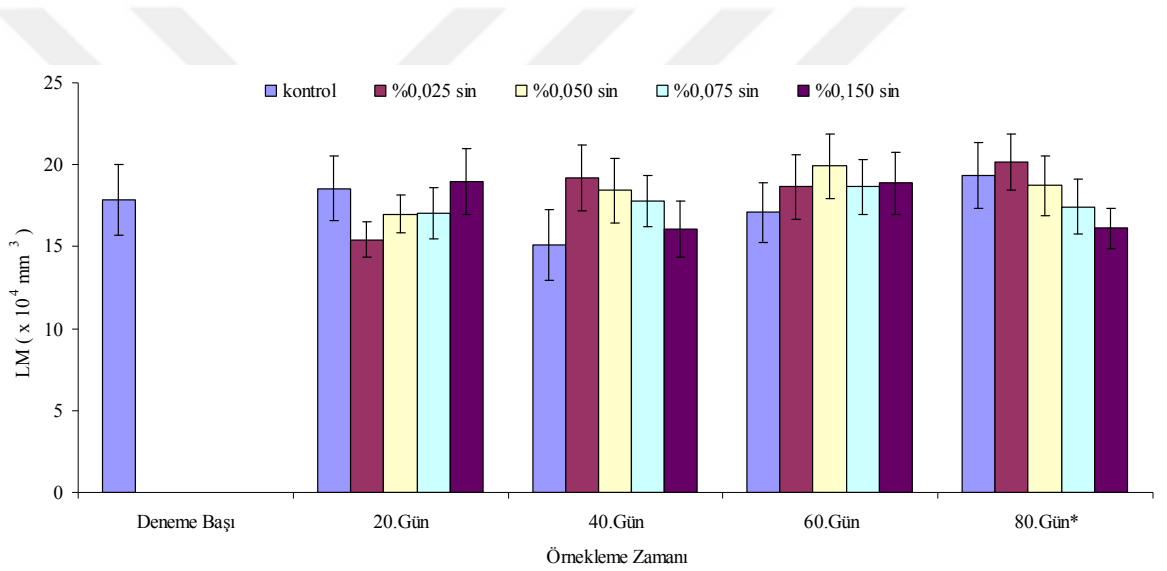
Çizelge 4.10. Deneme 1.2 süresince gruplara göre hematolojik bulgulardaki değişimler

Parametreler	Günler	Deneme Grupları				
		Kontrol	%0,025sin	%0,05sin	%0,075sin	%0,150sin
RBC ( $\times 10^6$ $\text{mm}^{-3}$ )	D.başı	2,04 $\pm$ 0,06	2,04 $\pm$ 0,06	2,04 $\pm$ 0,06	2,04 $\pm$ 0,06	2,04 $\pm$ 0,06
	20	2,23 $\pm$ 0,03	2,30 $\pm$ 0,03	2,34 $\pm$ 0,02	2,31 $\pm$ 0,03	2,28 $\pm$ 0,02
	40	2,53 $\pm$ 0,09	2,78 $\pm$ 0,07	2,80 $\pm$ 0,06	2,72 $\pm$ 0,04	2,76 $\pm$ 0,10
	60	2,20 $\pm$ 0,04	2,06 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,05	2,07 $\pm$ 0,08	2,12 $\pm$ 0,07
	80*	2,35 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	2,52 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	2,64 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	2,37 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	2,40 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	D.başı	7,33 $\pm$ 0,64	7,33 $\pm$ 0,64	7,33 $\pm$ 0,64	7,33 $\pm$ 0,64	7,33 $\pm$ 0,64
	20	8,65 $\pm$ 0,49	8,53 $\pm$ 0,58	10,19 $\pm$ 0,50	8,92 $\pm$ 0,21	9,45 $\pm$ 0,34
	40	9,82 $\pm$ 1,03	10,04 $\pm$ 0,23	9,18 $\pm$ 0,37	9,44 $\pm$ 0,27	8,99 $\pm$ 0,58
	60	9,87 $\pm$ 0,34	9,25 $\pm$ 0,29	9,18 $\pm$ 0,33	9,91 $\pm$ 0,44	10,29 $\pm$ 0,36
	80*	8,13 $\pm$ 0,34	8,31 $\pm$ 0,33	8,56 $\pm$ 0,60	7,73 $\pm$ 0,23	7,50 $\pm$ 0,36
Hct (%)	D.başı	25,79 $\pm$ 1,11	25,79 $\pm$ 1,11	25,79 $\pm$ 1,11	25,79 $\pm$ 1,11	25,79 $\pm$ 1,11
	20	28,58 $\pm$ 0,78	29,70 $\pm$ 0,66	30,64 $\pm$ 0,40	30,04 $\pm$ 0,50	29,79 $\pm$ 0,38
	40	34,80 $\pm$ 0,95	36,63 $\pm$ 0,68	36,09 $\pm$ 0,78	35,52 $\pm$ 0,58	34,84 $\pm$ 1,43
	60	37,94 $\pm$ 0,55	35,62 $\pm$ 1,10	34,33 $\pm$ 0,87	35,86 $\pm$ 1,28	36,31 $\pm$ 0,99
	80*	30,22 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>	33,23 $\pm$ 0,89 <sup>ab</sup>	35,12 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	31,22 $\pm$ 1,05 <sup>ab</sup>	31,17 $\pm$ 1,29 <sup>ab</sup>
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	D.başı	125,84 $\pm$ 1,51	125,84 $\pm$ 1,51	125,84 $\pm$ 1,51	125,84 $\pm$ 1,51	125,84 $\pm$ 1,51
	20	127,97 $\pm$ 2,21	129,06 $\pm$ 1,50	130,69 $\pm$ 0,68	130,26 $\pm$ 0,60	130,56 $\pm$ 0,45
	40	139,91 $\pm$ 8,50	131,80 $\pm$ 1,43	129,14 $\pm$ 1,17	130,68 $\pm$ 0,92	126,41 $\pm$ 3,82
	60	172,83 $\pm$ 0,96	173,19 $\pm$ 2,12	170,88 $\pm$ 2,13	173,62 $\pm$ 2,60	171,54 $\pm$ 2,87
	80*	128,73 $\pm$ 1,31	131,74 $\pm$ 1,08	132,74 $\pm$ 0,58	131,79 $\pm$ 1,81	129,54 $\pm$ 0,91
MCH (pg)	D.başı	35,83 $\pm$ 3,02	35,83 $\pm$ 3,02	35,83 $\pm$ 3,02	35,83 $\pm$ 3,02	35,83 $\pm$ 3,02
	20	38,66 $\pm$ 1,89	37,02 $\pm$ 2,28	43,44 $\pm$ 2,11	38,67 $\pm$ 0,72	41,37 $\pm$ 1,17
	40	38,89 $\pm$ 3,81	36,16 $\pm$ 0,70	32,81 $\pm$ 0,99	34,72 $\pm$ 0,68	32,49 $\pm$ 1,61
	60	44,89 $\pm$ 1,24	45,09 $\pm$ 1,30	45,61 $\pm$ 0,96	47,90 $\pm$ 0,98	48,54 $\pm$ 1,04
	80*	34,66 $\pm$ 1,06	33,09 $\pm$ 1,62	32,24 $\pm$ 1,84	32,82 $\pm$ 1,24	31,31 $\pm$ 1,16
MCHC (%)	D.başı	28,50 $\pm$ 2,48	28,50 $\pm$ 2,48	28,50 $\pm$ 2,48	28,50 $\pm$ 2,48	28,50 $\pm$ 2,48
	20	30,12 $\pm$ 1,19	28,56 $\pm$ 1,52	33,25 $\pm$ 1,66	29,68 $\pm$ 0,53	31,68 $\pm$ 0,83
	40	28,21 $\pm$ 2,75	27,43 $\pm$ 0,47	25,39 $\pm$ 0,66	26,57 $\pm$ 0,48	25,91 $\pm$ 1,67
	60	25,98 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>	26,01 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	26,69 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	27,61 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	28,30 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>
	80*	26,95 $\pm$ 0,84	25,14 $\pm$ 1,25	24,27 $\pm$ 1,34	24,99 $\pm$ 1,14	24,17 $\pm$ 0,88

### 4.3.3. İmmunolojik Bulgular

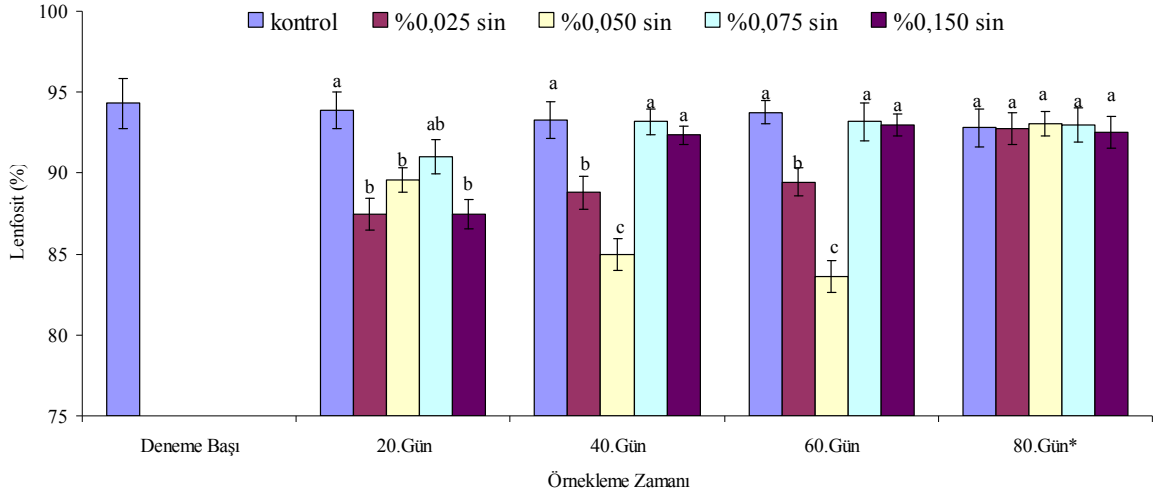
Deneme süresince sinnamik asitin immunolojik parametrelerden fagositik aktivite, fagositik indeks, süperoksit anyon üretimi, respiratöri burst, lizozim, myeloperoksidaz (MPO), toplam antiproteaz,  $\alpha$ -1 antiproteaz aktiviteleri, toplam immunoglobulin (Ig), hemolitik komplement üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca bağışıklık parametreleriyle ilişkili olan beyaz kan hücre sayısına (lökosit miktarı) ve hücre tiplerine (lenfosit, granülosit ve monosit) de deneme gruplarının etkisi incelenmiştir. İlâveten bağışıklık parametreleriyle ilişkili beyaz kan hücre sayısı (lökosit miktarı) ve hücre tiplerine deneme gruplarının etkisi incelenmiştir.

Kandaki beyaz kan hücre sayısı veya lökosit miktarına (LM) baktığımızda (Şekil 3.3) deneme süresince gruplar arasında benzer olduğu bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



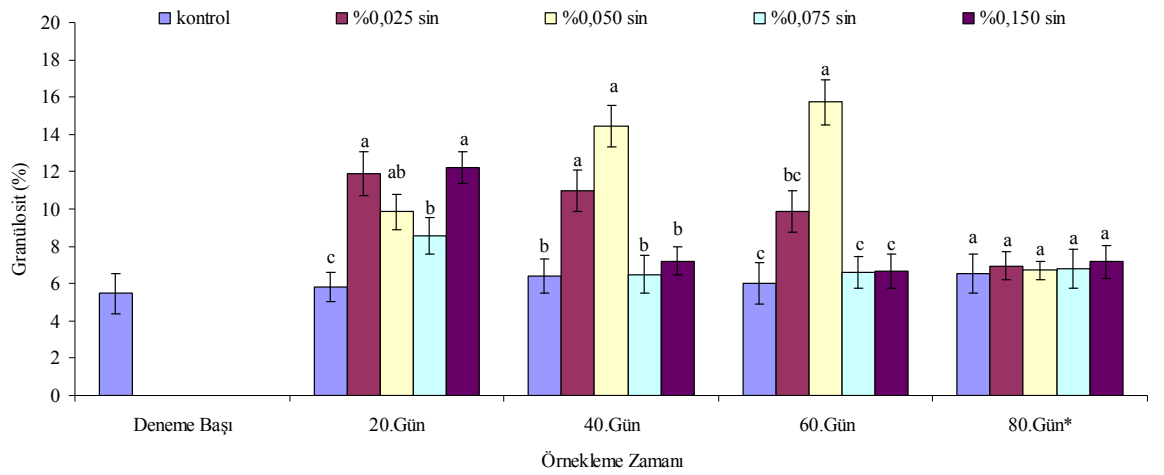
Şekil 4.3. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lökosit miktarı bulgularındaki değişimler

Deneme süresince beyaz kan hücre tiplerindeki değişimlere baktığımızda lenfosit (Şekil 4.4.) ve granülosit (Şekil 4.5.) yüzdelerinde önemli değişimler olduğu bulunmuştur. Lenfosit yüzdesinin 20. günde %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,150 sin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük çıktığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). Denemenin 40. ve 60. günlerinde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında diğer deneme gruplarına göre istatistiksel olarak düşük çıktığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde ise deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



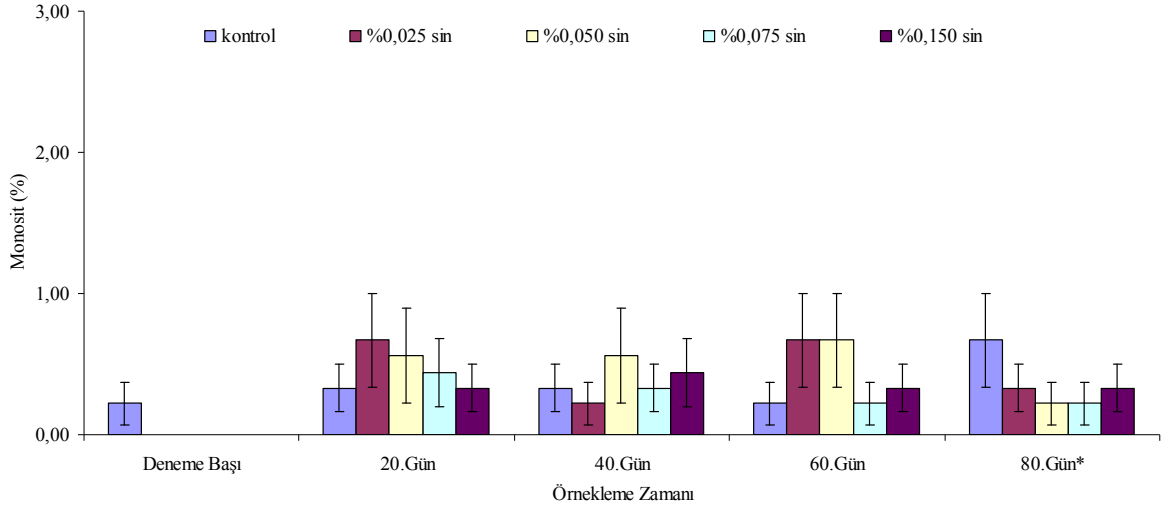
Şekil 4.4. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lenfosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Granülosit yüzdesi denemenin 20. gününde tüm sinamik asit gruplarında kontrol grubuna göre önemli oranda artış gösterdiği bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 40. günde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrol ve diğer sinamik asit gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Denemenin 60. gününde ise %0,050 sin grubunda kontrol ve diğer sinamik asit içerikli gruplara göre önemli oranda yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 80. günde ise deneme grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).



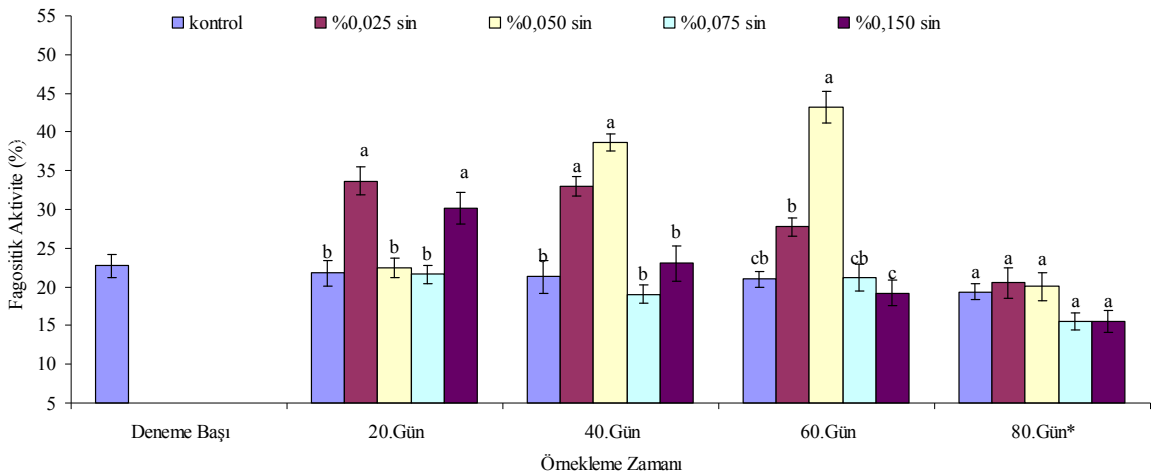
Şekil 4.5. Deneme 1.2 süresince gruplara göre granülosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Deneme gruplarından deneme süresince elde edilen monosit (Şekil 4.6.) yüzdelere baktığımızda gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür ( $p > 0,05$ ).

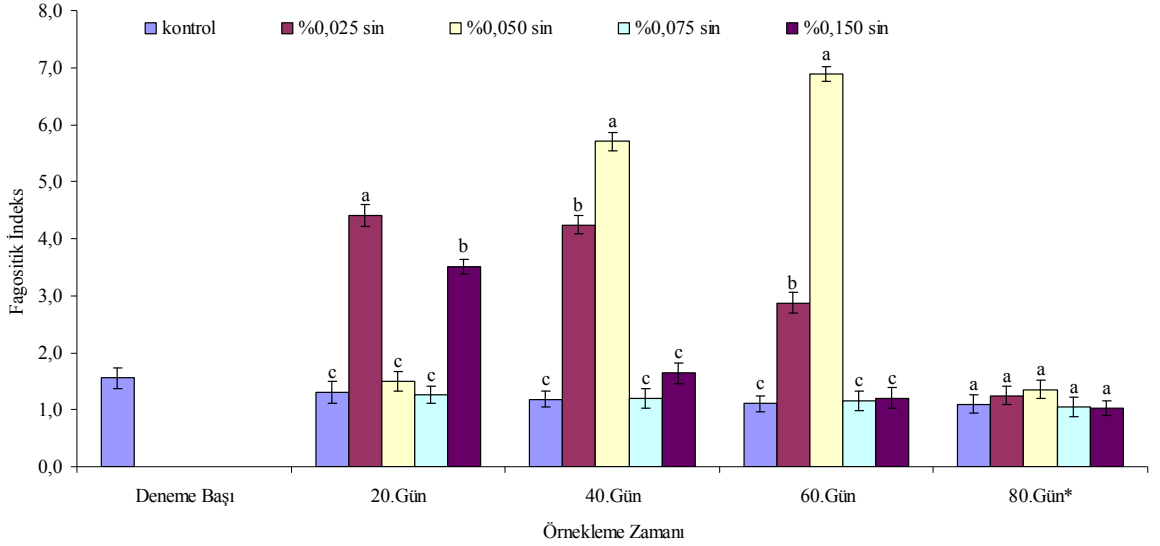


Şekil 4.6. Deneme 1.2 süresince gruplara göre monosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Fagositik aktivite (Şekil 4.7.) ve fagositik indeks (Şekil 4.8.) denemenin 20. gününde %0,025 sin ve %0,150 sin gruplarında kontrol ve diğer sennamik asit içerikli gruplara göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Denemenin 40. gününde %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının fagositik aktivite ve fagositik indeks oranları kontrol ve diğer sennamik asit içerikli gruplara göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Denemenin 60. gününde ise fagositik aktivite ve fagositik indeks oranları sadece %0,050 sin grubunda tüm gruplardan istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 80. günde ise gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ).

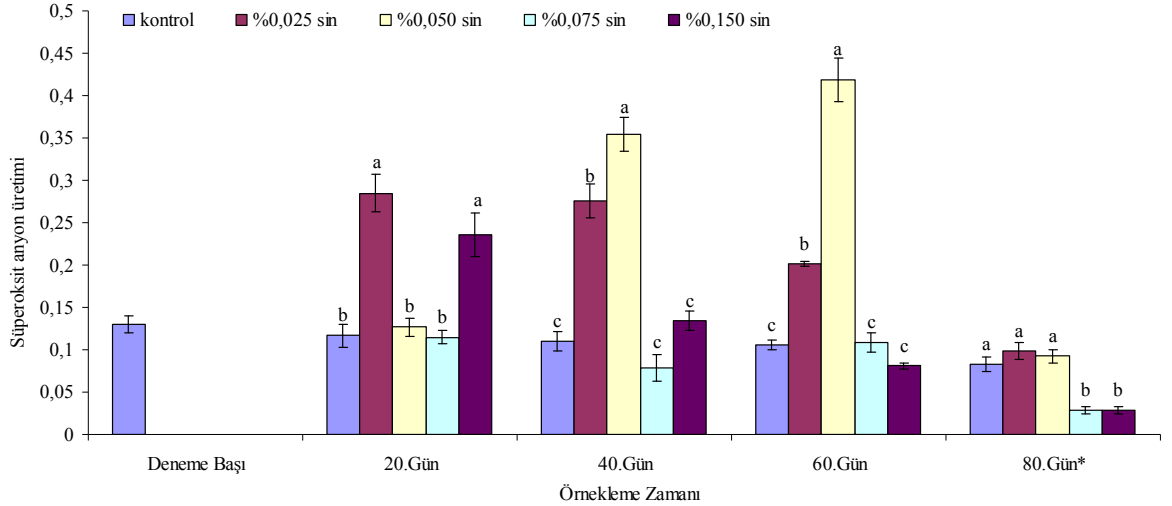


Şekil 4.7. Deneme 1.2 süresince gruplara göre fagositik aktivite bulgularındaki değişimler



Şekil 4.8. Deneme 1.2 süresince gruplara göre fagositik indeks bulgularındaki değişimler

Süperoksit anyon üretimi (Şekil 4.9.) 20, 40 ve 60. günlerde %0,025 sin grubunda, 40. ve 60. günlerde %0,050 sin grubunda ve 20. günde %0,150 grubunda kontrol ve diğer sinamik asit gruplarına göre istatistiksel olarak artış göstermiştir ( $p < 0,05$ ). 80. günde ise süperoksit anyon üretimi %0,075 ve %0,150 gruplarında kontrol ve diğer sinamik asit gruplarına göre istatistiksel olarak azalmıştır ( $p < 0,05$ ).

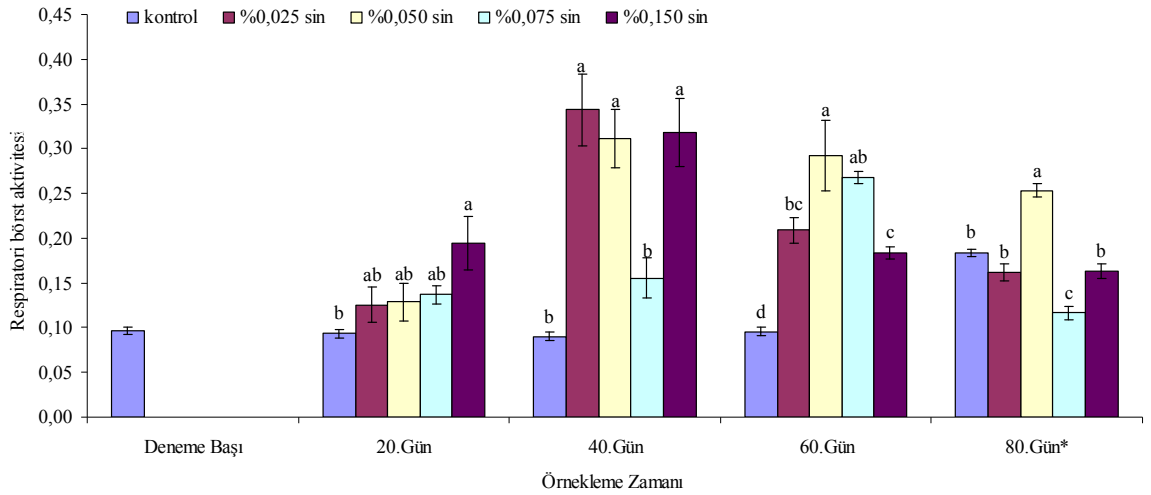


Şekil 4.9. Deneme 1.2 süresince gruplara göre süperoksit anyon üretimi bulgularındaki değişimler

Respiratöri burst aktivitesine (Şekil 4.10.) baktığımızda 20, 40 ve 60. günlerde % 0,150 sin grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği bulunmuştur

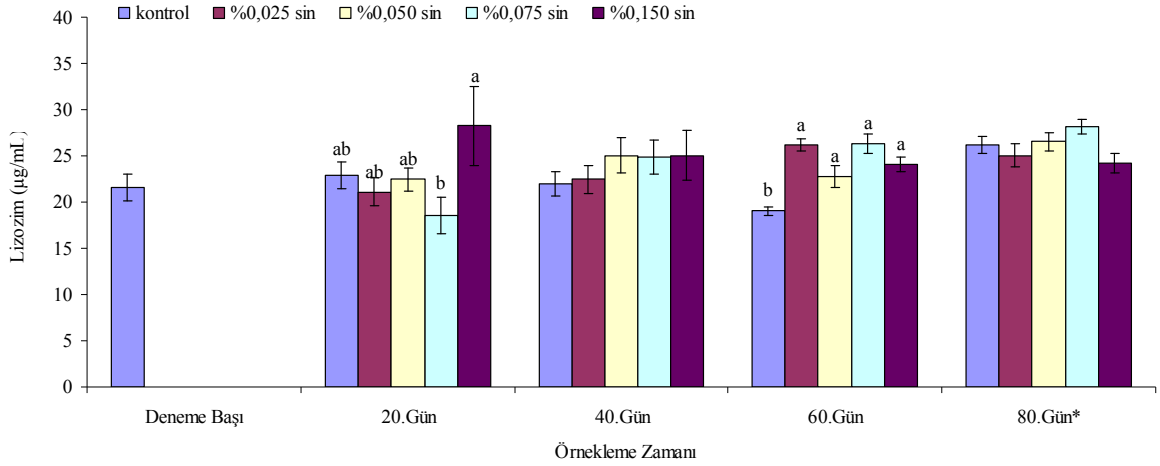


( $p<0,05$ ). Ayrıca % 0,150 sin grubunun respiratöri burst aktivitesi 40. günde % 0,075 sin grubundan istatistiksel olarak daha yüksekken, 60. ve 80. günlerde % 0,050 sin grubundan daha düşük tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 40. ve 60. günlerde respiratöri burst aktivitesi %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ). %0,075 sin grubu sadece 60. günde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir ( $p<0,05$ ).



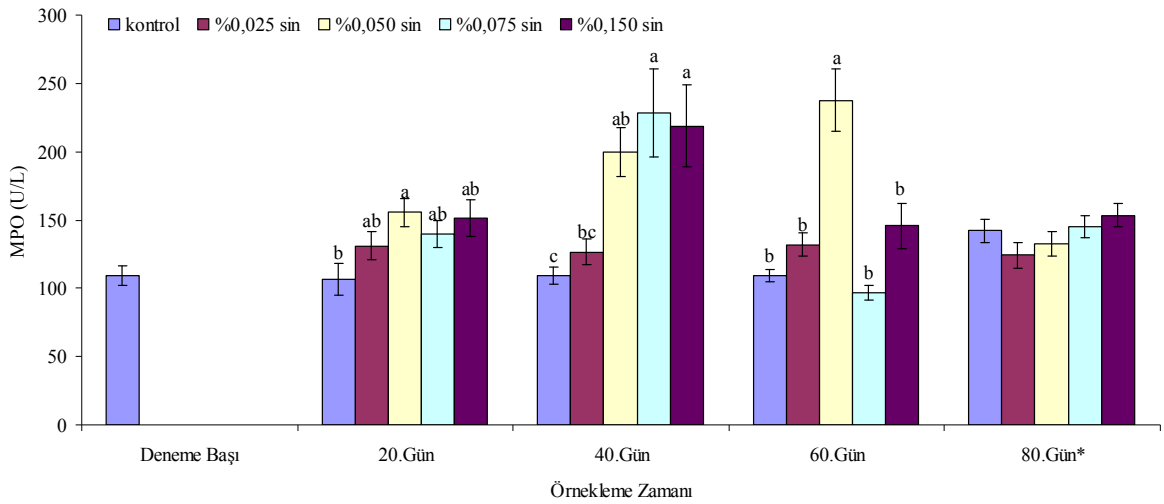
Şekil 4.10. Deneme 1.2 süresince gruplara göre respiratöri burst aktivitesi bulgularındaki değişimler

Lizozim aktivitesi (Şekil 4.11.) 20. günde sadece %0,150 ve %0,75 grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gösterirken ( $p<0,05$ ) kontrol grubu ve diğer sinnamik asit grupları arasında fark çıkmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak 60. günde tüm sinnamik asit grupları lizozim aktivitesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.11. Deneme 1.2 süresince gruplara göre lizoşim aktivitesi bulgularındaki değişimler

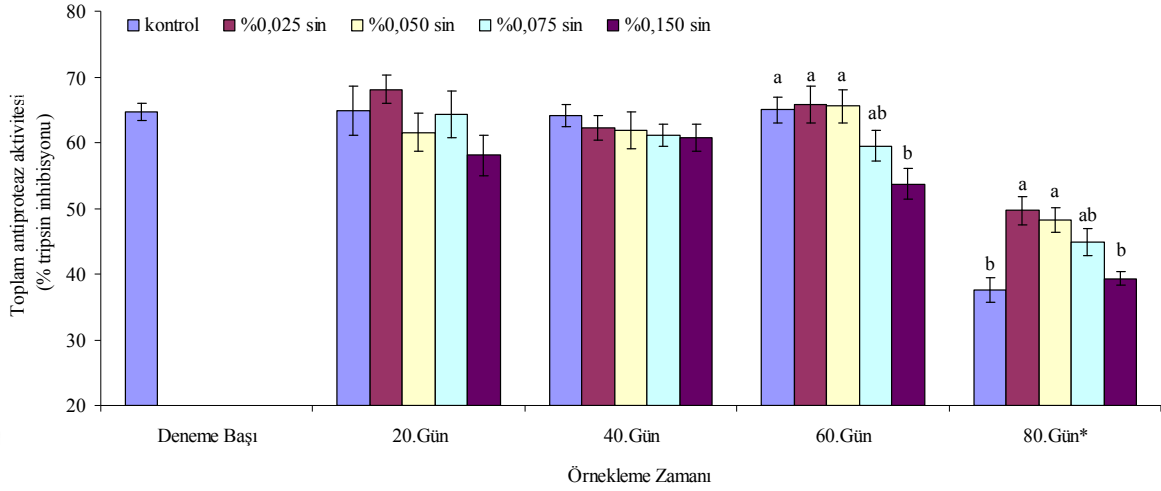
Myeloperoksidaz aktivitesine (Şekil 4.12.) (MPO) bakıldığında 20. günde %0,050 grubunun, 40. günde %0,050, %0,075 ve %0,150 gruplarının ve 60. günde %0,050 grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca MPO değerinin 40. günde %0,075 ve %0,150 gruplarının %0,025 grubundan da istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.12. Deneme 1.2 süresince gruplara göre myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi bulgularındaki değişimler

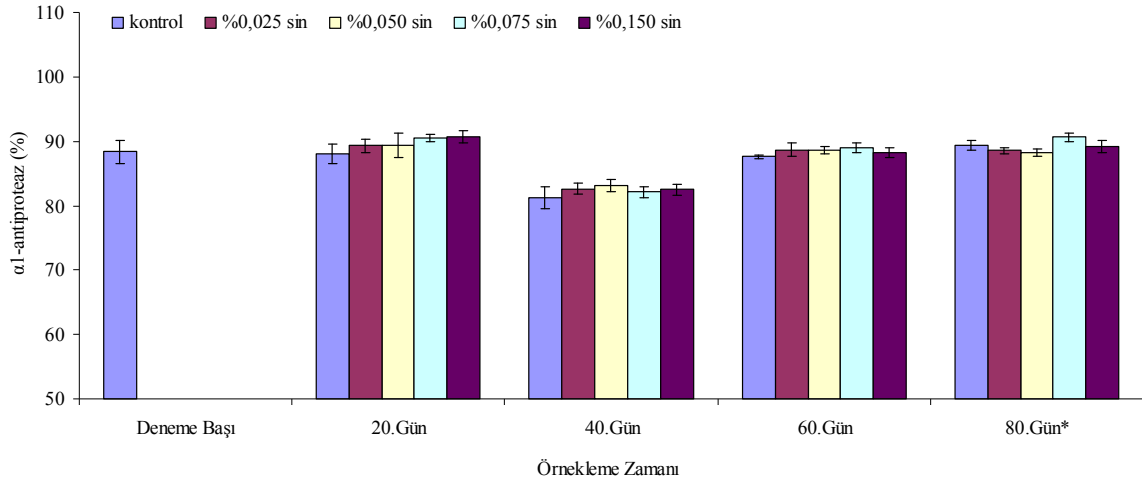
Toplam antiproteaz (Şekil 4.13.) aktivitesinde 20. ve 40. günlerde deneme grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Ancak 60. günde %0,150 sin grubunun kontrol, %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarına göre istatistiksel olarak düşük

olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının kontrol ve %0,150 sin gruplarından önemli oranda yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.13. Deneme 1.2 süresince gruplara göre süresince toplam antiproteaz aktivitesi bulgularındaki değişimler

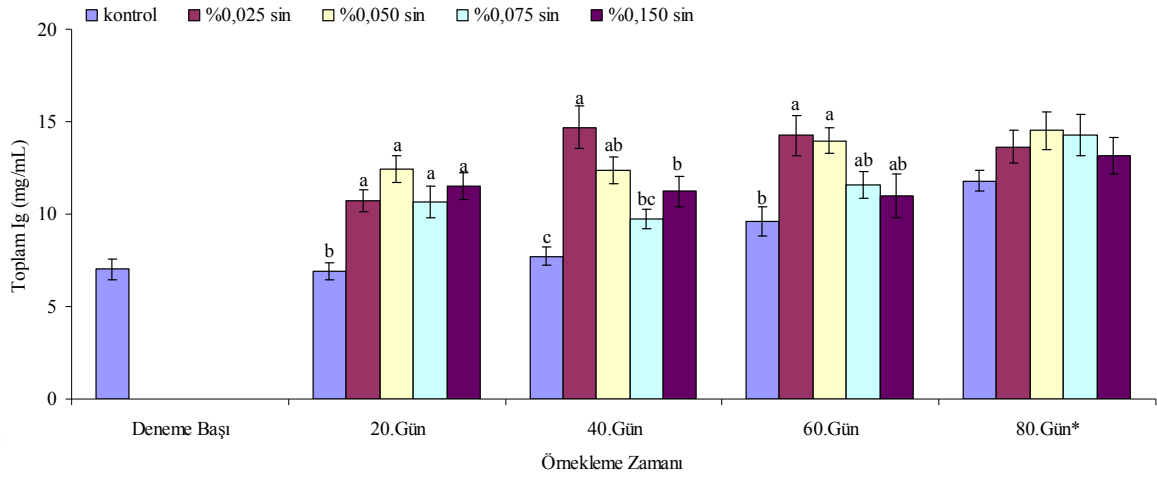
Deneme süresince  $\alpha 1$ -antiproteaz aktivitesinde (Şekil 4.14.) deneme grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.14. Deneme 1.2 süresince gruplara göre  $\alpha 1$ -antiproteaz (%) aktivitesi bulgularındaki değişimler

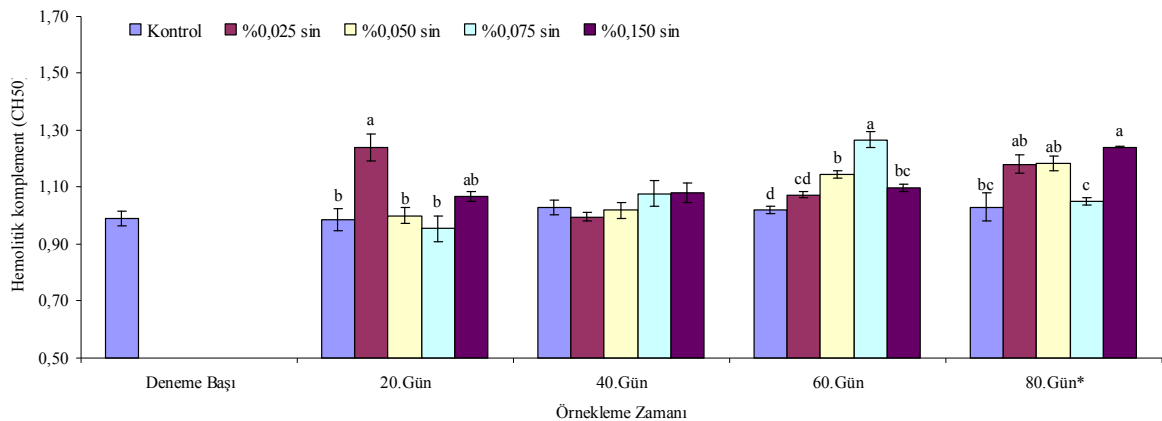
Toplam immunoglobulin (Ig) miktarındaki (Şekil 4.15.) değişimlere bakıldığında 20. günde tüm sinnamik asit gruplarının, 40. günde %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,150 sin

gruplarının, 60. günde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.15. Deneme 1.2 süresince gruplara göre toplam Ig bulgularındaki değişimler

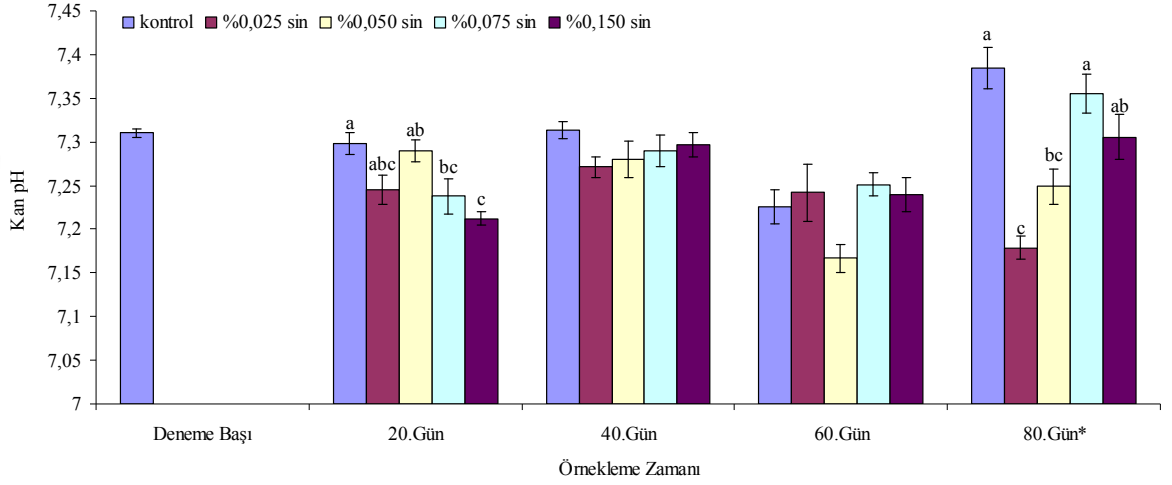
Deneme süresince hemolitik komplement (Şekil 4.16.) bulgularına baktığımızda 20. günde sinamik asit ilaveli %0,025 grubunun, kontrol, %0,050 ve %0,075 gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ancak bu durum 40. günde devam etmemiş ve 60. güne gelindiğinde sinamik asit içeren %0,050, %0,075 ve %0,150 gruplarının kontrol grubuna göre önemli oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. güne gelindiğinde %0,150 sinamik asit içerikli grubun komplement miktarının kontrol ve %0,075 gruplarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.16. Deneme 1.2 süresince gruplara göre hemolitik komplement bulgularındaki değişimler

#### 4.3.4. Kan pH Bulguları

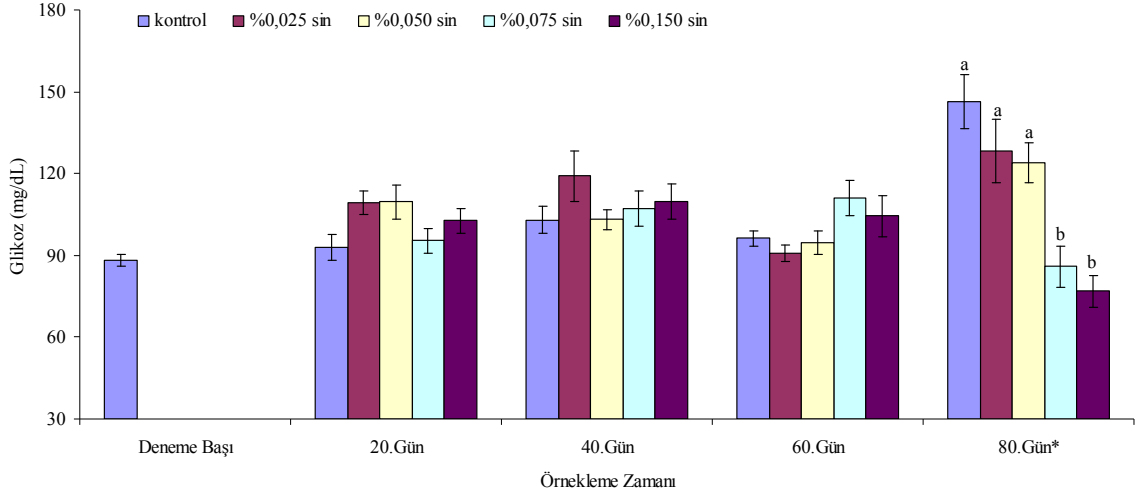
Deneme süresince kan pH (Şekil 4.17.) bulgularındaki değişimlere bakıldığında 20. günde %0,150 sin grubunun kontrol ve %0,050 sin grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ancak devam eden örnekleme dönemlerinde gruplar arasında herhangi bir değişiklik görülmemiştir ( $p>0,05$ ). 80. güne gelindiğinde ise kan pH değerinin %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrol ve %0,075 sin gruplarına göre istatistiksel olarak önemli oranda düşüş gösterdiği bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.17. Deneme 1.2 süresince gruplara göre kan pH bulgularındaki değişimler

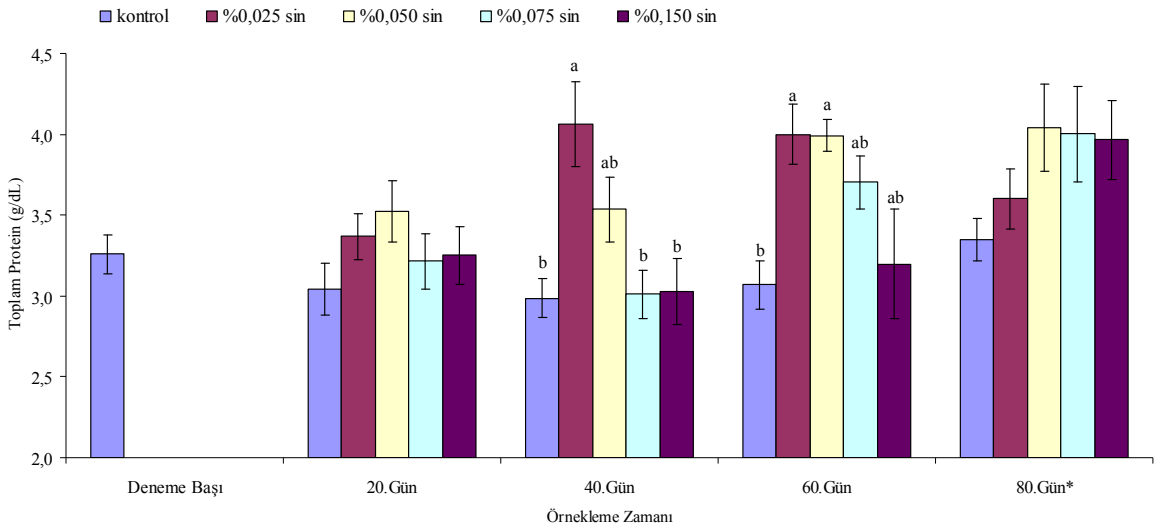
#### 4.3.5. Serum Biyokimya Bulguları

Deneme süresince serum glikoz (Şekil 4.18.) değerlerindeki değişimlere bakıldığında 80. güne kadar grupların istatistiksel olarak benzer olduğu görülmektedir ( $p>0,05$ ). Ancak 80. günde %0,075 ve %0,150 sin gruplarının kontrol ve diğer sinamik asit ile beslenen gruplardan istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.18. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum glikoz bulgularındaki değişimler

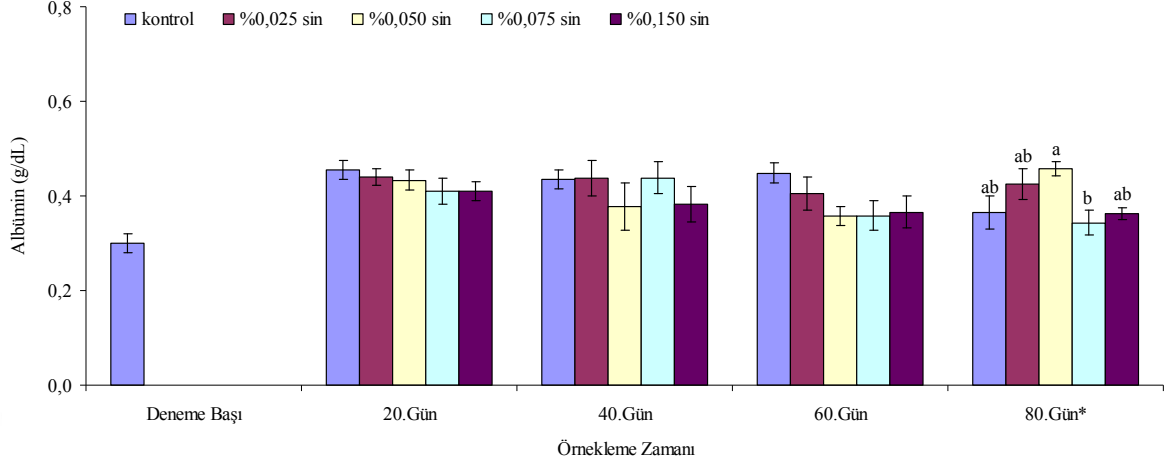
Serum toplam protein (Şekil 4.19.) değerlerine bakıldığında 20. günde gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmezken ( $p>0,05$ ), 40. günde %0,025 sin grubunun kontrol, %0,075 sin ve %0,150 sin gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 60. günde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının kontrol grubundan istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.19. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum toplam protein bulgularındaki değişimler

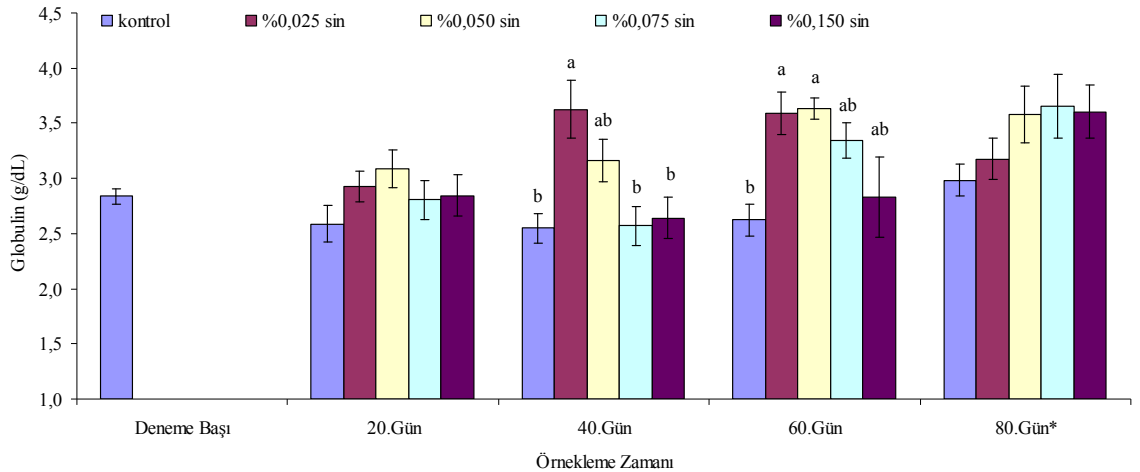
Besleme denemesi süresince serum albümin (Şekil 4.20.) değerlerinin deneme grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Ancak 80. günde sadece %0,050 ile %0,075 sin grupları arasında önemli bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.20. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum albumin bulgularındaki değişimler

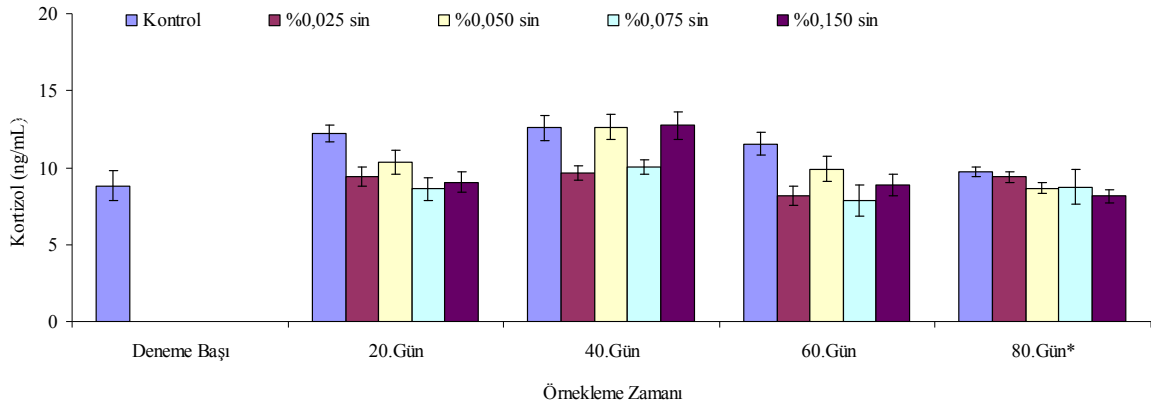
Serum globulin miktarlarına bakıldığında (Şekil 4.21.) 20. günde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Ancak 40. günde %0,025 sin grubunun kontrol, %0,075 ve %0,150 sin gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. 60. güne gelindiğinde ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum globulin bulgularındaki değişimler

### 4.3.6. Kortizol Bulguları

Serum kortizol (Şekil 4.22.) bulgularına bakıldığında deneme gruplarının deneme süresince istatistiksel olarak benzer oldukları bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.22. Deneme 1.2 süresince gruplara göre serum kortizol bulgularındaki değişimler

## 4.4. Deneme 2.1.

### 4.4.1. Büyüme Performansı Bulguları

Deneme sonunda balıkların ortalama başlangıç ağırlığı (OBA), ortalama son ağırlığı (OSA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) sonuçları Çizelge 4.11.'de verilmiştir. Çalışma sonucunda %0 (sinnamik asit ve *B.subtilis* içermeyen kontrol), 2. kontrol (Sinnamik asit içermeyen, *B.subtilis* içeren kontrol) %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarında sinnamik asit ve *B.subtilis* içerikli yemlerle beslenen gökkuşacağı alabalık yavrularının büyüme performansında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir değişim olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.11. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
OBA (g)	21,10±2,96	21,53±3,41	21,81±3,38	21,81±3,38	21,54±3,34	22,00±3,30
OSA (g)	55,52±4,30	53,55±4,28	55,16±3,80	54,41±3,66	55,74±3,75	56,17±3,07
CAA (%)	168,83±20,25	156,54±24,94	161,29±27,30	157,88±27,35	167,46±28,19	164,51±30,81
YDO	1,16±0,10	1,21±0,05	1,17±0,03	1,20±0,03	1,14±0,03	1,16±0,02
SBO (% gün <sup>-1</sup> )	1,64±0,12	1,56±0,16	1,58±0,17	1,56±0,17	1,62±0,17	1,60±0,19



#### 4.4.2. Besin Kompozisyonu ve Karaciğer Yağ Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının besin kompozisyonu (Çizelge 4.12.) bulgularından kuru madde, protein, yağ ve kül ile karaciğer yağı üzerine istatistiksel olarak bir etkisinin olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.12. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
Kuru Madde* (%)	29,23±0,24	29,10±0,20	30,00±0,52	29,10±0,20	30,00±0,52	29,10±0,20
Protein (%)	16,53±0,26	16,23±0,21	16,53±0,26	16,23±0,21	16,53±0,26	16,23±0,21
Yağ (%)	9,76±0,30	9,79±0,27	9,76±0,30	9,79±0,27	9,76±0,30	9,79±0,27
Kül (%)	2,73±0,07	2,71±0,04	2,73±0,07	2,71±0,04	2,73±0,07	2,71±0,04
Karaciğer Yağ Oranı (%)	6,43±0,19	5,88±0,45	5,57±0,31	5,16±0,25	5,94±0,42	5,86±0,43

\*Protein, yağ ve kül sonuçlarının oranları kuru madde içerisinde % olarak gösterilmiştir.

#### 4.4.3. Yağ Asidi Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının yağ asitleri üzerine etkileri Çizelge 4.13.'de gösterilmiştir. Deneme gruplarının yağ asitleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.13. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti yağ asidi kompozisyonları bulguları

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
C14:0	1,99±0,07	2,10±0,01	2,06±0,07	2,13±0,01	2,05±0,07	2,14±0,00
C14:1	0,02±0,01	0,03±0,00	-	0,03±0,00	0,02±0,01	0,03±0,00
C16:0	14,04±0,07	14,73±0,23	14,86±0,13	14,23±0,06	13,93±0,04	14,12±0,12
C16:1	3,46±0,17	2,95±0,07	1,66±0,84	3,85±0,01	3,67±0,15	3,62±0,00
C18:0	27,86±2,83	21,57±2,41	22,20±2,95	25,15±0,68	27,11±3,29	21,69±2,83
C18:1n9C+T (n-9)	11,72±0,98	18,21±2,12	18,57±2,11	16,65±0,78	14,77±2,92	20,46±2,74
C18:2n6c (n-6)	15,53±0,36	15,03±0,04	15,14±0,37	15,61±0,11	15,37±0,29	15,75±0,06
C18:3n6 (n-6)	2,98±0,16	3,01±0,00	2,92±0,02	2,94±0,01	2,92±0,09	3,07±0,01
C18:3n3 (n-3)	0,50±0,03	0,46±0,01	0,49±0,03	0,54±0,03	0,50±0,02	0,54±0,02
C20:0	-	0,01±0,00	-	-	-	-
C20:1n9	2,82±0,08	2,85±0,00	2,89±0,08	3,13±0,06	2,99±0,04	3,11±0,08
C20:2	1,41±0,02	1,34±0,02	1,43±0,02	1,37±0,03	1,34±0,01	1,42±0,02
C20:3n6 (n-6)	0,56±0,02	0,67±0,04	0,60±0,01	0,56±0,00	0,55±0,02	0,57±0,02
C20:3n3 (n-3)	0,67±0,06	0,69±0,01	0,79±0,03	0,58±0,02	0,65±0,05	0,56±0,00
C20:4n6 (n-6)	0,33±0,05	0,40±0,00	0,40±0,00	0,37±0,01	0,38±0,01	0,40±0,01
C20:5n3 (n-3)	1,98±0,12	2,08±0,11	2,25±0,06	1,83±0,03	1,88±0,06	1,80±0,01
C22:0	-	0,05±0,01	-	-	-	-
C22:1n9	1,09±0,04	1,00±0,05	1,01±0,03	1,04±0,02	1,13±0,03	1,01±0,00
C22:2	2,01±1,56	0,80±0,09	0,30±0,16	0,20±0,08	0,24±0,13	0,06±0,00
C23:0	0,14±0,00	0,18±0,02	0,21±0,01	0,17±0,02	0,25±0,00	0,17±0,02
C22:6n3 (n-3)	10,90±1,13	11,85±0,48	12,23±0,49	9,61±0,03	10,24±0,63	9,48±0,09
Total ω-3	14,04±1,29	15,08±0,62	15,76±0,54	12,56±0,10	13,27±0,72	12,38±0,07
Total ω-6	19,40±0,59	19,11±0,09	19,06±0,39	19,49±0,09	19,22±0,36	19,79±0,06
Total ω-9	15,64±0,95	22,06±2,17	22,48±2,00	20,82±0,71	18,89±2,99	24,58±2,82
SFA	44,03±2,97	38,63±2,67	39,32±3,13	41,68±0,77	43,35±3,33	38,12±2,97
USFA	55,97±2,97	61,37±2,67	60,68±3,13	58,32±0,77	56,65±3,33	61,88±2,97
USFA/SFA	1,29±0,16	1,61±0,19	1,58±0,22	1,40±0,04	1,34±0,19	1,66±0,21
Σ MUFA	19,11±0,77	25,05±2,24	24,13±2,84	24,70±0,69	22,58±2,83	28,23±2,82
Σ PUFA	36,86±2,24	36,32±0,43	36,54±0,29	33,62±0,07	34,07±0,50	33,65±0,15
DHA/EPA	5,49±0,22	5,71±0,08	5,42±0,08	5,27±0,06	5,44±0,16	5,28±0,08

#### 4.4.4. Bağırsak Mikrobiyotası Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının bağırsak mikrobiyotası üzerine etkileri Çizelge 4.14.'de verilmiştir. *B.subtilis* ilaveli tüm gruplarda *B.subtilis* in bağırsaklarda geri izalasyonunun yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmada *B. subtilis*' in üreyebilen toplam bakteri yükü içerisindeki yüzdeleri kontrol için %0, kontrol+ *B. subtilis* için %81,61, %0,025 sin+*B. subtilis* için %87,11, %0,050 sin+ *B. subtilis* için %97,67, %0,75 sin+*B. subtilis* için %93,14 ve %0,150 sin+*B. subtilis* için %96,50 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlara baktığımızda sinnamik asit oranı arttıkça *B. subtilis* bakterilerinin bağırsak florasına yerleşme oranında arttığı ve %0,150 sin+*B. subtilis* grubunda Kontrol+ *B. subtilis* grubuna göre yaklaşık %15 daha fazla yerleştiği bulunmuştur.

Çizelge 4.14. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre bağırsaklarda bakteri grupları ile maya ve küflerin (log CFU g<sup>-1</sup>) toplam sayımları bulguları.

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
*Toplam heterotrofik aerobik bakteri	5,49±0,57	6,73±0,15	5,96±0,67	4,90±0,42	5,86±0,72	5,49±0,29
*Mezofilik bakteri	3,61±0,34	4,93±0,39	3,31±0,31	3,47±0,62	3,47±0,77	2,74±0,02
<i>B.subtilis</i>	-	5,49±0,26	5,29±0,06	5,49±0,12	5,80±0,49	5,53±0,17
Maya ve küf	3,78±0,77	3,57±0,23	4,12±0,10	4,06±0,39	4,47±0,68	4,09±0,36
Koliform	2,49±1,15	3,73±0,37	1,56±0,98	1,53±1,09	2,67±1,19	0,54±0,16
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,83±1,20	4,39±0,16	2,29±0,95	2,03±1,49	3,33±1,52	1,20±0,75
Laktik asit bakterileri	0,36±0,06	0,74±0,13	0,56±0,04	0,52±0,14	0,57±0,13	0,65±0,17

\**B.subtilis* içeren gruplarda mezofil bakteri ve toplam heterotrofik aerobik bakteri sayısı hesaplanırken *B.subtilis* miktarı ayrıca verildiği için sayıma ilave edilmemiştir.

#### 4.4.5. Yem, Mide ve Bağırsak pH Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının yem, bağırsak ve mide pH değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.15.'de gösterilmiştir. 60. gün sonunda mide ve bağırsak pH değerleri tüm gruplarda benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.15. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre yem, mide ve bağırsak pH değerlerindeki değişimler

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
Yem pH	5,90	5,89	5,86	5,83	5,75	5,74
Mide pH	6,81±0,04	6,88±0,03	6,92±0,02	6,87±0,04	6,91±0,02	6,93±0,03
Bağırsak pH	7,07±0,01	7,07±0,01	7,06±0,02	7,05±0,02	7,04±0,01	7,08±0,01

#### 4.4.6. Bağırsak ve Mide Enzim Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının bağırsak ve mide enzimlerinden tripsin, amilaz, lipaz, alkalen fosfataz ve pepsin değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.16.'de gösterilmiştir. Bağırsak enzimlerinden tripsin, alkalen fosfataz ve lipaz ile mide pepsinin gruplar arasında istatistiksel olarak fark göstermediği görülmüştür ( $p>0,05$ ). Ancak bağırsak amilaz miktarının Kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek çıktığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.16. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre bağırsakta tripsin, amilaz, lipaz ve alkale fosfataz ve mide de pepsin enzimleri bulgularındaki değişimler

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
Tripsin (U/mg protein/mi n)	1,66±0,26	1,57±0,16	1,66±0,15	1,43±0,14	2,02±0,19	1,53±0,12
Amilaz (mU/mg protein)	57,48± 6,71 <sup>b</sup>	249,79± 33,60 <sup>a</sup>	207,65± 21,67 <sup>a</sup>	250,62± 26,65 <sup>a</sup>	190,86± 20,28 <sup>a</sup>	62,83± 6,65 <sup>b</sup>
Lipaz (uMol/mg protein/mi n)	0,28±0,02	0,22±0,02	0,22±0,01	0,20±0,02	0,26±0,05	0,20±0,02
Alkale fosfataz (U/mg protein/mi n)	0,23±0,03	0,21±0,03	0,26±0,03	0,17±0,02	0,20±0,03	0,24±0,03
Pepsin (U/mg protein/ min)	34,59±6,34	30,12±4,82	31,20±3,08	39,46±4,31	32,29±3,65	26,74±2,24

#### 4.4.7. İç Organ İndeks Bulguları

Deneme sonunda *B.subtilis* ile sinamik asit+*B.subtilis* gruplarının iç organ indekslerinden viserosomatik indeks (VSI), hepatosomatik indeks (HSİ), iç organ yağı indeksi (İOYİ), safra somatik indeksi (SSI), dalak somatik indeksi (DSİ) ve kalp somatik indeksi (KSİ) değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.17.'de gösterilmiştir. Deneme sonunda *B.subtilis* ile sinamik asit+*B.subtilis* içerikli deneme gruplarının VSI, İOYİ ve SSI değerlerinin kontrol grubu ile benzer oldukları bulunmuştur ( $p>0,05$ ). HSİ oranının %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda kontrol ve %0,050 sin+*B.subtilis* gruplarından daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). DSİ oranının %0,150 sin+*B.subtilis* grubunda diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). KSİ değerinin ise %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda sadece kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.17. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre iç organ indekslerindeki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
VSİ	15,31± 0,63 <sup>ab</sup>	16,21± 0,59 <sup>ab</sup>	14,35± 0,50 <sup>b</sup>	17,07± 0,23 <sup>a</sup>	14,62± 0,54 <sup>ab</sup>	15,68± 0,86 <sup>ab</sup>
HSİ	1,56±0,08 <sup>a</sup>	1,42±0,05 <sup>ab</sup>	1,34±0,06 <sup>ab</sup>	1,59±0,08 <sup>a</sup>	1,25±0,05 <sup>b</sup>	1,46±0,06 <sup>ab</sup>
İOYİ	4,00±0,30 <sup>a</sup>	4,31±0,20 <sup>a</sup>	3,86±0,23 <sup>a</sup>	4,88±0,10 <sup>a</sup>	4,50±0,31 <sup>a</sup>	4,12±0,29 <sup>a</sup>
SSİ	0,21±0,02 <sup>a</sup>	0,18±0,03 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,03 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>a</sup>
DSİ	0,34±0,02 <sup>b</sup>	0,34±0,01 <sup>b</sup>	0,33±0,03 <sup>b</sup>	0,36±0,04 <sup>b</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>	0,47±0,02 <sup>a</sup>
KSİ	0,23±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>ab</sup>	0,19±0,02 <sup>ab</sup>	0,22±0,02 <sup>ab</sup>	0,17±0,02 <sup>b</sup>	0,22±0,01 <sup>ab</sup>

#### 4.4.8. Serum Biyokimyası Bulguları

Deneme sonunda *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının serum biyokimyasal parametrelerden trigliserit (TRİ), kolesterol (KOL), glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT), glutamik pirüvik transaminaz (GPT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalen fosfataz (ALP) üzerine etkileri Çizelge 4.18.'de verilmiştir. TRİ miktarının %0,075 sin+*B.subtilis* ile %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol, kontrol+ *B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis* ve %0,050 sin+*B.subtilis* gruplarına göre daha düşük çıkmıştır ( $p<0,05$ ). KOL ve ALP miktarlarının tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür ( $p>0,05$ ). GOT miktarının tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). GPT miktarının ise %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda sadece kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). LDH miktarının %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre, ayrıca %0,150 sin+*B.subtilis* grubunda kontrol+ *B.subtilis* ve %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarına göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

Çizelge 4.18. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre serum biyokimyası bulgularındaki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
TRİ (mg/dL)	114,61±7,27 <sup>a</sup>	104,12±5,25 <sup>a</sup>	108,43±4,85 <sup>a</sup>	100,51±4,94 <sup>a</sup>	83,37±4,31 <sup>b</sup>	79,66±2,25 <sup>b</sup>
KOL (mg/dL)	347,37±15,05 <sup>a</sup>	287,48±22,43 <sup>a</sup>	303,85±19,84 <sup>a</sup>	299,18±18,09 <sup>a</sup>	261,34±20,08 <sup>a</sup>	274,60±26,45 <sup>a</sup>
GOT (U/L)	81,46±4,66 <sup>a</sup>	57,97±3,60 <sup>b</sup>	62,16±4,24 <sup>b</sup>	62,91±2,78 <sup>b</sup>	59,44±3,70 <sup>b</sup>	56,22±5,32 <sup>b</sup>
GPT (U/L)	8,57±0,24 <sup>a</sup>	7,33±0,32 <sup>ab</sup>	7,25±0,53 <sup>ab</sup>	7,19±0,29 <sup>ab</sup>	6,11±0,45 <sup>b</sup>	7,54±0,29 <sup>ab</sup>
LDH (U/L)	635,15±36,58 <sup>a</sup>	612,53±25,01 <sup>ab</sup>	570,42±18,59 <sup>ab</sup>	547,34±26,20 <sup>abc</sup>	503,48±15,47 <sup>bc</sup>	440,46±36,07 <sup>c</sup>
ALP (U/L)	259,33±23,74 <sup>a</sup>	330,93±61,19 <sup>a</sup>	308,75±30,51 <sup>a</sup>	330,93±47,57 <sup>a</sup>	247,56±26,97 <sup>a</sup>	248,27±30,67 <sup>a</sup>

#### 4.4.9. Serum Antioksidan Analiz Bulguları

Deneme sonunda *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının serum antioksidan analizlerinde toplam antioksidan kapasitesi (TAK), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) üzerine etkileri Çizelge 4.19.'de gösterilmiştir. Deneme sonunda TAK değerinin Kontrol+ *B.subtilis* ve %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Ayrıca %0,025 sin+*B.subtilis* grubunun TAK değeri Kontrol+ *B.subtilis* grubu haricinde diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). SOD aktivitesinin Kontrol+*B.subtilis* grubu ve tüm sinnamik asit içerikli gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak az olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). CAT aktivitesinin de %0,150 sin+*B.subtilis* grubu hariç tüm sinnamik asit içerikli deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).

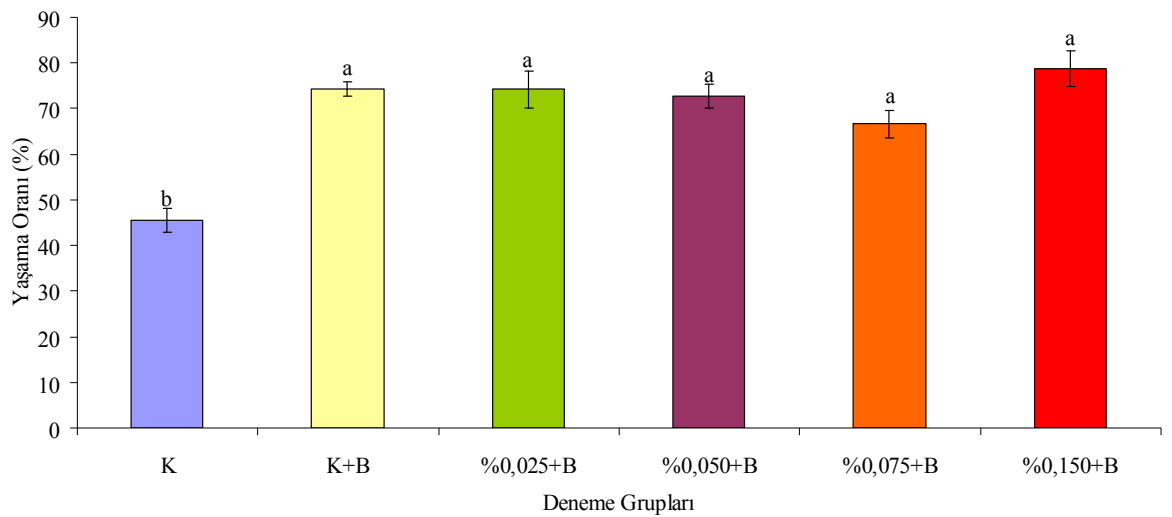
Çizelge 4.19. Deneme 2.1. sonunda gruplara göre serum antioksidan analiz bulgularındaki değişimler

Parametreler	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
TAK (Trolox, mM)	0,150±0,01 <sup>c</sup>	0,227±0,01 <sup>ab</sup>	0,252±0,01 <sup>a</sup>	0,199±0,01 <sup>bc</sup>	0,203±0,01 <sup>bc</sup>	0,202±0,004 <sup>bc</sup>
SOD (% inhibisyon)	82,98±0,71 <sup>a</sup>	65,38±2,32 <sup>b</sup>	65,74±1,15 <sup>b</sup>	65,71±1,41 <sup>b</sup>	69,02±2,53 <sup>b</sup>	67,68±1,11 <sup>b</sup>
CAT (kU/L)	70,17±3,91 <sup>a</sup>	45,70±2,73 <sup>bc</sup>	35,28±2,26 <sup>c</sup>	41,29±3,19 <sup>c</sup>	40,19±3,91 <sup>c</sup>	60,59±5,96 <sup>ab</sup>

#### 4.5. Deneme 2.2.

##### 4.5.1. Yaşama Oranı Bulguları

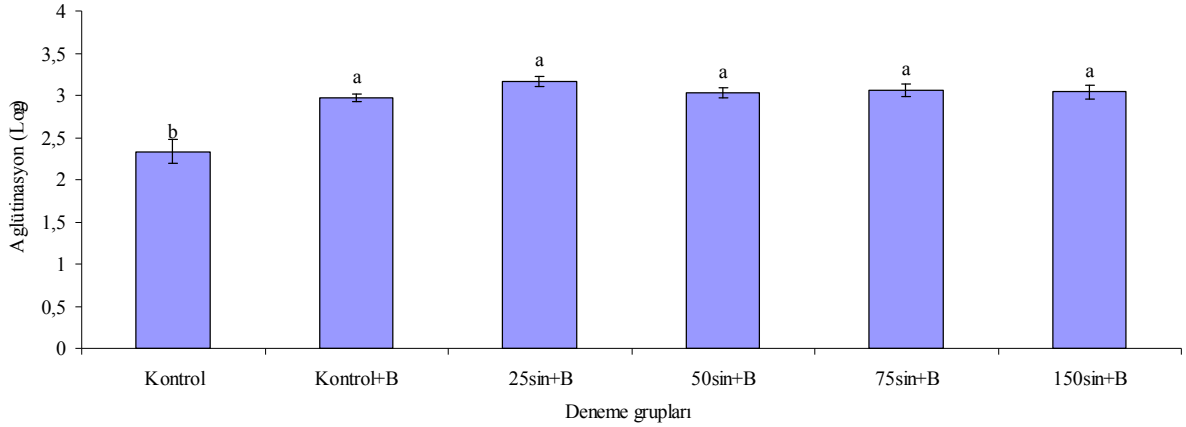
Deneme sonunda *B.subtilis* içerikli yemlerle beslemenin ve sinamik asit ile *B.subtilis* in birlikte etkilerinin hastalık direnci üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla balıklar *Yersinia ruckeri* bakterisi ile infekte edilmişlerdir. Devamında 20 gün boyunca balıklardaki yaşama oranları izlenmiştir. Deneme grupları arasındaki yaşama oranları Şekil 4.23.'de görüldüğü gibidir. Deneme sonunda *B.subtilis*, sinamik asit + *B.subtilis* içeren tüm grupların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yaşama oranını arttırdığı tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).



Şekil 4.23. Deneme 2.2 sonunda *Y.ruckeri* ile infekte edilmiş alabalıkların gruplar arasındaki yaşama oranlarındaki değişimler



Aglütinasyon testi (Şekil 4.24.) sonucunda hayatta kalan balıkların tümünde *Y.ruckeri* bakterisine karşı aglütinasyon oluşturdıkları bulunmuştur. *B.subtilis*, ve *B.subtilis*+sinnamik asit içeren tüm grupların aglütinasyon miktarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.24. Deneme 2.2 sonunda gruplara göre aglütinasyon bulgularındaki değişimler

#### 4.5.2. Hematolojik Bulgular

Deneme süresince gruplar arasındaki hematolojik bulgulardan RBC, Hct, Hb, MCV, MCH ve MCHC değerlerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.20.'de verilmiştir. Deneme 2.2 süresince besleme grupları arasında RBC, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC değerlerinde bakteri enfeksiyeye kadar geçen 60 gün içerisinde istatistiksel olarak önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak deneme sonunda balıklar *Y.ruckeri* ile enfekte edildikten sonra yani 80. günde hematolojik analizlerde bazı değişiklikler meydana gelmiştir. 80. günde kontrol+ *B.subtilis* ile %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarının RBC miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca kontrol+ *B.subtilis* ilaveli yemlerle beslenen balıkların Hct miktarı da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır ( $p<0,05$ ). 80. günde kontrol+*B.subtilis* grubu ile %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* grupları arasında MCHC değerlerinin farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

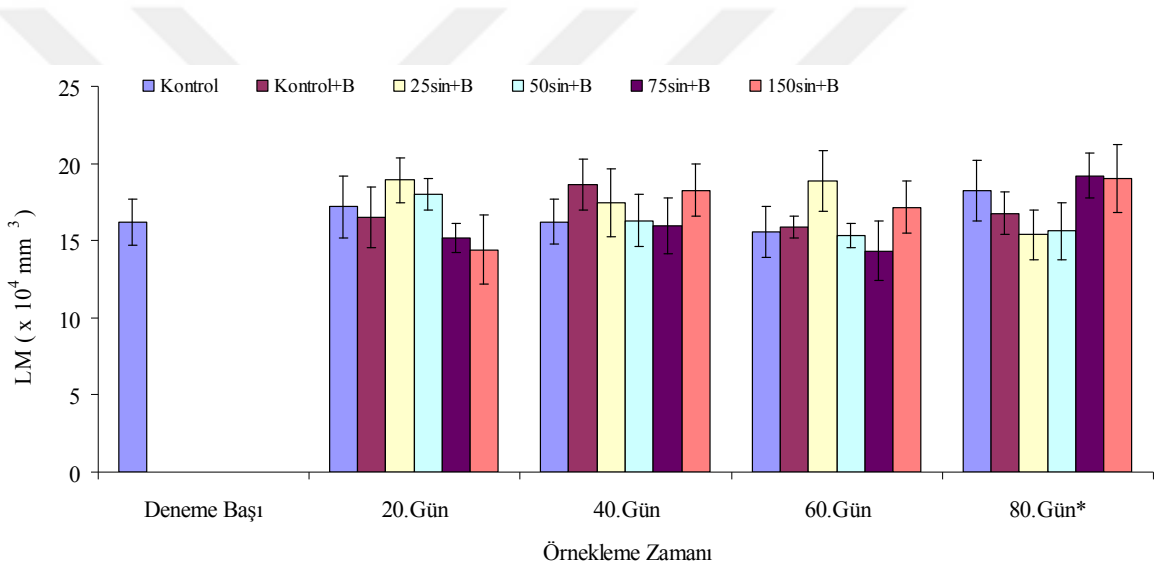
Çizelge 4.20. Deneme 2.2 süresince gruplara göre hematolojik bulgulardaki değişimler

Parametreler	Günler	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
RBC (x 10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	D.başı	2,09±0,03	2,09±0,03	2,09±0,03	2,09±0,03	2,09±0,03	2,09±0,03
	20	2,08±0,03	2,15±0,07	1,99±0,05	2,11±0,05	2,05±0,06	2,17±0,06
	40	2,26±0,04	2,24±0,06	2,19±0,06	2,20±0,05	2,34±0,03	2,33±0,02
	60	2,62±0,03	2,64±0,02	2,64±0,03	2,59±0,03	2,62±0,04	2,64±0,04
	80*	2,56±0,04 <sup>b</sup>	2,71±0,03 <sup>a</sup>	2,73±0,03 <sup>a</sup>	2,69±0,03 <sup>ab</sup>	2,68±0,04 <sup>ab</sup>	2,60±0,01 <sup>ab</sup>
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	D.başı	9,56±0,29	9,56±0,29	9,56±0,29	9,56±0,29	9,56±0,29	9,56±0,29
	20	9,72±0,22	10,78±0,28	10,08±0,38	10,08±0,22	9,93±0,25	10,18±0,28
	40	9,58±0,26	9,88±0,33	9,58±0,25	9,39±0,20	10,04±0,16	9,93±0,17
	60	9,22±0,17	9,49±0,14	9,28±0,15	9,21±0,19	9,19±0,19	9,17±0,22
	80*	8,71±0,27	9,04±0,24	9,51±0,23	9,12±0,29	9,21±0,25	8,97±0,11
Hct (%)	D.başı	23,11±0,63	23,11±0,63	23,11±0,63	23,11±0,63	23,11±0,63	23,11±0,63
	20	22,76±0,86	24,56±1,45	22,14±0,72	23,79±0,95	22,49±1,17	24,81±1,11
	40	23,19±0,63	22,90±1,02	22,02±1,02	22,41±0,81	24,69±0,52	24,54±1,18
	60	29,99±0,50	30,87±0,53	30,09±0,53	30,18±0,43	31,01±0,65	30,44±0,73
	80*	29,10±0,71 <sup>b</sup>	32,13±0,97 <sup>a</sup>	31,73±0,64 <sup>ab</sup>	29,98±0,78 <sup>ab</sup>	31,84±0,77 <sup>ab</sup>	29,81±0,26 <sup>ab</sup>
MCV (µm <sup>3</sup> )	D.başı	110,90±3,12	110,90±3,12	110,90±3,12	110,90±3,12	110,90±3,12	110,90±3,12
	20	108,95±2,87	113,59±3,49	111,51±3,60	112,53±2,04	108,92±2,65	113,82±2,35
	40	102,42±1,11	101,82±1,81	100,23±2,04	101,61±1,59	105,27±1,09	105,40±0,76
	60	114,45±1,20	116,73±1,40	113,88±0,94	116,31±0,81	118,40±1,16	115,08±1,01
	80*	113,65±1,33	118,45±3,54	116,23±1,45	111,51±1,94	118,84±1,71	114,80±0,80
MCH (pg)	D.başı	45,95±1,76	45,95±1,76	45,95±1,76	45,95±1,76	45,95±1,76	45,95±1,76
	20	46,62±0,88	50,33±0,85	50,80±2,05	47,90±1,10	48,41±0,81	46,90±0,83
	40	42,37±0,89	44,07±0,85	43,90±1,13	42,71±0,62	42,84±0,48	42,69±0,76
	60	35,20±0,53	35,91±0,54	35,14±0,51	35,51±0,59	35,09±0,37	34,65±0,35
	80*	34,01±0,74	33,31±0,76	34,83±0,60	33,92±0,79	34,38±0,70	34,52±0,28
MCHC (%)	D.başı	41,64±1,64	41,64±1,64	41,64±1,64	41,64±1,64	41,64±1,64	41,64±1,64
	20	43,15±1,90	44,79±2,09	46,03±2,72	42,73±1,45	44,69±1,44	41,35±1,10
	40	41,37±0,79	43,35±0,90	44,02±1,72	42,12±0,97	40,72±0,49	40,52±0,79
	60	30,76±0,39	30,78±0,44	30,87±0,46	30,54±0,56	29,64±0,25	30,11±0,20
	80*	29,91±0,43 <sup>ab</sup>	28,20±0,41 <sup>b</sup>	30,00±0,60 <sup>ab</sup>	30,43±0,52 <sup>a</sup>	28,92±0,29 <sup>ab</sup>	30,08±0,26 <sup>a</sup>

### 4.5.3. İmmunolojik Bulgular

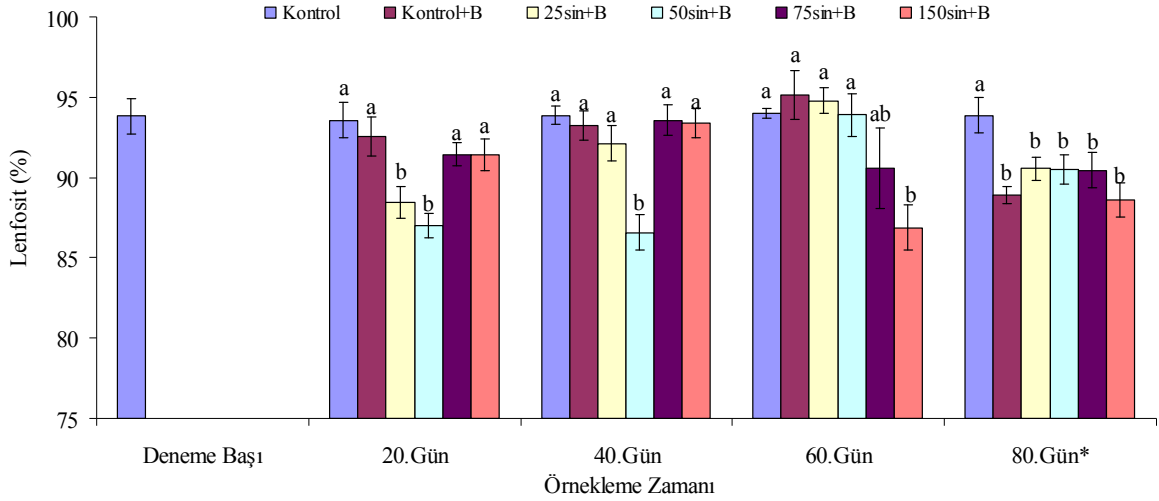
Deneme süresince sinnamik asitin ve *B.subtilis* + sinnamik asit ilavesinin immunolojik parametrelerden fagositik aktivite, fagositik indeks, süperoksit anyon üretimi, respiratöri burst, lizozim, myeloperoksidaz (MPO), toplam antiproteaz,  $\alpha$ -1 antiproteaz aktiviteleri, toplam immunoglobulin (Ig), hemolitik komplemant üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca bağışıklık parametreleriyle ilişkili olan beyaz kan hücre sayısına (lökosit miktarı) ve hücre tiplerine (lenfosit, granülosit ve monosit) de deneme gruplarının etkisi bakılmıştır.

Kandaki beyaz kan hücre sayısı veya lökosit miktarına (LM) baktığımızda (Şekil 4.25.) deneme süresince gruplar arasında istatistiksel olarak fark göstermediği bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



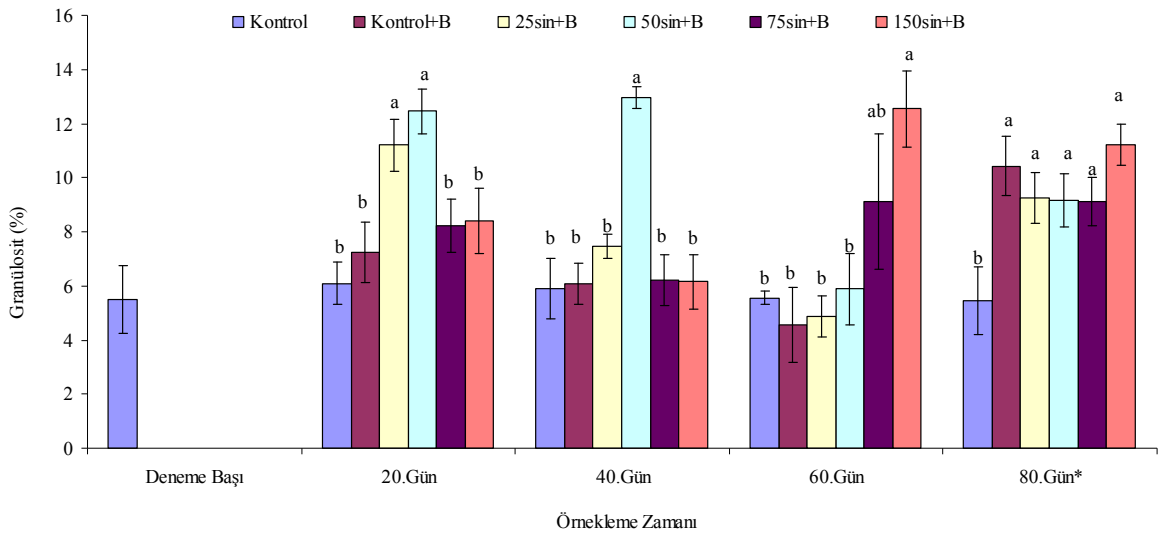
Şekil 4.25. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lökosit miktarı bulgularındaki değişimler

Deneme süresince lenfosit yüzdesindeki değişimler Şekil 4.26.'de gösterilmiştir. 20. günde %0,025 sin+B.*subtilis* ve %0,050 sin+B.*subtilis* gruplarının diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Denemenin 40. gününde sadece %0,050 sin+B.*subtilis* grubunun ve 60. günde ise sadece %0,150 sin+B.*subtilis* grubunun diğer tüm deneme gruplarından istatistiksel olarak düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde ise tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir düşüş olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ).



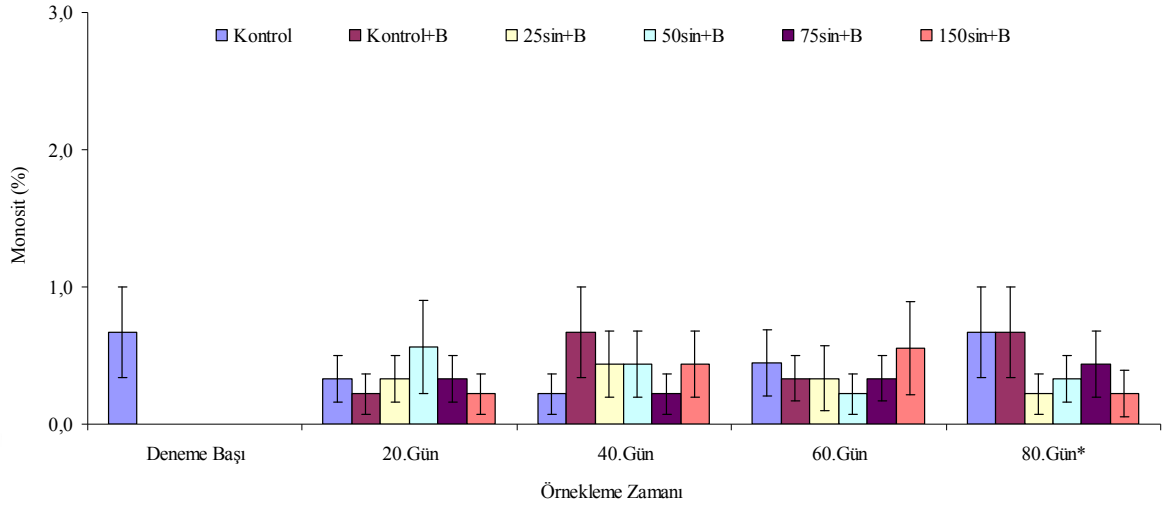
Şekil 4.26. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lenfosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Deneme süresince granülosit yüzdelerindeki değişimler Şekil 4.27.'de gösterilmiştir. Denemenin 20. gününde %0,025 sin+B.subtilis ve %0,050 sin+B.subtilis gruplarının diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak önemli oranda artış gösterdiği bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Denemenin 40. gününde sadece %0,050 sin+B.subtilis grubunun ve 60. günde ise sadece %0,150 sin+B.subtilis grubunun diğer tüm deneme gruplarından (%0,075 sin+B.subtilis grubu hariç) istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 80. günde ise tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ).



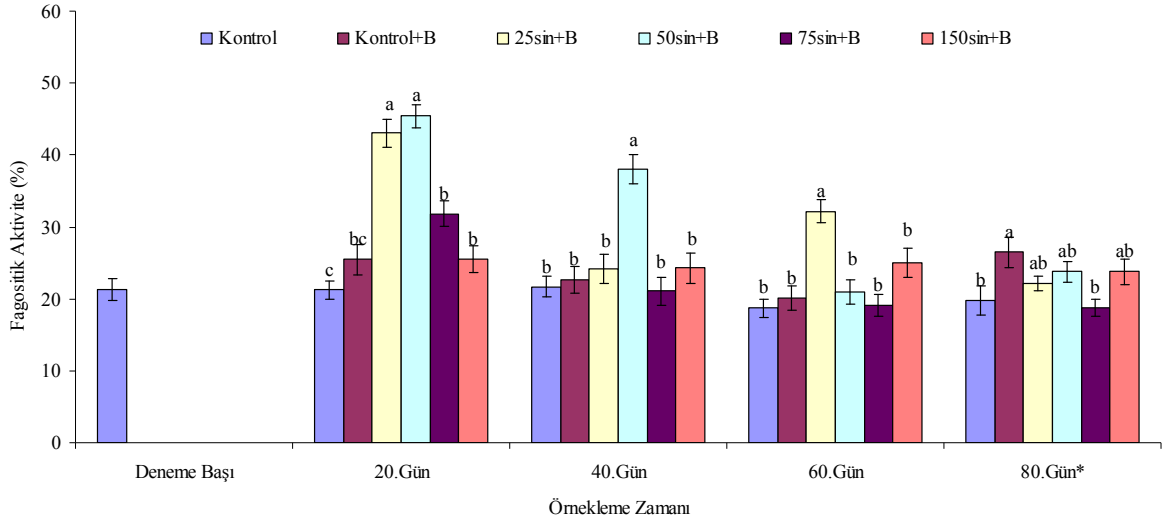
Şekil 4.27. Deneme 2.2 süresince gruplara göre granülosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Deneme süresince monosit yüzdesindeki değişimler Şekil 4.28.'de gösterilmiştir. Deneme gruplarının deneme süresince monosit yüzdeleri benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



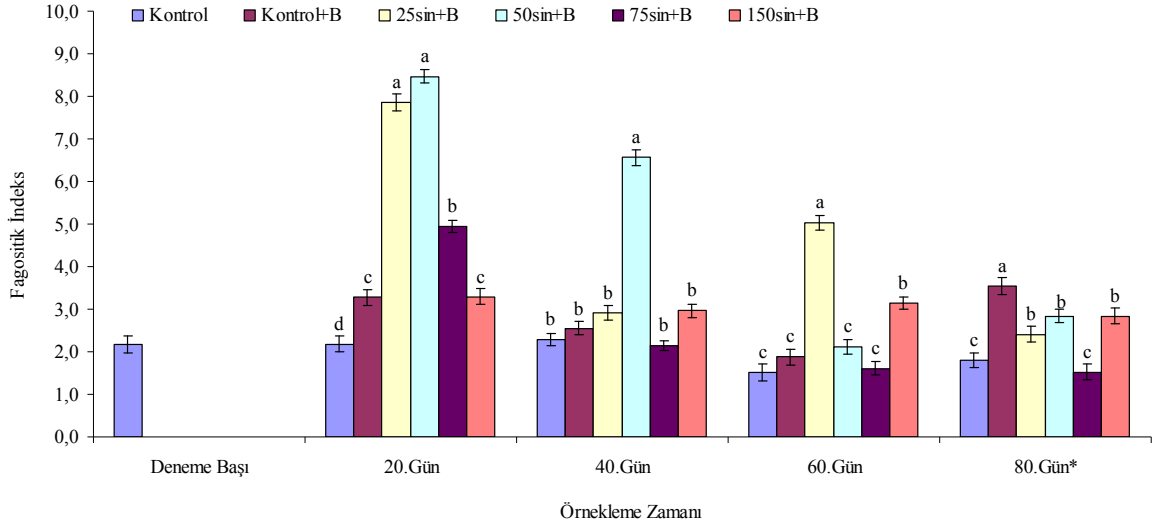
Şekil 4.28. Deneme 2.2 süresince gruplara göre monosit yüzdesi bulgularındaki değişimler

Denemede fagositik aktivite bulgularındaki değişimlere baktığımızda (Şekil 4.29.) 20. günde %0,025 sin+B.subtilis ve %0,050 sin+B.subtilis gruplarının kontrol, kontrol+B.subtilis ve diğer sennamik asit içerikli deneme gruplarına göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca 20. günde %0,075 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Denemenin 40. gününde sadece %0,050 sin+B.subtilis grubunun diğer deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). 60. günde ise sadece %0,025 sin+B.subtilis grubunun diğer deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde ise kontrol+ B.subtilis grubunun sadece kontrol ve %0,075 sin+B.subtilis gruplarından istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



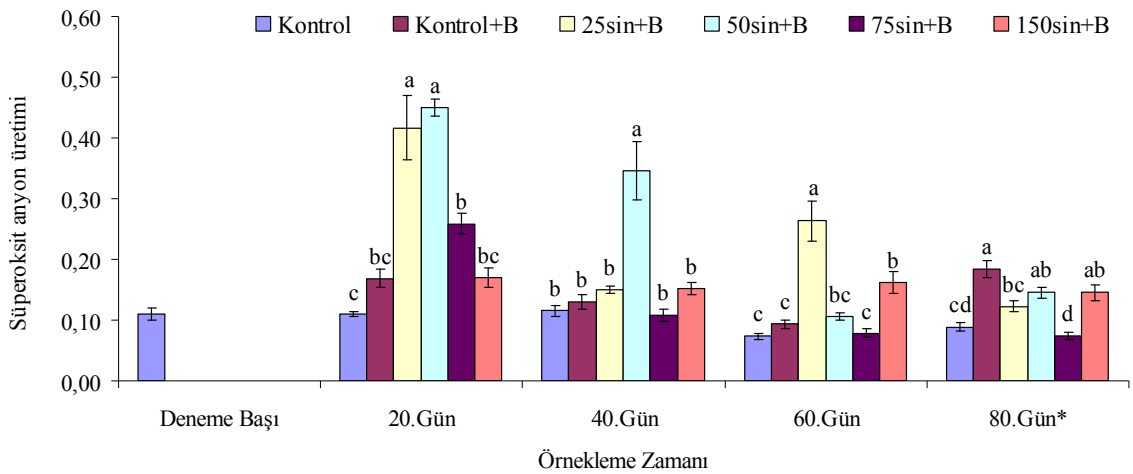
Şekil 4.29. Deneme 2.2 süresince gruplara göre fagositik aktivite bulgularındaki değişimler

Deneme gruplarının fagositik indeks bulguları üzerindeki değişimlere bakacak olursak (Şekil 4.30.) denemenin 20. gününde tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ayrıca %0,025 sin+*B.subtilis* ve %0,050 sin+*B.subtilis* gruplarında diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 20. günde %0,075 sin+*B.subtilis* grubunun ise kontrol, kontrol+ *B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarından istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Denemenin 40. gününde sadece %0,050 sin+*B.subtilis* grubunun diğer deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 60. günde ise sadece %0,025 sin+*B.subtilis* grubunun diğer deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 80. günde ise kontrol+ *B.subtilis* grubunda diğer deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ayrıca 80. günde %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarına göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



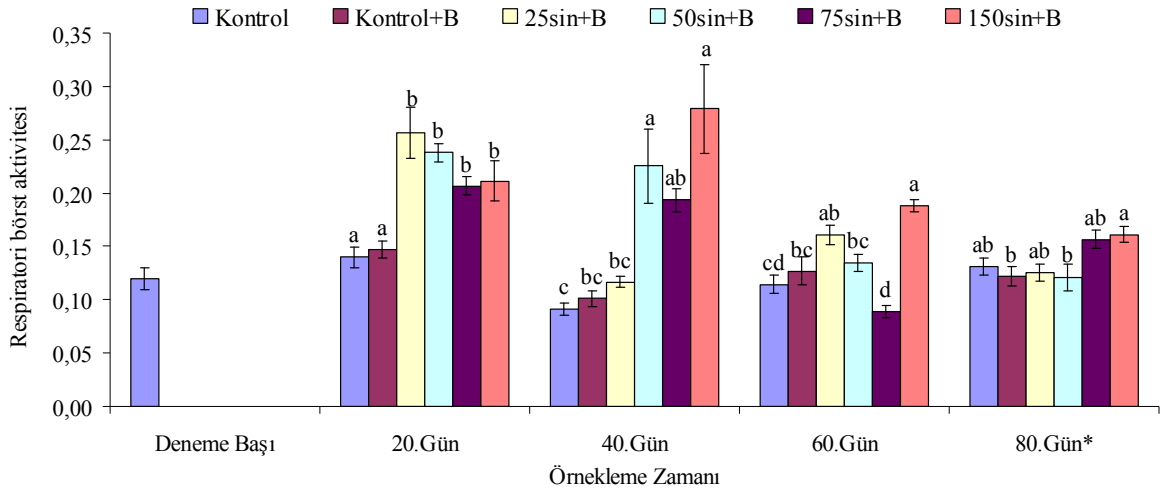
Şekil 4.30. Deneme 2.2 süresince gruplara göre fagositik indeks bulgularındaki değişimler

Deneme süresince sinamik asitin ve *B.subtilis* + sinamik asit ilavesinin süperoksit anyon üretimi (Şekil 4.31.) 20. günde %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir ( $p<0,05$ ). 40. günde ise süperoksit anyon üretimi sadece %0,050 sin+*B.subtilis* grubunda kontrol ve diğer sinamik asit ve sinamik asit +*B.subtilis* gruplarına göre istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). 60. günde ise %0,025 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde Kontrol+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.31. Deneme 2.2 süresince gruplara göre süperoksit anyon üretimi bulgularındaki değişimler

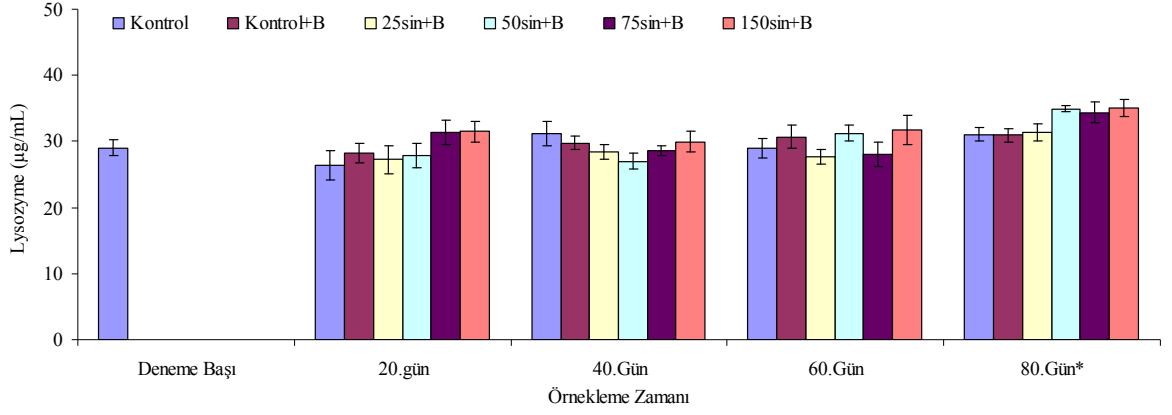
Respiratöri burst aktivitesine (Şekil 4.32.) baktığımızda 20. günde %0,025 sin+B.subtilis, %0,050 sin+B.subtilis, %0,075 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir (p<0,05). 40. günde %0,050 sin+B.subtilis, %0,075 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği bulunmuştur (p<0,05). 60. günde ise %0,025 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0,05). 80. günde ise sadece %0,050 sin+B.subtilis ile %0,150 sin+B.subtilis arasındaki fark önemli çıkmıştır (p<0,05).



Şekil 4.32. Deneme 2.2 süresince gruplara göre respiratöri burst aktivitesi bulgularındaki değişimler

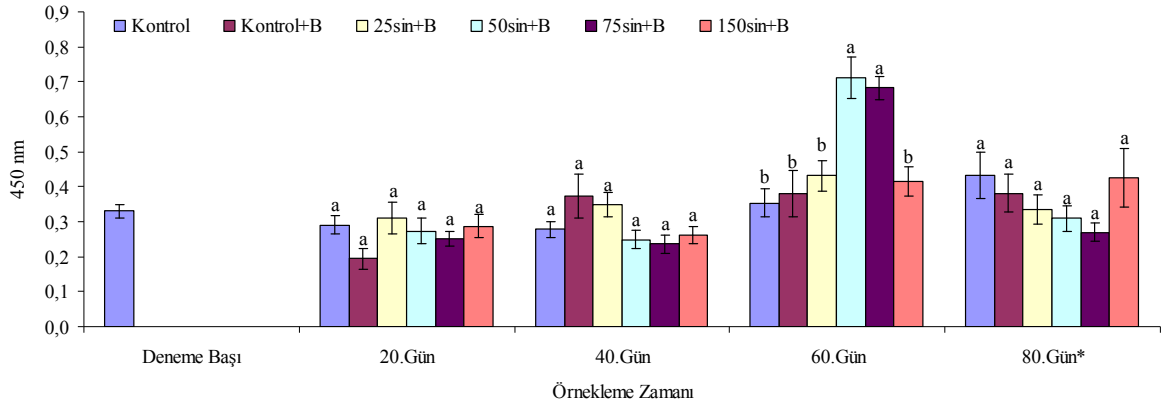
Deneme süresince kontrol, kontrol+B.subtilis, %0,025 sin+B.subtilis, %0,050 sin+B.subtilis, %0,075 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarında serum lizozim miktarının (Şekil 4.33.) istatistiksel olarak benzer olduğu bulunmuştur (p>0,05).





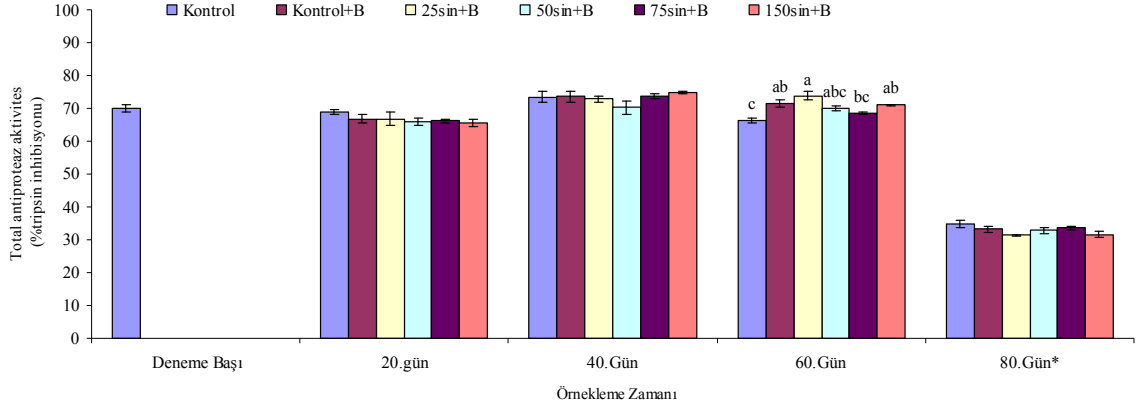
Şekil 4.33. Deneme 2.2 süresince gruplara göre lizozim aktivitesi bulgularındaki değişimler

Serum MPO miktarına (Şekil 4.34.) baktığımızda sadece 60.günde %0,050 sin+B.subtilis ve %0,075 sin+B.subtilis gruplarının kontrol ve diğer gruplardan göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



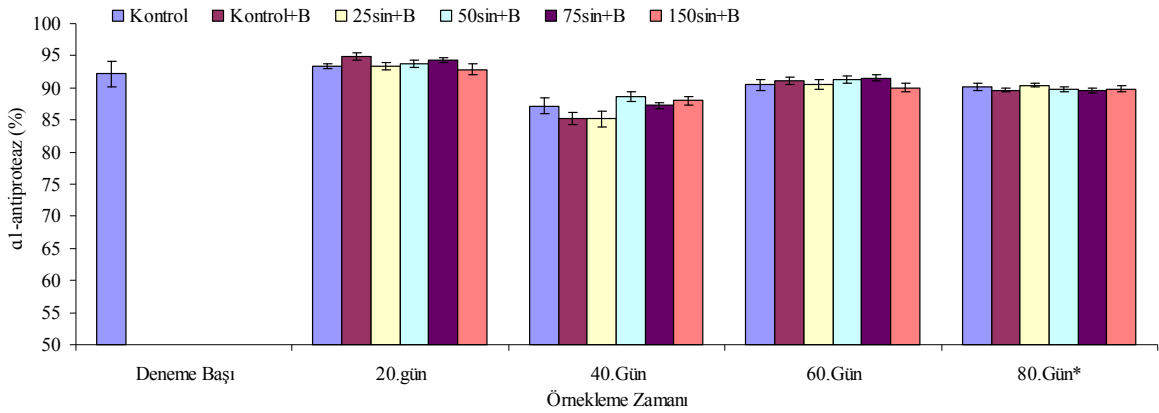
Şekil 4.34. Deneme 2.2 süresince gruplara göre myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi bulgularındaki değişimler

Serum da toplam antiproteaz aktivitesinin (Şekil 4.35.) sadece 60.günde kontrol+ *B.subtilis*, %0,025 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ayrıca %0,025 sin+B.subtilis grubunda %0,075 sin+B.subtilis grubundan da yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



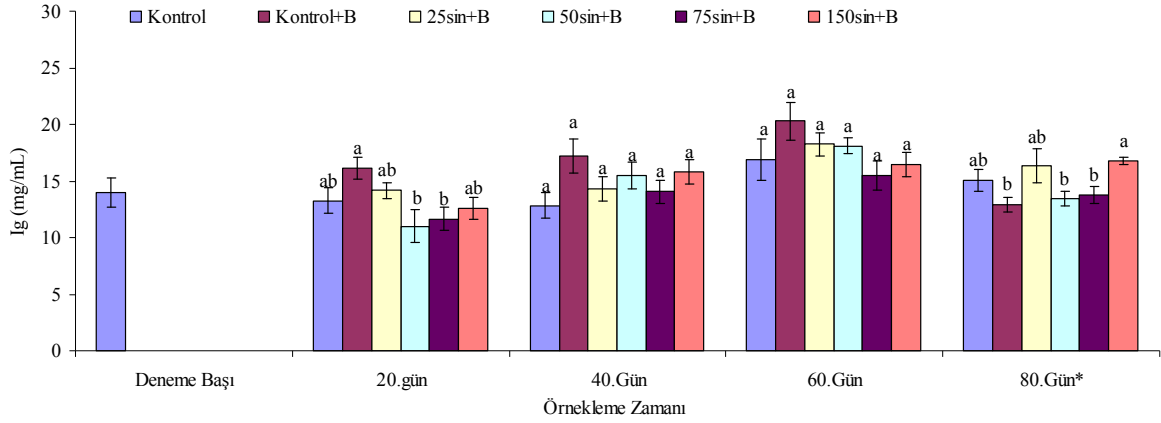
Şekil 4.35. Deneme 2.2 süresince gruplara göre toplam antiproteaz aktivitesi bulgularındaki değişimler

Deneme süresince kontrol, kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında serum  $\alpha$ 1-antiproteaz miktarının (Şekil 4.36.) istatistiksel olarak benzer olduğu bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



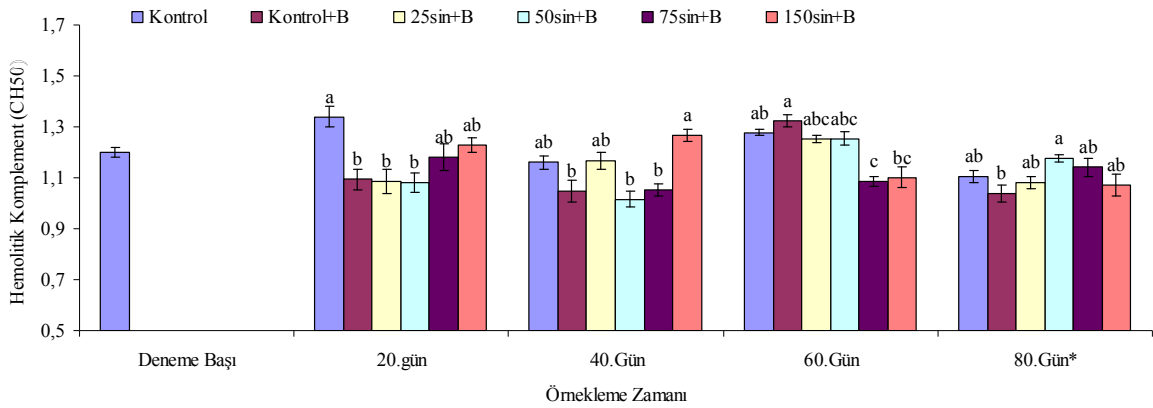
Şekil 4.36. Deneme 2.2 süresince gruplara göre  $\alpha$ 1-antiproteaz (%) aktivitesi bulgularındaki değişimler

Deneme süresince kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının toplam Ig miktarı (Şekil 4.37.) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Ancak, 20. günde kontrol+*B.subtilis* grubunun %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarından, 80. günde ise %0,150 sin+*B.subtilis* grubunun kontrol+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarından göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.37. Deneme 2.2 süresince gruplara göre toplam Ig bulgularındaki değişimler

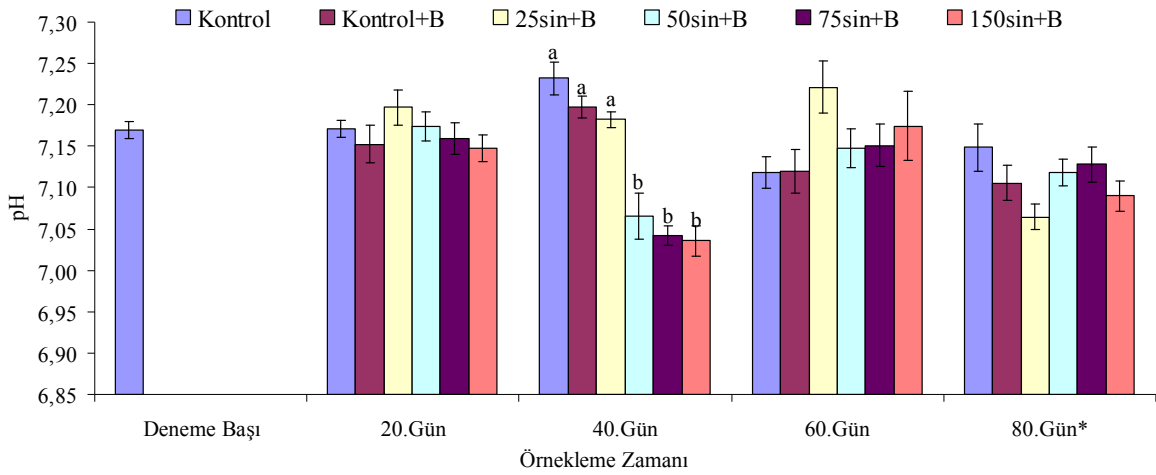
Hemolitik komplement bulgularına (Şekil 4.38.) baktığımızda denemenin 20. gününde %0,075+B.subtilis ve %0,150+B.subtilis grupları haricinde diğer sinamik asit içeren grupların hemolitik komplementi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan düşürdükleri bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ancak denemenin 40. gününde sinamik asit içeren grupların komplement miktarının kontrol grubu ile benzer oldukları görülmüştür ( $p>0,05$ ). 60. günde ise %0,075+B.subtilis ve %0,150+B.subtilis gruplarının komplement miktarının kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). 80. günde ise tüm grupların komplement miktarının kontrol grubu ile benzer oldukları görülmektedir.



Şekil 4.38. Deneme 2.2 süresince gruplara göre hemolitik komplement bulgularındaki değişimler

#### 4.5.4. Kan pH Bulguları

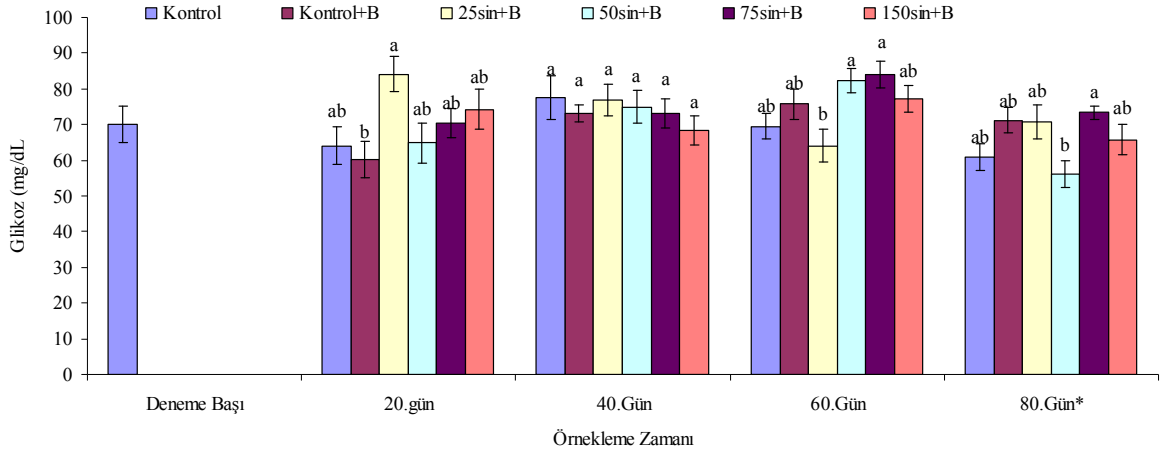
Deneme süresince kan pH (Şekil 4.39.) bulgularındaki değişimlere bakıldığında sadece 40. günde %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak azaldığı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.39. Deneme 2.2 süresince gruplara göre kan pH bulgularındaki değişimler

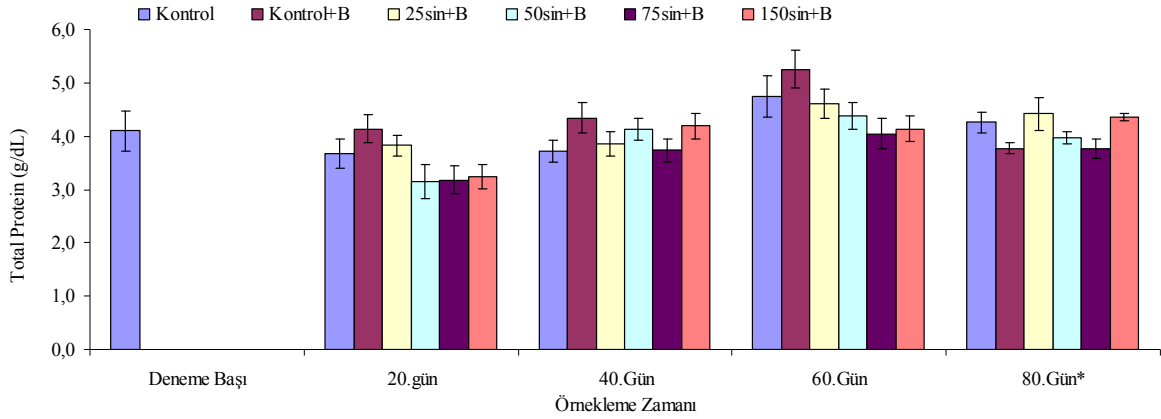
#### 4.5.5. Serum Biyokimya Bulguları

Deneme süresince kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının serum glikoz miktarı (Şekil 4.40.) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Ancak, 20. günde %0,025 sin+*B.subtilis* grubunun kontrol+*B.subtilis* grubundan, 60. günde ise %0,050 sin+*B.subtilis* ve %0,075 sin+*B.subtilis* gruplarında %0,025 sin+*B.subtilis* grubuna göre, 80. günde ise %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda %0,050 sin+*B.subtilis* grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



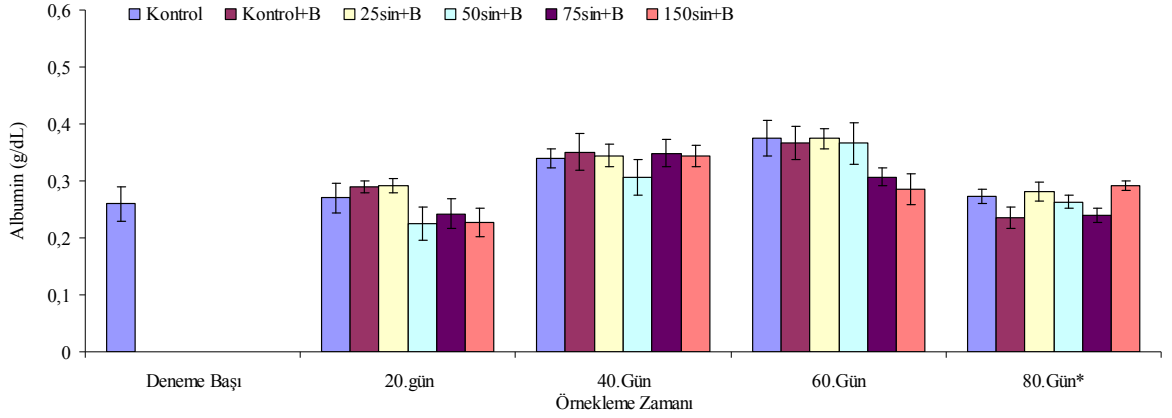
Şekil 4.40. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum glikoz bulgularındaki değişimler

Deneme süresince kontrol, kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının toplam protein (Şekil 4.41.) miktarı istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ).



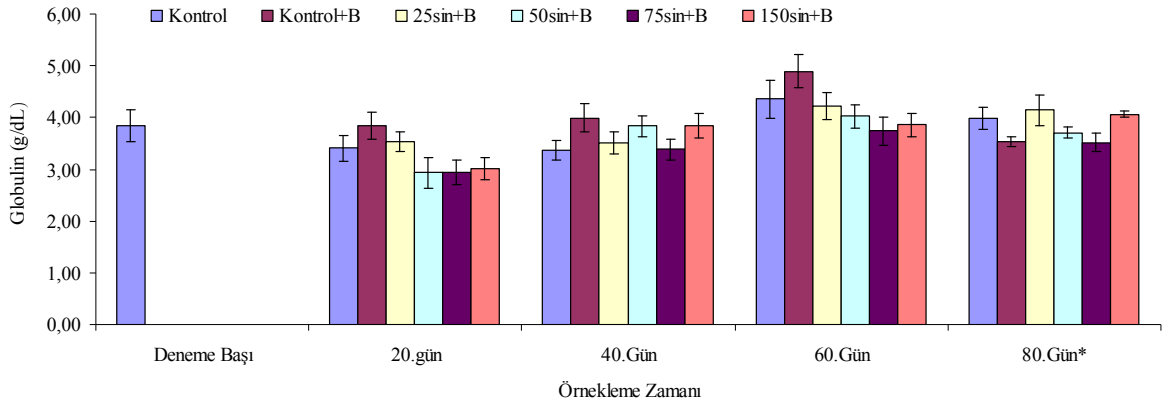
Şekil 4.41. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum toplam protein bulgularındaki değişimler

Deneme süresince kontrol, kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının albumin (Şekil 4.42.) miktarlarının istatistiksel olarak benzer oldukları görülmüştür ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.42. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum albumin bulgularındaki değişimler

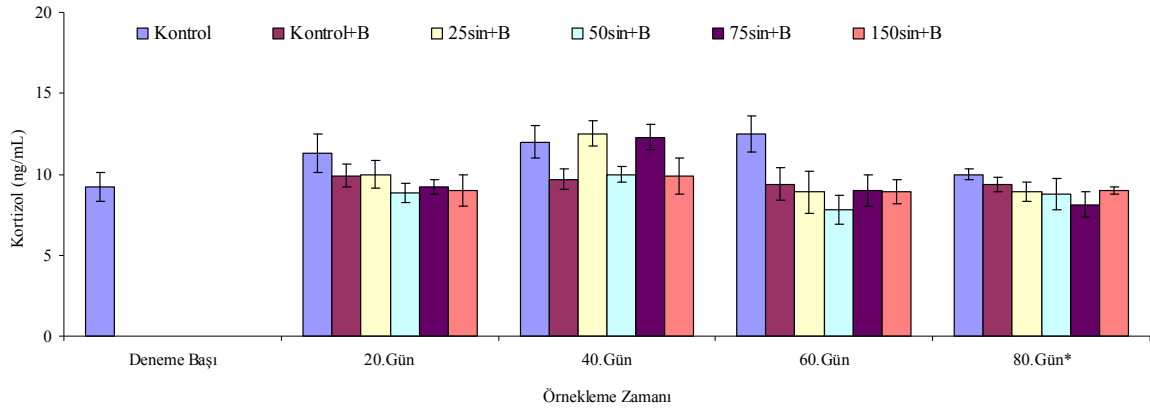
Deneme süresince kontrol, kontrol+*B.subtilis*, %0,025 sin+*B.subtilis*, %0,050 sin+*B.subtilis*, %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarının globulin (Şekil 4.43.) miktarlarının istatistiksel olarak benzer oldukları tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.43. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum globulin bulgularındaki değişimler

#### 4.5.6. Kortizol Bulguları

Deneme süresince kontrol, kontrol+B.subtilis, %0,025 sin+B.subtilis, %0,050 sin+B.subtilis, %0,075 sin+B.subtilis ve %0,150 sin+B.subtilis gruplarının serum kortizol (Şekil 4.44.) miktarlarının istatistiksel olarak benzer oldukları görülmüştür ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.44. Deneme 2.2 süresince gruplara göre serum kortizol bulgularındaki değişimler

#### 4.6. Deneme 3.

##### 4.6.1. Büyüme Performansı Bulguları

Deneme sonunda balıkların ortalama başlangıç ağırlığı (OBA), ortalama son ağırlığı (OSA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) sonuçları Çizelge 4.21.'de verilmiştir. Çalışma sonucunda %0 (kontrol), %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarında sinamik asit içerikli yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalık yavrularının büyüme performansında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir değişim olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.21. Deneme 3. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025 sin	%0,050 sin	%0,075 sin	%0,150 sin
OBA (g)	1,05±0,03	1,03±0,03	1,03±0,01	1,05±0,02	1,04±0,07
OSA (g)	3,60±0,05	3,58±0,07	3,64±0,05	3,62±0,03	3,68±0,09
CAA (%)	243,41±11,77	247,54±9,54	251,75±1,24	245,03±8,25	256,83±17,24
YDO	0,88±0,02	0,89±0,02	0,89±0,01	0,91±0,02	0,87±0,01
SBO (% gün <sup>-1</sup> )	2,05±0,06	2,07±0,05	2,10±0,01	2,06±0,04	2,12±0,08

#### 4.6.2. Besin Kompozisyonu Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen sinnamik asitin besin kompozisyonu (Çizelge 4.22.) bulgularından kuru madde, protein, yağ ve kül üzerine istatistiksel olarak bir etkisinin olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.22. Deneme 3. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları ve karaciğer yağı bulguları

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025 sin	%0,050 sin	%0,075 sin	%0,150 sin
Kuru Madde (%)	29,31±1,26	28,86±0,64	28,57±0,72	28,72±0,66	28,82±0,61
Protein (%)	16,19±0,53	15,54±0,23	16,41±0,29	15,53±0,29	15,45±0,70
Yağ (%)	9,25±0,75	9,63±0,55	8,70±0,44	9,80±0,46	10,09±0,55
Kül (%)	2,30±0,21	2,20±0,17	2,25±0,07	2,25±0,07	2,30±0,06

#### 4.6.3. Kortizol ve Hematolojik Bulgular

Deneme süresince gruplar arasındaki kortizol ve hematolojik bulgulardan eritrosit miktarı (RBC), hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonunda (MCHC) meydana gelen değişimler Çizelge 4.23.'de verilmiştir. 3.Deneme süresince besleme grupları arasında tüm balık kortizol, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ).



Çizelge 4.23. Deneme 3. sonunda gruplara göre tüm balık kortizol ve hematolojik bulgulardaki değişimler

	Deneme Grupları				
	Kontrol	%0,025 sin	%0,050 sin	%0,075 sin	%0,150 sin
Kortizol (ng/g)	10,11±0,45	9,00±0,47	8,78±0,46	8,67±0,55	9,11±0,51
RBC (x 10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	1,45±0,04	1,45±0,05	1,40±0,06	1,45±0,07	1,45±0,07
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	8,63±0,20	8,47±0,20	8,61±0,19	8,24±0,22	8,60±0,32
Hct (%)	35,01±0,53	31,66±0,99	31,82±0,72	32,03±1,18	32,50±0,91
MCV (µm <sup>3</sup> )	243,10±5,87	220,03±9,51	230,67±8,46	222,59±8,71	226,80±9,79
MCH (pg)	59,97±1,92	58,86±2,33	62,54±2,62	58,03±3,70	60,63±4,22
MCHC (%)	24,68±0,55	26,81±0,36	27,09±0,47	26,06±1,27	26,59±1,08

#### 4.7. Deneme 4.

##### 4.7.1. Büyüme Performansı Bulguları

Deneme sonunda balıkların ortalama başlangıç ağırlığı (OBA), ortalama son ağırlığı (OSA), canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) sonuçları Çizelge 4.24.'de verilmiştir. Çalışma sonucunda %0 (sinnamik asit ve *B.subtilis* içermeyen kontrol), 2. kontrol (Sinnamik asit içermeyen, *B.subtilis* içeren kontrol) %0,025, %0,05, %0,075 ve %0,15 oranlarında sinnamik asit ve *B.subtilis* içerikli yemlerle beslenen gökkuşacağı alabalık yavrularının büyüme performansında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir değişim olmadığı bulunmuştur (p>0,05).

Çizelge 4.24. Deneme 4. sonunda gruplara göre elde edilen büyüme performansı ve yem değerlendirme bulguları

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
OBA (g)	1,07±0,01	1,08±0,03	1,02±0,03	1,01±0,02	1,01±0,01	1,02±0,02
OSA (g)	3,60±0,02	3,55±0,08	3,62±0,08	3,53±0,06	3,51±0,08	3,58±0,03
CAA (%)	238,84±6,39	230,51±8,65	254,07±16,44	251,17±0,37	247,38±5,82	249,92±6,04
YDO	0,89±0,01	0,91±0,03	0,89±0,04	0,89±0,01	0,92±0,03	0,89±0,01
SBO (% gün <sup>-1</sup> )	2,03±0,03	1,99±0,04	2,10±0,08	2,09±0,00	2,07±0,03	2,09±0,03

#### 4.7.2. Besin Kompozisyonu Bulguları

Deneme sonunda yeme ilave edilen *B.subtilis* ile sinnamik asit+*B.subtilis* gruplarının besin kompozisyonu bulgularından (Çizelge 4.25.) kuru madde, protein, yağ ve kül üzerine istatistiksel olarak bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (p>0,05).

Çizelge 4.25. Deneme 4. sonunda gruplara göre elde edilen ortalama iç organlar hariç balık eti biyokimyasal kompozisyonları

	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
Kuru Madde (%)	27,78±0,14	28,19±0,40	28,72±0,66	29,50±0,93	28,66±0,67	28,58±0,81
Protein (%)	15,88±0,37	15,60±0,32	15,46±0,20	16,93±0,25	15,38±0,31	16,06±0,40
Yağ (%)	9,31±0,70	9,63±0,52	9,99±0,20	8,58±0,33	10,03±0,30	9,06±0,04
Kül (%)	2,27±0,19	2,28±0,05	2,28±0,04	2,33±0,09	2,42±0,09	2,35±0,10

#### 4.7.3. Kortizol ve Hematolojik Bulgular

Deneme süresince gruplar arasındaki kortizol ve hematolojik bulgulardan eritrosit miktarı (RBC), hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonunda (MCHC) meydana gelen değişimler Çizelge 4.26.'de

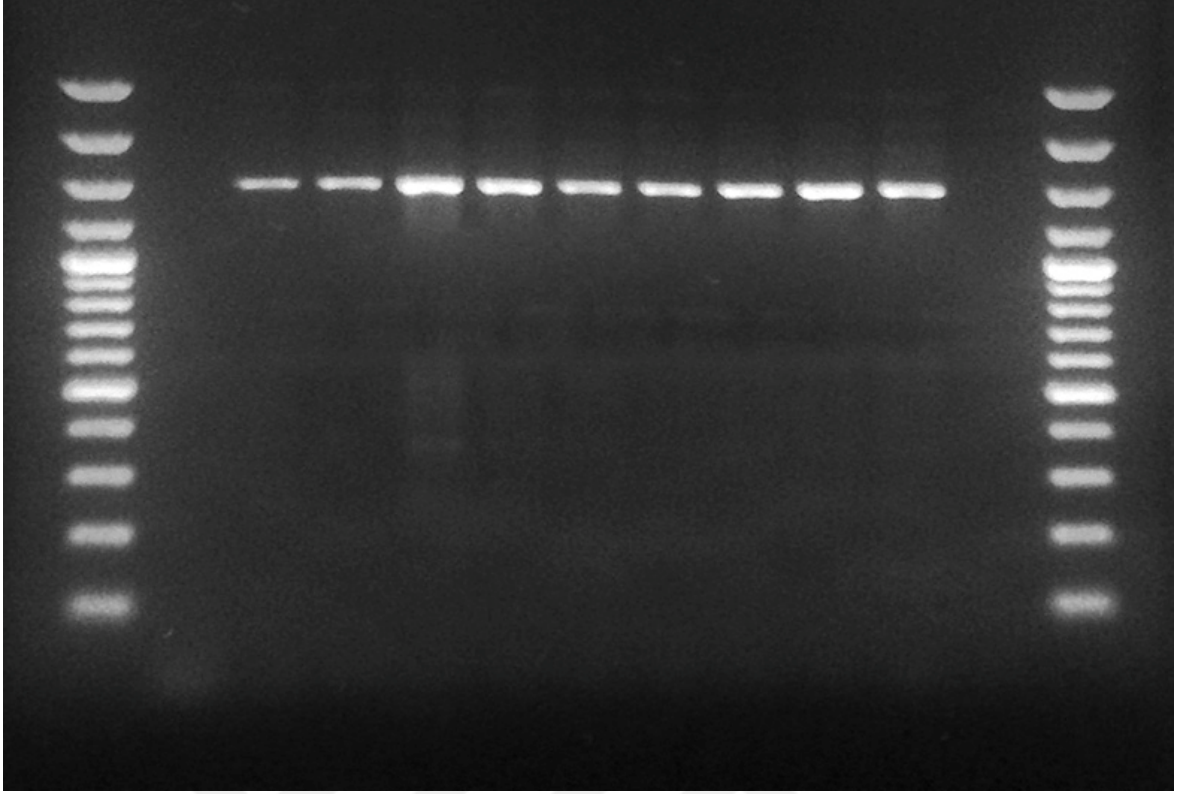
verilmiştir. Deneme süresince besleme grupları arasında tüm balık kortizol, RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ).

Çizelge 4.26. Deneme 4. sonunda gruplara göre tüm balık kortizol ve hematolojik bulgulardaki değişimler

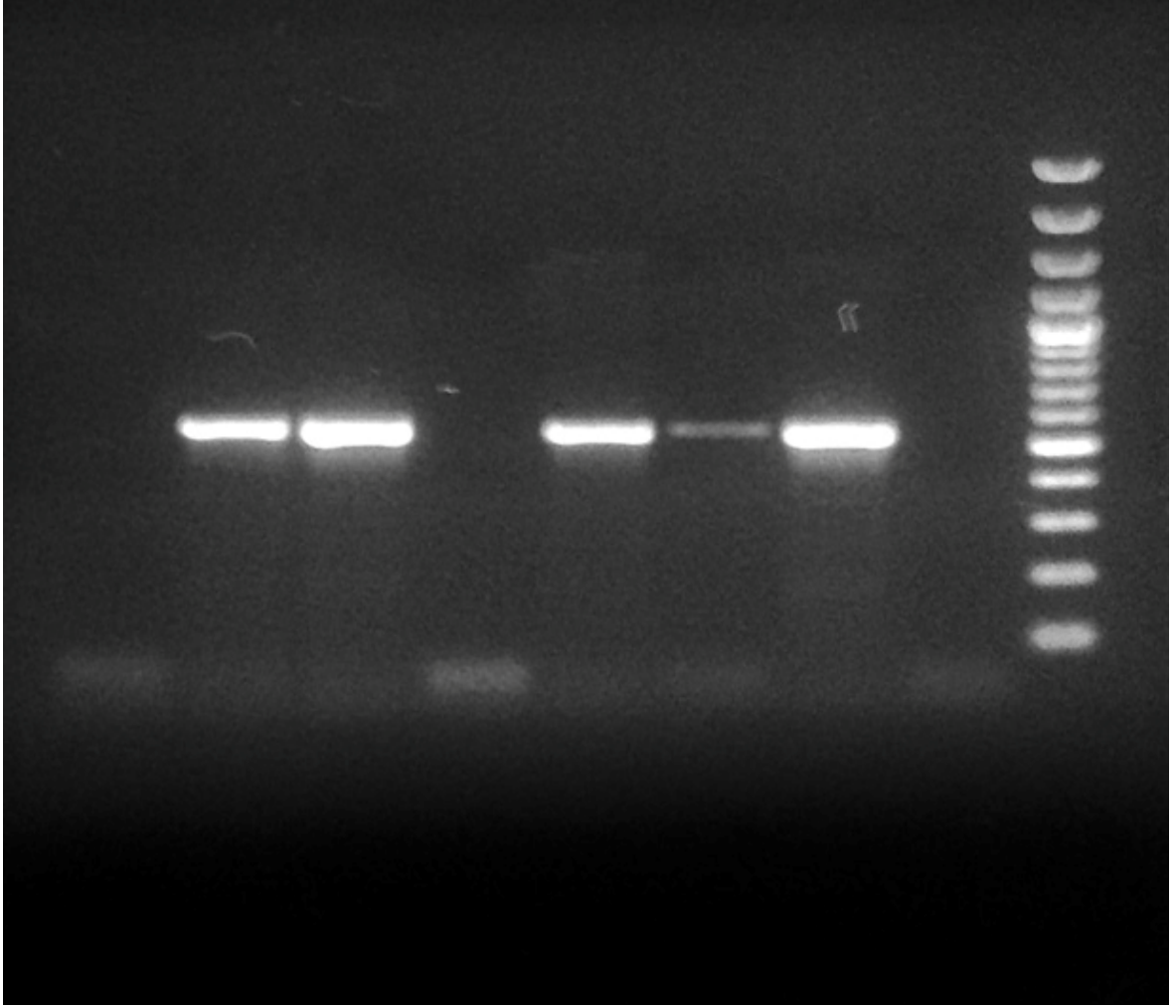
	Deneme Grupları					
	Kontrol	Kontrol+ <i>B.subtilis</i>	%0,025 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,050 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,075 sin+ <i>B.subtilis</i>	%0,150 sin+ <i>B.subtilis</i>
Kortizol (ng/g)	9,00±0,53	8,67±0,60	8,89±0,59	8,44±0,44	9,22±0,60	9,28±0,46
RBC (x 10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	1,58±0,04	1,76±0,03	1,79±0,02	1,74±0,04	1,75±0,04	1,60±0,01
Hb (g dL <sup>-1</sup> )	7,91±0,15	8,03±0,24	8,51±0,23	8,23±0,23	8,20±0,25	7,94±0,12
Hct (%)	25,08±0,98	28,89±1,03	27,92±0,74	26,52±0,80	28,29±0,72	25,90±0,60
MCV (µm <sup>3</sup> )	158,98±5,92	164,19±4,53	155,91±4,49	153,00±4,96	162,20±5,32	162,27±3,81
MCH (pg)	50,12±0,63	45,66±0,91	47,46±1,15	47,56±1,62	46,90±1,31	49,74±0,36
MCHC (%)	31,87±1,20	27,88±0,44	30,63±1,12	31,15±0,79	29,04±0,86	30,81±0,88

#### 4.8. 16S rRNA ve *gyrB* Gen Dizileme Analizi Bulguları

Elde edilen tüm izolatlar a ait 16S rRNA ve *gyrB* gen bölgeleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görünütüsü Şekil 4.45. ve 3.46.'de gösterilmiştir. Dizi analizine gönderilen şüpheli *B.subtilis* izolatları arasından seçilen 9 adet izolatın tümü *B.subtilis* subsp. *spizizenii* olarak tanımlanmıştır. Buna ek olarak balıklara infekte edilen ve yaşama oranı testi için kullanılan suş da *Yersinia ruckeri* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.45. Elde edilen izolatların *gyrB* gen bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Ladder: GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder



Şekil 4.46. 16S rRNA gen bölgesi için PCR ürünlerine ait jel elektroforez görüntüsü.  
Ladder: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

#### 4.9. Antimikrobiyal ve Sıvı Kültür İnhibisyon Analiz Bulguları

Alabalık bağırsak izolatları üzerine Chloramphenicol (C30), Streptomycin (S10), Vancomycin (VA30), Doxycycline (DO30), Oxytetracycline (OT30), Trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT25), Amoxicillin/clavulanic acid (AMC30), Eritromisin (E15), Gentamicin (CN10), Forfenikol (FFC30) antibiyotik diskleri ve sinamik asitin (2mg/disk) 1. *Aeromonas sobria* SY-AS3, 2. *Acinetobacter johnsonii* SY-AJ, 3. *Bacillus nealsonii* SY-BN9, 4. *Bacillus pumilus* SY-BP15, 5. *Bacillus subtilis* SY-BS19, 6. *Bacillus subtilis* SY-BS20, 7. *Bacillus thuringiensis* SY-BT11, 8. *Citrobacter freundii*, SY-CF14, 9. *Enterobacter sp.*, SY-EN560, 10. *Lelliottia amnigena* SY-LA18, 11. *Lysinibacillus xylanilyticus* SY-LX12, 12. *Pseudomonas putida* SY-PP21, 13. *Shewanella baltica*, SY-S145, 14. *Flavobacterium spartansii* SY-FS1, 15. *Aeromonas sobria* SY-AS1, 16. *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, 17. *Citrobacter sp.*, SY-C10, 18. *Edwardsiella*

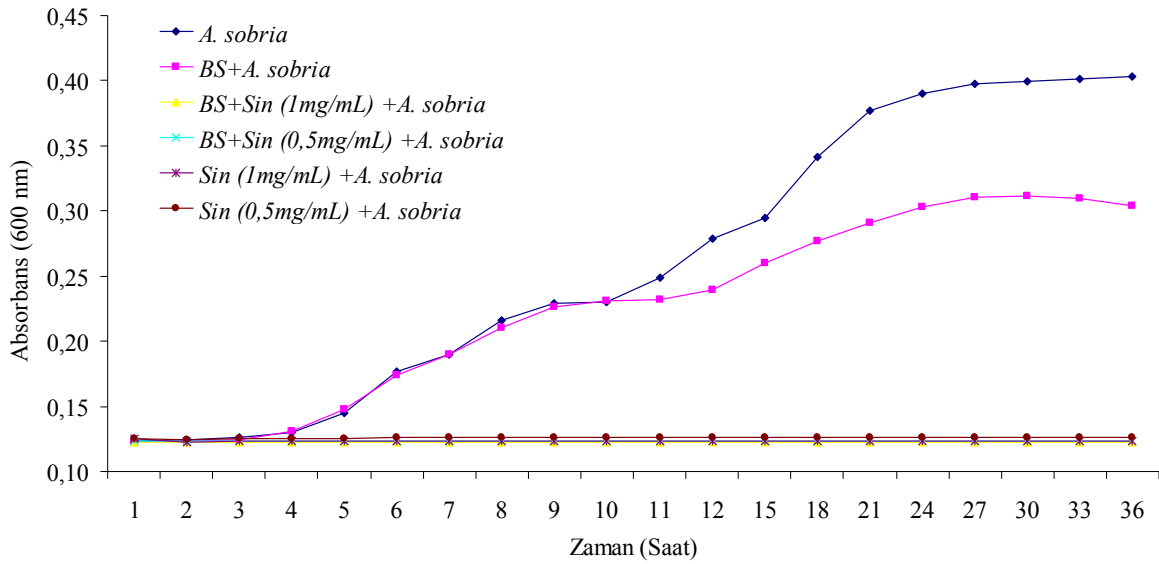
*tarda* SY-ED1, 19. *Edwardsiella tarda* SY-ED14, 20. *Lactococcus garvieae*, SY-LG1, 21. *Listonella anguillarum*, SY-L24, 22. *Streptococcus iniae* ATCC 2917, 23. *Yersinia ruckeri*, E42, 24. *Lactobacillus plantarum*, BC 7321, 25. *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, 26. *Escherichia coli*, ATCC 25922 bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi için yapılan disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyonu bulguları Çizelge 4.27.'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında 26 adet bakteri türü üzerinden sinamik asitin sadece *Aeromonas sobria* SY-AS1 balık patojeni üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca alabalık bağırsak izolatlarından *Aeromonas sobria* SY-AS3 ve *Shewanella baltica*, SY-S145, bağırsaktan izole edilmemiş alabalık izolatu *Flavobacterium spartansii* SY-FS1 ve balık patojenlerinden *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Listonella anguillarum*, SY-L24 ve *Yersinia ruckeri*, E42 üzerine sinamik asitin orta derecede inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Sinamik asitin diğer bakteri türleri üzerinde herhangi bir inhibisyon göstermediği bulunmuştur. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) bulgularına baktığımızda sinamik asit içeren besi ortamının pH nötrleşmesi yapıldığında (MİK 1) sinamik asitin antimikrobiyal etkisinin görülmediği tespit edilmiştir. Ancak besi ortamı nötrleşmesi yapılmadığında (MİK 2) sinamik asitin daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.27. Disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) bulguları

NO	Antibiyotik Diskler										Sinnamik Asit		
	C 30	S 10	VA 30	DO 30	OT 30	SXT 25	AMC 30	E 15	CN 10	FFC 30	SA 2mg	MİK 1	MİK 2
1	28	10	12	16	8	14	16	16	12	28	12	>2500	500
2	20	16	10	20	17	18	26	12	18	14	8	>2500	500
3	18	16	19	25	25	-	31	18	16	20	8	>2500	1000
4	18	16	18	22	21	-	30	24	22	25	8	>2500	1000
5	26	10	19	27	23	19	41	23	24	28	8	>2500	1000
6	29	24	19	26	25	24	34	30	26	30	10	>2500	1000
7	13	16	15	20	17	-	-	23	19	23	-	>2500	1000
8	18	14	-	10	-	-	20	-	16	13	-	>2500	>1000
9	20	16	-	19	20	-	21	12	14	28	-	>2500	>1000
10	26	14	-	18	20	-	22	-	16	28	7	2500	1000
11	21	21	28	26	27	-	35	17	28	25	9	>2500	1000
12	-	16	-	24	20	-	16	-	20	-	8	>2500	>1000
13	26	12	-	32	22	28	20	26	24	34	14	>2500	500
14	22	-	-	26	24	-	22	22	-	28	18	2500	500
15	36	10	12	22	20	28	24	22	16	36	22	>2500	250
16	34	-	-	24	26	26	28	14	20	30	12	>2500	1000
17	24	14	-	20	24	-	20	8	20	20	8	>2500	>1000
18	30	16	-	26	30	24	32	12	20	40	10	>2500	>1000
19	30	12	-	26	28	20	30	14	18	32	11	>2500	>1000
20	26	8	20	26	24	-	34	28	10	16	-	>2500	>1000
21	30	10	-	28	24	24	12	10	16	32	14	>2500	500
22	25	8	15	25	27	18	34	26	9	21	11	>2500	>1000
23	30	14	-	26	26	28	24	14	16	28	12	>2500	1000
24	24	-	-	18	18	-	32	23	-	23	8	>2500	>1000
25	32	18	20	24	20	-	16	25	21	34	8	2500	1000
26	24	14	-	18	-	-	22	-	16	22	8	>2500	>1000

NO: Bakteri numaraları, SA: Sinnamik asit (2mg/disk), MİK 1 (µg/mL) pH nötürlemesi yapılmış besi ortamlarını (pH:7,1-7,4 arası (MRS: 5,75). MİK 2 (µg/mL) pH nötürlemesi yapılmamış besi ortamlarını (MHB: 6,1, BHB: 6,87, TSB: 6,64, MRS: 5,36, TSB+%1,5 NaCl: 6,23) ifade etmektedir, -: herhangi bir zon gözlemlenmemiştir.

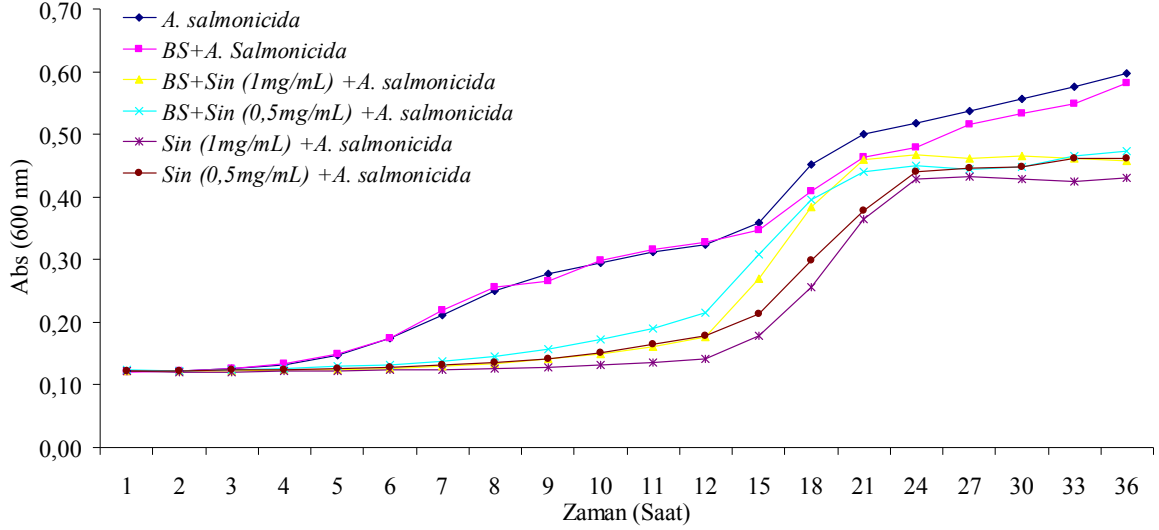
Sıvı kültür inhibisyon testi sonuçlarında sinamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte balık patojenlerinin üremelerini engelleyici etkileri incelendiğinde bakteri türlerine göre farklı sonuçlar alındığı bulunmuştur. Sinamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *A. sobria*, SY-AS1 üzerine engelleyici etkileri Şekil 4.47.'de gösterilmiştir. Tek başına *B. subtilis* üs fazının 11. saatten itibaren *A. sobria* bakterisinin üremesini engellemeye başladığı ve bu etkinin 18. saatten itibaren önemli oranda olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Ayrıca sinamik asitin 0,5 ve 1 mg/ mL konsantrasyonlarında ve *B. subtilis* üs fazının farklı sinamik asit konsantrasyonları (0,5 ve 1 mg/mL) ile birlikte *A. sobria* bakterisinin üremesini tamamen engelledikleri tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.47. Sinamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Aeromonas sobria*, SY-AS1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

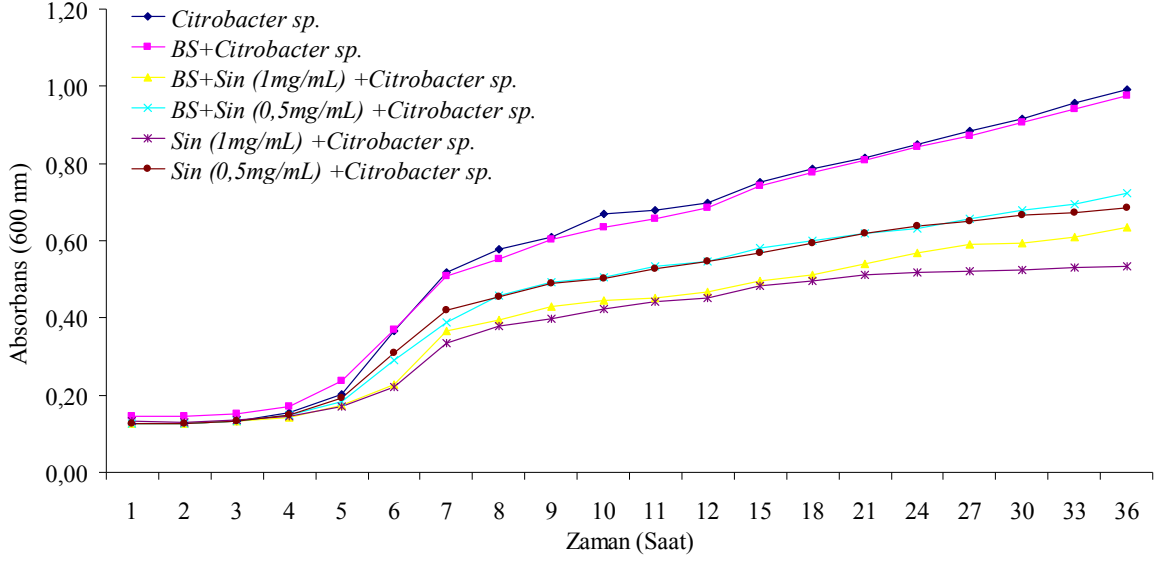
Sinamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte *A. salmonicida*, ATCC 33658 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.48.'de gösterilmiştir. Tek başına *B. subtilis* üs fazının 15. saatten itibaren *A. salmonicida* bakterisinin üremesini engellemeye başladığı ancak bu etkinin istatistikel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Sinamik asitin 0,5 ve 1 mg/ mL konsantrasyonları ve *B. subtilis* üs fazının farklı sinamik asit konsantrasyonları (0,5 ve 1 mg/mL) ile birlikte *A. salmonicida* bakterisinin üremesini 7-12 saatleri arasında önemli oranda engelledikleri tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca 15-36. saatler arasında her iki sinamik asit konsantrasyonunu ve 27. saatten sonra *B. subtilis* üs fazı ile birlikte sinamik asitin her iki konsantrasyonu *A. salmonicida* bakterisinin üremesini engelledikleri bulunmuştur ( $p<0,05$ ).





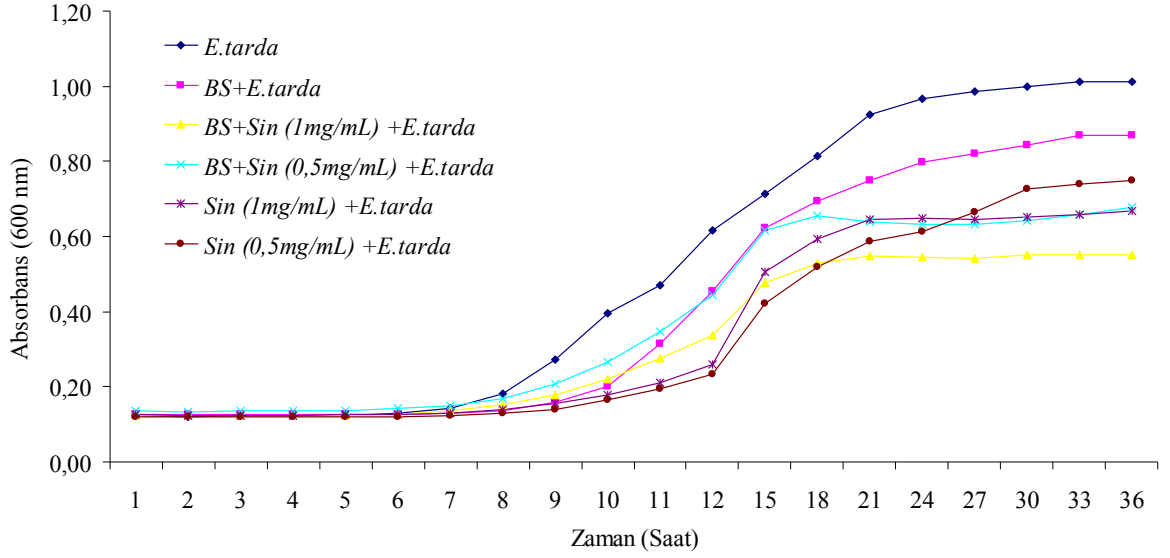
Şekil 4.48. Sinnamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Aeromonas salmonicida*, ATCC 33658 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *Citrobacter sp.*, SY-C10 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.49.'de gösterilmiştir. Yapılan okumalarda tek başına *B. subtilis* üs fazının *Citrobacter sp.* bakterisinin üremesini engellemediği görülmüştür ( $p>0,05$ ). Ancak 7-36. saatler arasında *B. subtilis* üs fazı ile birlikte sinnamik asitin her iki konsantrasyonu ve sadece sinnamik asit konsantrasyonları *Citrobacter sp.* bakterisinin üremesini önemli oranda engellemiştir ( $p<0,05$ ). Sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda tek başına sinnamik asitin 1 mg/mL konsantrasyonun *Citrobacter sp.* üzerinde diğer uygulamalardan daha etkili olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



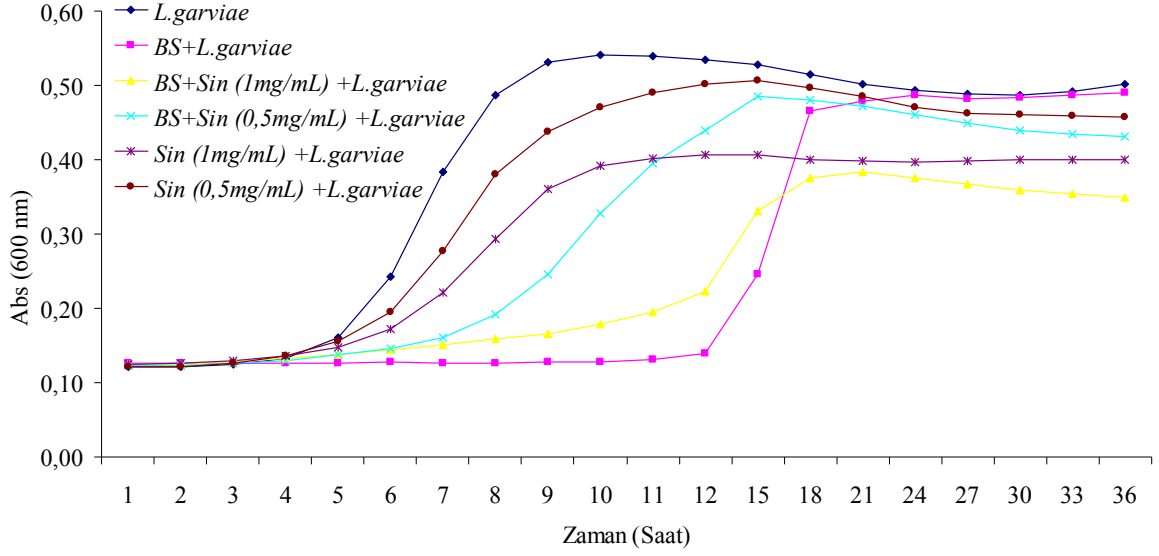
Şekil 4.49. Sinnamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Citrobacter sp.*, SY-C10 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *E. tarda* SY-ED1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.50.'de gösterilmiştir. 9. saatten itibaren sinnamik asitin 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonları, *B. subtilis* üs fazının farklı sinnamik asit konsantrasyonları (0,5 ve 1 mg/mL) ile birlikte ve *B. subtilis* üs fazının tek başına *E. tarda* SY-ED1 bakterisinin üremesini önemli oranda engellediği tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 36. saat sonunda diğer tüm uygulama gruplarına göre en etkili grubun 1 mg/mL sinnamik asit içerikli *B. subtilis* üs fazı olduğu bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



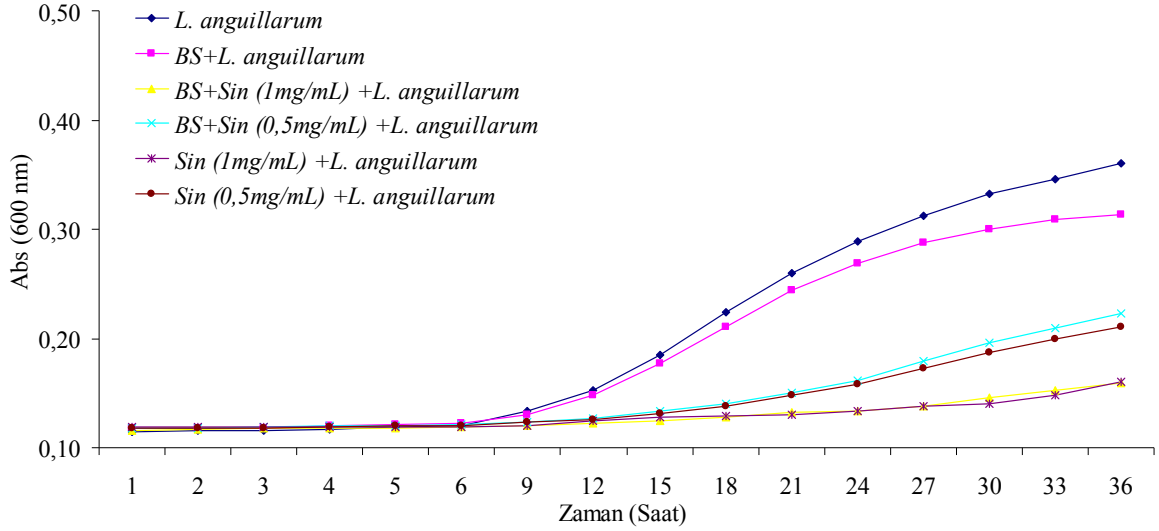
Şekil 4.50. Sinnamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Edwardsiella tarda*, SY-ED1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *L. garvieae*, SY-LG1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.51.'de gösterilmiştir. 6. saatten itibaren 1 mg/mL sinnamik asit konsantrasyonu ve 1 mg/mL sinnamik asit içerikli *B. subtilis* üs fazı 36. saate kadar *L. garvieae* bakterisinin üremesini önemli oranda engellemiştir ( $p < 0,05$ ). 0,5 mg/mL sinnamik asit konsantrasyonu *L. garvieae*'nin üremesini sadece 7-10. saatler arasında engellerken, 0,5 mg/mL sinnamik asit içeren *B. subtilis* üs fazı ise 6-12. saatler arasında engellemiştir ( $p < 0,05$ ). Sadece *B. subtilis* üs fazı uygulamasına baktığımızda 6-15. saatler arasında en etkili grup olduğu ve sadece bu saatler arasında *L. garvieae*'nin üremesini önemli oranda engellediği bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



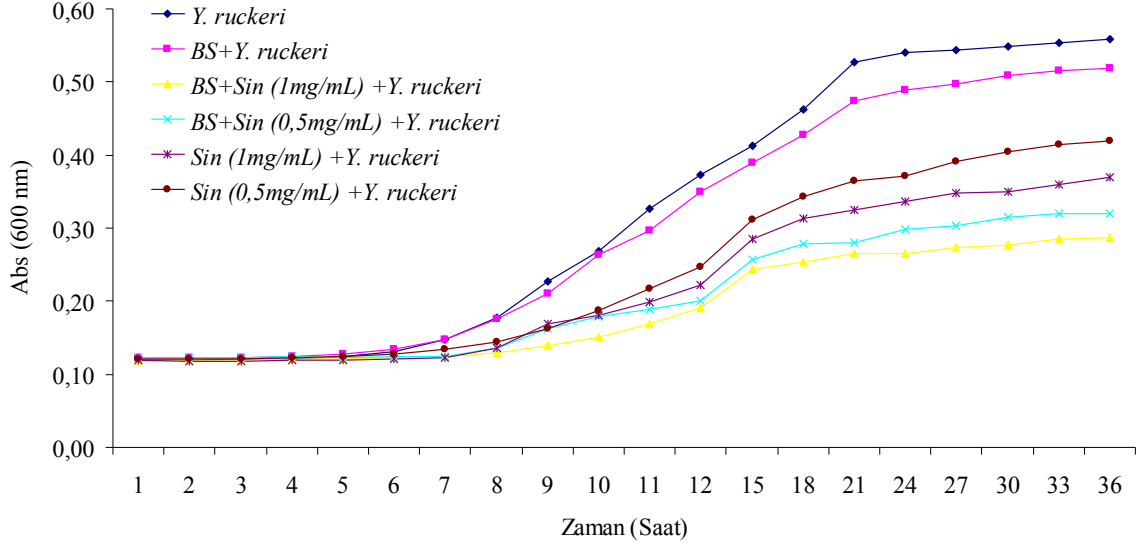
Şekil 4.51. Sinamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Lactococcus garvieae*, SY-LG1 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *L. anguillarum*, SY-L24 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.52.'de gösterilmiştir. Okumalarda tek başına *B. subtilis* üs fazının 18. saatten itibaren *L. anguillarum* üzerinde engelleyici etki göstermeye başladığı görülmekle birlikte bu etkinin önemli olmadığı bulunmuştur ( $p > 0,05$ ). Ancak, sadece iki farklı sinamik asit konsantrasyonu içeren ve *B. subtilis* üs fazı ile birlikte sinamik asitin her iki konsantrasyonunu içeren grupların *L. anguillarum* bakterisinin üremesini 15. saatten itibaren engellediği tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). *L. anguillarum* üzerinde en etkili grupların 1 mg/mL sinamik asit ve 1 mg/mL sinamik asit içeren *B. subtilis* üs fazı olduğu görülmüştür.



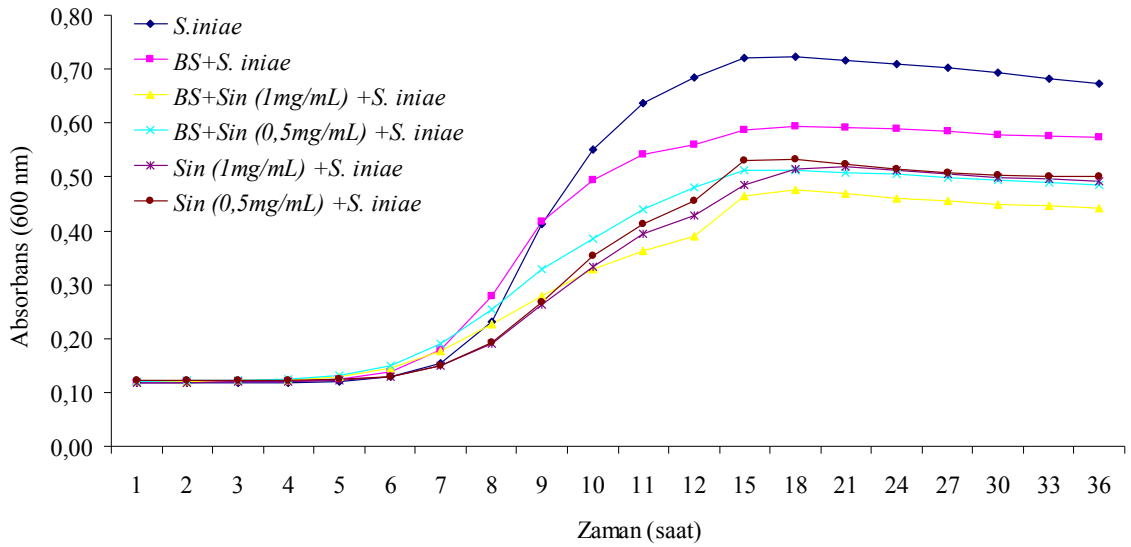
Şekil 4.52. Sinnamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Listonella anguillarum*, SY-L24 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *Y. ruckeri*, E42 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.53.'de gösterilmiştir. Okumalarda tek başına *B. subtilis* üs fazının 11. saatten itibaren *Y. ruckeri* bakterisinin üremesi üzerinde engelleyici etki göstermeye başladığı görülmekle birlikte bu etkinin önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). Ancak, 0,5 ve 1 mg/mL sinnamik asit konsantrasyonu ile aynı konsantrasyonları *B. subtilis* üs fazı ile birlikte içeren grupların *Y. ruckeri* üzerinde engelleyici etki gösterdiği bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Ayrıca en etkili uygulamanın 1 mg/mL sinnamik asit içeren *B. subtilis* üs fazı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.53. Sinamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Yersinia ruckeri*, E42 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

Sinnamik asit, *B. subtilis* veya ikisinin birlikte etkilerinin *S. iniae* ATCC 2917 bakterisinin üremesi üzerine etkileri Şekil 4.54.'de gösterilmiştir. Sadece *B. subtilis* üs fazının 11. saatten itibaren *S. iniae* bakterisinin üremesini engellediği tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca, 0,5 ve 1 mg/mL sinamik asit konsantrasyonu ile aynı konsantrasyonları *B. subtilis* üs fazı ile birlikte içeren grupların 9. saatten itibaren *S. iniae* bakterisinin üremesini engellediği görülmüştür ( $p<0,05$ ). *S. iniae* en etkili grubun 1 mg/mL sinamik asit içeren *B. subtilis* üs fazı olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.54. Sinamik asit veya *Bacillus subtilis* (BS)' in *Streptococcus iniae* ATCC 2917 bakterisinin üremesi üzerine etkileri

#### 4.10. Araştırma Bulgularının Genel Olarak Değerlendirilmesi ve Literatür ile Tartışılması

Doktora tez çalışması kapsamında genç alabalık yemlerine sinnamik asit, *B.subtilis* ve sinnamik asit + *B.subtilis* uygulamalarının ardından deneme sonunda balıkların büyüme performansları, besin kompozisyonları, toplam karaciğer yağ miktarı, iç organ indeksleri, bağırsak ve mide enzimleri, bazı serum biyokimyasal parametreleri (trigliserit, kolesterol, GOT, GPT, LDH, ALP), yem, mide ve bağırsak pH miktarları, bazı serum antioksidan kapasitesi ve bağırsak mikrobiyotası analiz edilmiştir (Deneme 1.1, Deneme 2.1). Ayrıca yavru balık yemlerinde aynı katkıların deneme sonunda büyüme performansı, besin kompozisyonu, tüm vücut kortizol ve hematolojik parametreleri üzerine etkileri de incelenmiştir (Deneme 3 ve Deneme 4). Daha önce tez kapsamında balık yemlerine ilave edilen sinnamik asitin etkisiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanılmadığından elde ettiğimiz sonuçlar ilk olma özelliği taşımaktadır ve orjinaldir.

Çalışma kapsamında değerlendirilen analizlerden; büyüme performansı, besin kompozisyonu, yağ asitleri, karaciğer yağ analizi, mide ve bağırsak pH analizleri ve bağırsak mikrobiyotası üzerine deneme gruplarının kontrol grubuna göre herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ancak *B.subtilis* ilaveli gruplarda bağırsak florasında *B. subtilis* miktarının önemli oranda arttığı bulunmuştur. Ayrıca deneme gruplarının yavru balıklarda yapılan iki denemede de büyüme performansı, besin kompozisyonu, tüm vücut kortizol ve hematolojik parametreleri üzerine herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, bağırsak ve mide enzimleri, iç organ indeksleri, bazı serum biyokimyasal parametreleri ve bazı serum antioksidan kapasitesi parametrelerinde önemli değişimler olmuştur. Bugüne kadar balıklar üzerinde sinnamik asitin etkisiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanılmadığından bu kısımda tez kapsamında elde edilen bulgular farklı organik asitler, sinnamik asitin türevleri ve benzer yapıdaki farklı ürünler ile karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmada sinnamik asitin yeme ilave edilen dozlarda (%0,025-%0,150) gökkuşağı alabalığı (Deneme 1.1: 17,49±0,08 g ve Deneme 3: 1,04±0,01 g) büyüme performansı ve besin kompozisyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Organik asit ilavesi yapılan diğer çalışmaların büyüme performansı ve besin kompozisyonu üzerine etkilerine baktığımızda farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Örneğin, gökkuşağı alabalığı (13,2 g) yemlerine %1 oranında sitrik asit ilave edildiğinde büyümede artış, SBO ve YDO de iyileşme görülmüştür (Hernandez ve ark., 2012). Benzer olarak yeme %1 oranında sitrik asit ilavesi daha düşük balık unu yemi ile beslenen

gökkuşığı alabalıklarında ( $2,67\pm 0,01$  g) dahi büyüme normal değerlerde tutmuştur (Pandey ve Satoh 2008). Gökkuşığı alabalığı (40 g) yemlerine organik asit karışımı %0, %0,5, %1 ve %1,5 oranlarında ilave edilmiş ve çalışmada %1 ve %1,5 oranlarında büyüme ve SBO da artış sağlanmıştır (de Wet, 2005). Ancak yeme %1 oranında sodyum format-sodyum bütirat (2:1) ilavesi bitkisel protein kaynaklı diyetle beslenen gökkuşığı alabalıklarının (230 ve 950 g) büyüme performansı ve yemden yararlanma üzerine etki göstermezken, besin sindirimini azaltmıştır (Gao ve ark. 2011). Farklı bir çalışmada yeme yüksek oranda (%12) sukkinik asit veya sitrik asit ilavesi gökkuşığı alabalıklarının yem tüketimini azaltmıştır (Fauconneau, 1988). Gökkuşığı alabalıklarında ( $3,0\pm 0,1$ ) yapılan farklı bir çalışmada yeme %0, %4, %8 ve %16 oranlarında sitrik asit ilave edilmiş ve ağırlık artışına herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Vielma ve ark., 1999). Literatürdeki çalışmalar arasındaki farklılıkların yemdeki besinlerin sindirilebilirliklerindeki, yemdeki organik asit oranlarındaki, yemin kompozisyonundaki ve yaşındaki, balık besleme koşullarındaki ve yem teknolojilerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Gao ve ark. 2011). Çalışmamıza benzer olabilecek farklı bir çalışmada kırmızı mercan balığı (*Pagrus major* 250 g) yemlerine sinamik asitin bir türevi olan ferulik asit %0,01, 0,05, 0,1 ve 0,5 oranlarında ilave edilmiş ve 98 günlük besleme sonucunda büyüme performansına herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Maoka ve ark., 2008).

Çalışmamızın ikinci kısmında sinamik asit yemlerine (%0,025-%0,150) probiyotik (*B.subtilis*  $10^7$  cfu  $g^{-1}$ ) ilavesi yapılmıştır. Yapılan denemelerde (Deneme 2.1:  $21,63\pm 0,21$  g ve Deneme 4:  $1,03\pm 0,01$  g) deneme gruplarının büyüme performansı ve besin kompozisyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. *B.subtilis* ile ilgili alabalıklarda yapılan çalışmalarla bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçları karşılaştıracak olursak; bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak alabalık (70 g) yemlerine ilave edilen BioPlus 2B® (*B.subtilis* + *B. licheniformis*  $7,75$  cfu  $g^{-1}$ )'nin büyüme performansı ve besin kompozisyonu üzerine bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Merrifield ve ark., 2010a). Gökkuşığı alabalığı larva (120 mg) yemlerine farklı oranlarda ( $4,8\times 10^8$  -  $6,1\times 10^9$  cfu  $g^{-1}$ ) *B.subtilis* + *B. licheniformis* (BioPlus 2B®) ilave edilmiş ve 68 gün süren deneme sonunda en fazla ağırlık artışı (deneme sonu  $\sim 1,2$  g)  $3,8 \times 10^9$  cfu  $g^{-1}$  oranında probiyotik içerikli yemlerle beslenen balıklarda görülmüş, tüm probiyotik grupları (en düşük doz hariç:  $4,8\times 10^8$ ) tüm vücut protein oranını arttırmış ve yağ miktarı probiyotik dozu arttıkça azalmıştır (Bagheri ve ark., 2008). Aynı çalışmada daha az veya daha fazla ( $6,1\times 10^9$  cfu  $g^{-1}$ ) probiyotik içerikli yemlerle beslenen larvaların deneme sonu



ağırlığı benzer bulunurken SBO en iyi  $3.8 \times 10^9$  cfu g<sup>-1</sup> ve  $6.1 \times 10^9$  cfu g<sup>-1</sup> probiyotik içerikli gruplarda bulunmuştur.

*Labeo rohita* (Kumar ve ark., 2006) yemlerine *B. subtilis* ( $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>) ve nil tilapiyası *Oreochromis niloticus* (El-Haroun ve ark., 2006) yemlerine Biogens® ( $3 \times 10^7$  cfu g<sup>-1</sup>- $12 \times 10^7$  cfu g<sup>-1</sup>) ilave edilen çalışmalarda büyüme performansında artış sağlanmıştır. Ancak Biogens® ticari bir ürün olup içeriğinde allisin ve hidrolitik enzimler de mevcuttur.

Gökkuşığı alabalığı yemlerine katılan farklı probiyotik katkıların etkisine bakılacak olursa gökkuşığı alabalıklarının ( $13,2 \pm 0,25$ ) yemlerinde *E. faecalis* probiyotiği tek başına katıldığında büyüme performansında ve balık vücut kompozisyonunda kontrole göre bir farklılığın olmadığı ancak prebiyotik ilavesiyle birlikte büyümede artış sağlandığı ve besin kompozisyonunda ise bir fark olmadığı bulunmuştur (Rodriguez-Estrada ve ark., 2009). Farklı bir çalışmada ise *L. casei* ve *L. plantarum* probiyotik bakterileri ayrı ayrı olarak gökkuşığı alabalığı (20 g) yemlerine ilave edilmiş ve 30 günlük besleme denemesi sonunda her iki probiyotik türünde ( $5 \times 10^7$  cfu g<sup>-1</sup>) büyüme performansını arttırdığını tespit etmişlerdir (Andani ve ark., 2012). Ancak gökkuşığı alabalıklarında *E. faecalis* ve *Lactobaciller* ne kadar etkili de olsa ticarileşme olasılığı *Bacillus* türleri kadar değildir. Çünkü *Bacillus* türleri spor oluşturan ve sporları yüksek sıcaklıklara dayanıklı türlerdir (Hong ve Cutting 2005).

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgular ile literatürdeki bulguların tam olarak kıyaslanamayacağı görülmektedir. Bunun nedeni çalışmalarda probiyotik ilavesinin (*B. subtilis*) tek başına yapılmamış olması, farklı balık türlerinde çalışmaların yürütülmesi, aynı balık türündeki çalışmalarda farklı büyüklüklerdeki balıkların denemelerde kullanılmış olması ve bu durumun sonuçları etkilediğinin görülmüş olması (Merrifield ve ark., 2010a; Bagheri ve ark., 2008), aynı probiyotik türü de olsa farklı suşların kullanılmış olması ve aynı balık türünde farklı probiyotik türlerinin birlikte kullanılmış olması sıralanabilir.

Besinsel açıdan diğer önemli bir kriterde balık eti yağ asit kompozisyonudur. Yağ asitleri balık gelişimi, sağlığı, hücre membran yapısının korunması ve fonksiyonlarının devamı için önemlidirler (Sargent ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda gökkuşığı alabalıklarının yemlerinde linoleik asite (18:3n-3) % 0,7–1,0 ve n-3 HUFA da % 0,4–0,5 oranlarında ihtiyaç duydukları bildirilmiştir (Sargent ve ark., 2002; Hardy, 2002). Ayrıca alabalıklar fosfolipit ve prostaglandin sentezi için az miktarda araşidonik asit (C20:4) ihtiyacına da sahiptirler (Cho ve Cowey, 1991). Bu tez çalışması kapsamında yeme ilave

edilen sinnamik asit veya sinnamik asit+ *B.subtilis*'in balıkların yağ asit kompozisyonları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada yeme ilave edilen sinnamik asit (Deneme 1.1), *B.subtilis* ve sinnamik asit+*B.subtilis*'in (Deneme 2.1) gökkuşağı alabalıklarında etkisiyle ilgili araştırılan diğer bir parametre de bağırsak florasıdır. Bu amaçla denemelerde yeme ilave edilen sinnamik asitin *Enterobacteriaceae*, koliform, laktik asit ve toplam heterotrofik aerobik bakterileri ile maya ve küflerin üzerine etkisi incelenmiştir. Sinnamik asit+*B.subtilis* ve *B.subtilis* ilavesinin etkisinde ise ilaveten mezofilik bakteri sayısı ve *B.subtilis* sayısına da bakılmıştır. Sinnamik asitin tek başına yeme ilavesi bağırsak florası üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak Sinnamik asit+*B.subtilis* ve *B.subtilis* ilavesiyle birlikte bağırsak florasında *B.subtilis* miktarının önemli oranda arttığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığında klasik sayım yöntemiyle elde ettiğimiz üreyebilen canlı sayımı sonuçlarına bakacak olursak, toplam heterotrofik aerobik bakterileri 5,49-6,77 log cfu g<sup>-1</sup> aralığında bulunmuştur. Bu sonuçların gökkuşağı alabalıklarında yapılmış çalışmalarda bağırsaklardaki toplam bakteri mikrobiyotası için daha önce bildirilen sonuçlara (2,47-7 log cfu g<sup>-1</sup>) benzer olduğu görülmektedir (Spanggaard ve ark., 2000; Kim ve ark., 2007; Merrifield ve ark., 2010a). *B.subtilis* içerikli gruplarda bağırsakta üreyebilen *B.subtilis* sayısı ise 5,29-5,80 log cfu g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda kontrol grubunun doğal florasında *B.subtilis* izole edilmemiştir. Farklı çalışmalarda alınan sonuçlara baktığımızda gökkuşağı alabalığı yemlerine ilave edilen BioPlus 2B® (*B.subtilis* + *B. licheniformis* 7,75 cfu g<sup>-1</sup>)'nin bağırsaklarda 7 log cfu g<sup>-1</sup> olarak geri izolasyonunun yapıldığı bildirilmiştir (Merrifield ve ark., 2010a). Bu değer çalışmamıza oranla daha az gözüksede Merrifield ve ark. (2010a) yaptıkları çalışmada kontrol grubunda da *Bacillus* izole edilmiştir. Bu nedenle çalışmaların karşılaştırılması yüzdesel olarak yapılabilir gözükmemektedir. Bu çalışmada *B. subtilis*' in üreyebilen toplam bakteri yükü içerisindeki yüzdeleri kontrol için %0, kontrol+ *B. subtilis* için %81,61, %0,025 sin+*B. subtilis* için %87,11, %0,050 sin+ *B. subtilis* için %97,67, %0,75 sin+*B. subtilis* için %93,14 ve %0,150 sin+*B. subtilis* için %96,50 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlara baktığımızda sinnamik asit oranı arttıkça *B. subtilis* bakterilerinin bağırsak florasına yerleşme oranında arttığı ve %0,150 sin+*B. subtilis* grubunda Kontrol+ *B. subtilis* grubuna göre yaklaşık %15 daha fazla yerleştiği bulunmuştur. Merrifield ve ark. (2010a) yaptıkları çalışmada ise *Bacillus* bakterilerinin üreyebilen toplam bakteri yükü içerisindeki yüzdesi %62 olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında çalışmamızda *B. subtilis* içerikli yemlerle beslenen balıklarda *B. subtilis*'in

bağırsak florasının %80 ve üzerinde hakim olduğu görülmektedir. Çalışmalar arasındaki farklılığın çalışmamızda kontrol grubunda *Bacillus* bakterisine rastlanılmamasıyla açıklanabilir. Ayrıca çalışmalarda farklı suş kullanımı ve probiyotiklerin farklı türlerden oluşması gibi etkenlerde farklılıkların nedenini açıklayabilir. Bu hipotezleri kanıtlar nitelikte her ne kadar larvalarda yapılmış olsada, gökkuşağı alabalıklarında yapılan farklı bir çalışmada yine yemlere BioPlus 2B® (*B.subtilis* + *B. licheniformis*) ilave edilmiş ve çalışmamızla benzer olarak kontrol grubunda *Bacillus* bakterisine rastlanılmamıştır (Bagheri ve ark., 2008). Aynı çalışmada yemlerdeki kullanılan probiyotik oranları  $4.8 \times 10^8$  -  $6.1 \times 10^9$  cfu g<sup>-1</sup> aralığındayken bağırsaklarda bu oran 6,40-7,52 log aralığında elde edilmiş ve *Bacillus* bakterilerinin üreyebilen toplam bakteri yükü içerisindeki yüzdesi %65-%99 olarak bulunmuştur (Bagheri ve ark., 2008). Bu çalışmada yemlerde  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> *B. subtilis* ilavesiyle elde ettiğimiz sonuçlar kullanılan miktara bakıldığında Bagheri ve ark. (2008) ile benzer olduğu söylenebilir. Farklı bir çalışmada deneme balıklarına (*O. mykiss*) probiyotikli yemler yedirilmeye başlanılmadan önce balıklar antibiyotik (oxolinic asit) ile beslenmiş ve bağırsak florasındaki bakteri yükü indirgenmiş, devamında BioPlus 2B® (*B.subtilis* + *B. licheniformis* 7,79 log cfu g<sup>-1</sup>) ile beslenen balıkların bağırsak florasındaki toplam bakteriler içerisindeki *Bacillus* yüzdesi çalışmamıza benzer olur (Kontrol+ *B.subtilis* : %81,61) %82 bulunmuş olması (Merrifield ve ark., 2010d) hipotezimizi doğrular niteliktedir.

Organik asitlerin balıklardaki bağırsak florası üzerine çok az sayıda çalışma vardır. Bu nedenle bu konudaki literatür tartışması balık veya kabuklu türlerinde birlikte değerlendirilmiştir. Karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) yapılan bir çalışmada yeme %2 oranında organik asit karışımının ilave edilmesi hepatopankreasta toplam bakteri ve *Vibrio* yükünü azaltmıştır (Romano ve ark., 2015). Farklı bir karides türünde (*Penaeus monodon*) yapılan benzer bir çalışmada yemde %2 oranında organik asit karışımının kullanılması karideslerin bağırsak ve hepatopankreasındaki toplam bakteri ve *Vibrio* yükünü azaltmıştır (Ng ve ark., 2015). Balıklarda yapılan çalışmalara baktığımızda tilapia balıklarının yemlerine %0,3 oranında potasyum diformat eklendiğinde bağırsaklardaki laktik asit bakteri yükünün arttığını bulmuşlardır (Abu Elala ve Ragaa 2015). Ayrıca organik asitlerin bakteri yükünden ziyade bağırsaklardaki bakteri popülasyonlarını değiştirme özelliğide vardır. Örneğin %0,03 sodyum bütirat ilaveli yemlerle beslenen sazanlarda (*Cyprinus carpio*) bağırsaklara yapışan bakteriyel toplulukların değişimine neden olmuştur (Liu ve ark., 2014). Hibrit tilapia balıklarında ise yeme ilave edilen %0,3 ve %0,6 potasyum diformat bağırsaklardaki bazı bakterilerin bulunma bolluğunu arttırmış (*Mycobacterium* sp.

ve *Pseudomonas* sp.) bazılarınınkini ise azaltmıştır (*alpha Proteobacterium* ve *Rhodococcus* sp.) (Zhou ve ark., 2009). Ancak bazı çalışmalar da organik asitlerin bakteri yükü, bakterilerin bağırsaklardaki bulunma bolluğu veya popülasyonları değiştirme üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Örneğin abalonlar (*Haliotis midae*) da yapılan bir çalışmada yeme %2 oranında organik asit karışımı ilave edilmiş ve bağırsak mikrobiyotasına herhangi bir etkinin olmadığı görülmüştür (Goosen ve ark., 2011). Benzer olarak yeme %0,1-0,3 oranlarında organik asit karışımı ilavesinin hibrit tilapia balıklarının bağırsaklarındaki toplam bakteri yükü üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır (Ng ve ark., 2009).

Çalışmamızda da bazı çalışmalarda benzer olarak sinamik asitin klasik sayım yoluyla katı besiyerlerinde üreyebilen canlı sayımları üzerinde bir etkisinin olmadığı görülmekle birlikte bu durumun ileriki çalışmalarda daha çok detaylandırılmaya ihtiyacı vardır. Çünkü klasik yöntemle ortamda tespit edilebilen bakteri miktarının gerçekteki bakteri miktarından çok daha düşük olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda su ortamında izole edilebilir bakteri miktarının gerçek miktarın %1 ini geçemediği ifade edilmiştir (Amann ve ark., 1995). Ayrıca sinamik asit oranı arttıkça bağırsak florasındaki *B.subtilis* bakterisinin yerleşme oranının artması sinamik asitin klasik yöntemle tespit edilemeyen bazı bakteriler üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğunu ve böylece *B.subtilis*'in bağırsak ortamındaki mücadelede diğer bakterilere karşı daha etkili olduğunu kanıtlar niteliktedir. Çünkü doktora tezi kapsamında yaptığımız *in vitro* çalışmalarda sinamik asitin alabalık bağırsak izolatlarından *Aeromonas sobria* SY-AS3 ve *Shewanella baltica*, SY-S145 ile bağırsak izolatı olmasada alabalıklarla ilişkili *Flavobacterium spartansii* SY-FS1, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 ve *Yersinia ruckeri*, E42 üzerine sinamik asitin orta derecede inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle *A. sobria*, *A.salmonicida* *Shewanella* spp., ve *Flavobacterium* spp., türlerinin alabalık bağırsak florasında bulunan baskın türlerden oldukları bilinmektedir (Spanggaard ve ark., 2000; Kim ve ark., 2007). Bu noktada sinamik asit veya sinamik asit+ *B.subtilis* içerikli yemlerle beslenen balıkların bağırsaklardaki toplam canlı sayımları değişmesede tür bazında bakteri popülasyonlarının değişim göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Denemelerde değerlendirilen bir diğer kriter ise yem, bağırsak ve mide pH değerleridir. Sinamik asit ilavesi yem pH değerini kontrole göre %0,025 için 0,02, %0,050 için 0,07, %0,075 için 0,13 ve %0,150 için 0,14 olarak azaltmıştır. Probiyotikli yemlerde ise kontrol grubuna göre %0,025 sin+B. *subtilis* için 0,04, %0,050 sin+ *B. subtilis* için 0,07, %0,75 sin+B. *subtilis* için 0,15 ve %0,150 sin+B. *subtilis* için 0,16

olarak azaltmıştır. Mide ve bağırsak pH değerlerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir değişim görülmemiştir. Gökkuşuğu alabalıklarında yapılan farklı bir çalışmada iki farklı büyüklükteki balıklarda (~10 ve 200 g) yeme %5 asetik asit, %1 ve %3,5 sitrik asit ve %5 hidroklorik asit ilave etmişler ve başlangıç yem pH sın (5,7) sırasıyla 1,00, 0,9 ve 2,2 ve 1,7 birim azattığı bulunmuş ancak çalışmamızla benzer olarak bağırsak ve mide pH larında kontrole göre önemli bir değişim olmadığı bulunmuştur (Sugiura ve ark., 2006). Organik asit ilavesiyle azalması beklenen mide veya özellikle bağırsak pH değerlerinin büyük bir ihtimalle balık tarafından tamponlama mekanizmaları ile normal değerlerde tutulduğu söylenebilir. Ayrıca yine gökkuşuğu alabalıklarında yapılan farklı bir çalışmada yeme 4 ve 10 mL/kg formik asit ilave edilmiş ve yem pH değerinin kontrolde 6,3 ten sırasıyla 5,8 ve 5,3 değerlerine düştüğü görülmüş, ancak bağırsak pH larının önemli oranda arttığı tespit edilmiştir (Vielma ve Lall 1997). Bu durum balığın safra kesesinden nötürleme ajanlarını salgılamasıyla açıklanmıştır. Ancak, bu durum safra kesesi motilitesine etki etmekte (Aldman ve ark., 1992) ve asidik yemlerle beslenen yüksek bağırsak pH değerine sahip balıklarda hidroklorik asit ve safra suyu salgılarındaki değişimlere neden olmaktadır (Vielma ve Lall 1997). Bu nedenle çalışmalarda organik asit ilavesinin bağırsak ve mide pH değerleri üzerine etkileri önemlidir. Çalışmamızda sinamik asit veya sinamik asit+*B.subtilis*' bağırsak ve mide pH değerleri üzerinde herhangi bir negatif etkisinin olmadığı ayrıca safra somatik indeksin (SSI) deneme gruplarında (Deneme 1.1. ve Deneme 2.1) benzer olduğu görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında sinamik asit, *B.subtilis* ve sinamik asit+*B.subtilis* ilaveleriyle kurulan denemelerde bazı sindirim enzimlerinde değişim olduğu görülmüştür. Tripsin proteinlerin (Tietz, 1986), amilaz karbohidratların (Furne ve ark., 2005), lipaz yağların (Borlongan, 1990) sindiriminde görevlidir. Ayrıca alkalen fosfataz bağırsak hücre duvarları boyunca yağ ve karbohidratların absorpsiyonu ve taşınmasıyla ilişkilidir (Fraisse ve ark., 1981). Midenin mide bezleri tarafından salgılanan başlıca proteazlardan biri olan pepsin enzimi protein sindirimini başlatmaktadır (Lauff ve Hofer 1984). Balıkların yemdeki besinleri kullanımı sindirim enzimlerinin farklı organlardaki aktivitelerine bağlıdır. Bu çalışmada sinamik asit+*B.subtilis* ve *B.subtilis* ilavesi ile birlikte amilaz miktarında artış olduğu (%0,150 sin grubu hariç) diğer bağırsak ve mide enzimlerinin kontrol grubuna göre değişim göstermediği tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda *Bacillus* içerikli probiyotik katkıların balıklarda bağırsak enzimleri üzerine etkilerine bakılacak olursa; sazan balıklarından (*Cyprinus carpio*) izole edilen *Bacillus* sp.'nin su mercimeğinin (*Lemna polyrhiza*) fermentasyonu aşamasında yüksek oranda

ekstrasellüler amilolitik, sellüloolitik, proteolitik ve lipolitik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir (Bairagi ve ark., 2002). Diğer bir çalışmada ise *Bacillus subtilis* + *Lactococcus lactis*, *L. lactis* ve *Saccharomyces cerevisiae*, *B. subtilis* ve *S. cerevisiae* ve *B. subtilis*, *L. lactis* + *S. cerevisiae* probiyotik karışımları rohu (*Labeo rohita*) balıklarının yemlerine  $10^{11}$  cfu  $kg^{-1}$  ( $10^7$  cfu  $g^{-1}$ ) olarak ilave edilmiş; proteaz ve lipaz aktivitelerinde kontrole göre önemli oranda artış olurken, balıklar kontrole göre daha iyi büyümüşlerdir (Mohapatra ve ark., 2012). Çalışmamıza benzer olarak *Labeo rohita* balıklarının yemine *Leucaena* ile birlikte *B.subtilis* ilave edildiğinde *B.subtilis* ilave edilmeyen gruba oranla amilaz miktarında önemli bir artış olduğu ve balıkların daha iyi geliştiği görülmüştür (Bairagi ve ark., 2004). Ancak çalışmamızda amilaz miktarındaki artış balık büyümesinde değişime neden olmamıştır. Bunun nedeni özellikle etçil bir balık olan gökkuşuğu alabalığının karbohidrat değerlendirme oranının çok düşük olmasıyla açıklanabilir.

Organik asitlerin mide-bağırsak enzimleri üzerine etkilerine bakacak olursak karides (*Litopenaeus vannamei*) yemlerine farklı oranlarda sitrik asit (%0,1-%0,5) ilave edilmiş ve %0,2 oranında sitrik asit ile beslendiklerinde bağırsak proteaz aktivitesinde artış gözlemlenirken, amilaz aktivitesinde değişim olmamıştır (Su ve ark., 2014). Farklı bir çalışmada *Sciaenops ocellatus* balıklarının yemlerine kalsiyum laktat (%1 ve %3), sitrik asit (%0,75 ve %1,5) ve potasyum diformat (%0,75 ve %1,5) ilave edilmiş ve midede pepsin ile bağırsakta amilaz, lipaz, alkalen fosfataz, lösin aminopeptidaz ve asit fosfataz enzim aktiviteleri incelenmiştir (Castillo ve ark., 2014). Çalışmada pepsin aktivitesini %0,75 potasyum diformat, tripsin aktivitesini %1,5 sitrik asit ve %0,75 potasyum diformat, lipaz aktivitesini %0,75 ve %1,5 sitrik asit, alkalen fosfataz aktivitesini ise %1,5 sitrik asit ilavesi arttırmıştır. Yapılan çalışmada amilaz aktivitesi gruplar arasında değişim göstermemiştir. Farklı bir çalışmada *in vitro* ortamda tripsin aktivitesi sodyum asetat (60 mM) ve sodyum propionat (>5 mM, 40 mM hariç) artış gösterirken sodyum laktat (>60 mM) ve sodyum sitrat (>40 mM) tripsin aktivitesini azaltmış, sodyum format, sodyum bütirat, sodyum fumarat, sodyum sukkinat ve sodyum sitrat ise tripsin aktivitesine hiçbir konsatrasyonda (0-100 mM) etki etmemiştir (Silva ve ark., 2016). Ancak araştırmacılar, *in vitro* sindirim enzim aktivitesi ile büyüme performans sonuçları arasında tam bir ilişki kuramamışlardır. Büyüme denemesinin sonunda karideslerin ağırlık artışları sodyum fumarat, sodyum sukkinat, sodyum bütirat ve sodyum propionat için kontrole göre sırasıyla %53, %46, %38 ve %29 artmıştır (Silva ve ark., 2016). Yapılan bu çalışmalarda organik asit ilavesi sonucunda sindirim enzimlerindeki değişimlerin özellikle balık veya karides türüne, organik asit çeşidine ve dozuna göre önemli farklılıklar gösterdiği görülmüştür.

Önemli olan çalışmalar sonucunda enzimlerdeki değişimlerin balıkların büyüme performansını veya diğer sağlık karakteristiklerini değiştirmemesidir. Çalışmamızda da sinamik asit ilave edilen yemlerle beslenen balıklarda (%0,150 sin grubu hariç) alkalen fosfataz miktarında azalma, %0,075 sin grubunda ise mide pepsin enzimi miktarında önemli artış tespit edilmiştir. Midede pepsin artışı özellikle protein sindiriminin artacağına bir göstergesi olmakla birlikte çalışmamızda deneme gruplarının balıkların büyüme performansına herhangi bir etki olmamıştır. İnsan kolon (kalın bağırsak) tümör hücreleri (Caco-2) 8 mM konsantrasyonunda sinamik asite maruz bırakıldığında hücrelerin alkalen fosfataz aktivitesi önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (Ekmekcioglu ve ark., 1998). Çalışmamızda da elde edilen bulguların benzer olduğu görülmekle birlikte mekanizmaların açıklanabilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Visserosomatik indeks (VSI), hepatosomatik indeks (HSI), iç organ yağı indeksi (İOYİ), safra somatik indeksi (SSI), dalak somatik indeksi (DSİ) ve kalp somatik indeksi (KSI) balıklarda iç organ indeksleri olup, bu indekslerdeki değişimler çalışma kapsamında değerlendirilen bir diğer kriterdir. Organların vücuda olan oranlarıyla elde edilen indeksler bize balıkların sağlık durumları hakkında bilgi verebilmektedir. Bu çalışmada sadece sinamik asit içerikli yemlerle beslenen balıkların iç organ indekslerinde ve karaciğer yağında herhangi bir değişim gözlemlenmezken, dalak somatik indeks (DSİ) oranının %0,150 sin+B.subtilis yüksek olduğu olduğu bulunmuştur. Balıklarda dalak ağırlığındaki artış genellikle hastalık dönemlerinde meydana gelmekle birlikte bu durum deneme süresince herhangi bir hastalık belirtisi ve balık ölümü gözlemlenmediğinden çok açık bir izah değildir. Ancak farklı hipotezler kurulabilir. Çalışmamızın Deneme 1.1 olan kısmında hematolojik veya bağışıklık parametreleriyle ilgili bir değerlendirme olmamakla birlikte aynı deneme kurgusundaki Deneme 1.2 de hematolojik parametrelerde %0,150 sin+B.subtilis grubu ile kontrol grubu arasında bir fark olmaması %0,150 sin+B.subtilis grubunun dalaktaki kırmızı kan hücre depolanmasını arttıracığı hipotezi kabul edilemez gözükmemektedir. Bir diğer hipotez ise bağışıklık arttırıcı etkilerle ilgili kurulabilir. Bağışıklık arttırıcıların veya antioksidan katkıların dalak ağırlığını arttırabildiği ile ilgili çalışmalar bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2016). Bu nedenle hematolojik parametrelerde negatif etki olmadan artan dalak ağırlığı yabancı antijenlere (sinamik asit) karşı makrofaj miktarındaki artışla açıklanabilir. Bununla birlikte tavuk yemlerine B.subtilis + B.licheniformis (Bioplus 2B®) ilave edilmiş ve DSİ in değişmediği, ancak Bioplus 2B® + Protoxin ile birlikte ilave edildiğinde ise DSİ miktarının arttığı görülmüştür (Fallah ve ark., 2013). Benzer olarak yeme sadece B.subtilis (10<sup>8</sup>) ilavesi tavuklarda DSİ miktarında

herhangi bir değişime neden olmamıştır (Sharafat ve ark., 2015). Çalışmamıza benzer olarak elde edilen bu sonuçlar tek başına DSİ üzerinde etki göstermeyen probiyotiğın ikinci bir katkı ile beraber DSİ miktarını arttırabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda kalp somatik indeksin (KSİ) %0,075 sin+B.subtilis grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Kalp ağırlığındaki azalma genellikle kan akış hızıyla ilişkili olup (Walter ve Addis 1939), balıklardaki etkisi tam olarak izah edilememekle birlikte kalp koruyucu katkıların farelerde kalp ağırlığında azalma sağladığı bildirilmiştir (Kubo ve ark., 2005). Ancak balıklarda elde ettiğimiz bulgunun doza bağlı olmadan sadece tek bir grupta etki göstermesi tam olarak açıklanamamaktadır. Bu nedenle daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Farklı organik asit katkılarının balıkların organ indeksleri üzerindeki etkilerine bakacak olursak, *Sciaenops ocellatus* balıklarının yemlerine kalsiyum laktat (%1 ve %3), sitrik asit (%0,75 ve %1,5) ve potasyum diformat (%0,75 ve %1,5) ilave edilmiş ve çalışmamızla benzer olarak İOYİ ve HSI organik asit ilaveli gruplarda benzer bulunmuştur (Castillo ve ark., 2014). Farklı bir çalışmada hibrit tilapia balıklarının yemine %0,1-0,3 oranlarında organik asit karışımı ve %0,2 potasyum diformat ilave edilmiş, iç organ indekslerinden HSI ve VSI nin tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür (Ng ve ark., 2009). Yine hibrit tilapia balıklarında yapılan farklı bir çalışmada balıkların yemine %0,5 ve %1 oranlarında organik asit karışımı ilave etmişler ve HSI, VSI ve İOYİ indekslerinin gruplar arasında benzer olduğunu tespit etmişlerdir (Koh ve ark., 2016). Ot sazanı (*Ctenopharyngodon idellus*) yemlerine %0,5-%3 oranında sodyum bütirat (Liu ve ark., 2016), hibrit tilapia yemlerine ise %1-%4 oranlarında sodyum sitrat ilavesinin HSI ve VSI üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Romano ve ark., 2016). Yapılan çalışmalara baktığımızda balık yemlerine organik asit ilavesinin genelde iç organ indeksleri üzerinde herhangi bir değişime neden olmadığı görülmektedir.

Serum biyokimyası parametreleri çalışma kapsamında sinnamik asit, *B.subtilis* ve sinnamik asit+B.subtilis in balıklar üzerindeki etkilerini göstermede kullandığımız diğer kriterlerdir. Bu amaçla serum da trigliserit (TRİ), kolesterol (KOL), glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT), glutamik pürüvik transaminaz (GPT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve alkalin fosfat (ALP) miktarları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda analiz ettiğimiz serum TRİ, KOL ve enzimler için gökkuşuğı alabalıklarında bildirilen normal değerler TRİ için; 75,44-331 mg/dL, KOL için; 150-575 mg/dL, GOT için; 40,1-570 U/L, GPT için; 7-22,33 U/L, LDH için 250-1000 U/L ve ALP için 50-603,64 U/L olarak bildirilmiştir (Bowser, 1993; Sheikhzadeh ve ark., 2012;



Rudolph ve ark., 2012; Saei ve ark., 2016; Fazio ve ark., 2016). Bu çalışmada kan yağları ve enzimleri için elde ettiğimiz bulguların normal değerlerde olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada yeme sadece sinnamik asit ilavesinin trigliserit, ALP, LDH, GOT ve GPT miktarlarını önemli oranda azalttığı görülmüştür. *B.subtilis* ilavesi ile de yapılan denemede benzer sonuçlar alınmış ancak bu etkinin daha çok *B.subtilis* (GOT hariç) kaynaklı değil sinnamik asit kaynaklı olduğu görülmüştür. Gökkuşığı alabalıklarında (5,8 g) yapılan farklı bir çalışmada *B.subtilis*, *B.licheniformis* ve *B.subtilis* + *B.licheniformis* yemlere ayrı ayrı ilave edilmiş ve 8 haftalık besleme sonucunda tüm grupların GOT, GPT ve KOL seviyeri kontrol grubuyla benzer bulunmuştur (Park ve ark., 2016). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar GPT ve KOL açısından benzerlik gösterirken, GOT değerinin kontrol+ *B.subtilis* ilaveli grupta kontrole göre daha düşük olması çalışmalarda kullanılan suş farklılığından (Park ve ark., 2016 da probiyotikler karides izolatıdır), balık büyüklüklerinin, yetiştiricilik şartlarındaki farklılıklardan ve yem kompozisyonlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz.

Lemaire ve ark. (1991) de yaptıkları çalışmada ticari yemlerle beslenen balıkların kan enzimlerinden GOT, GPT, LDH ve ALP nin doğal balıklardan daha yüksek olduklarını bulmuşlardır. Yetiştiricilik yoluyla üretilen ve doğadan yakalanan balıklar da yapılan farklı bir çalışmada kolesterolün, trigliseridin ve glikozun yetiştirilen balıklarda daha yüksek olduğu ve karaciğer hücrelerinde yağ kaynaklı hasarlar bildirilmiştir (Rakovac ve ark., 2005). Ayrıca balık yağı ile zengin yemlerle beslenen balıkların HSI miktarının, serum kolesterolünün ve serum toplam yağının arttığı ve yemdeki enerji oranıyla ve serum kolesterol veya trigliserit miktarının pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (Parpoura ve Alexis 2001; D'Agaro ve Lanari 2003). Ancak serum enzimlerindeki ve yağlarındaki azalışlar genel olarak yüksek enerjili ve besince zengin ticari yem kaynaklarının balıkların sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin azaldığının birer göstergesi olabilir (Yılmaz ve ark., 2016). Çalışmamızda bu noktada sinnamik asit içerikli gruplardan özellikle %0,075 sin grubunun TRİ, KOL, GOT, GPT ve LDH değerlerini kontrole göre azaltması balıkların sağlık durumunun iyileşmesi olarak yorumlanabilir. Gökkuşığı alabalıklarında yapılan farklı bir çalışmada araştırmacılar balık yemlerine %0,1 ve %0,2 oranlarında BioAcid Ultra® (organik asit karışımı) ilave etmişler ve 60 günlük besleme denemesi sonunda serum enzimlerinden GOT, GPT ve ALP ile serum yağlarından TRİ ve KOL seviyelerinin organik asit ilavesiyle herhangi bir değişime uğramadığını tespit etmişlerdir (Saei ve ark., 2016). Bu noktada farklı organik asitlerin serum enzimleri ve yağları üzerinde farklı

etkilerinin olabileceği söylenebilir. Ancak bu alanda yapılan çalışma sayısının az olması verilerin farklı çalışmalarla karşılaştırılma oranını azaltmaktadır.

Bu çalışmada ayrıca alabalıklarda yeme farklı oranlarda ilave edilen sinnamik asit, *B. subtilis* ve sinnamik asit + probiyotik *B. subtilis*' in balığın antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenleri olan katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile toplam antioksidan kapasite (TAK) bu çalışmada değerlendirilmiştir. Sinnamik asit ilaveli gruplardan %0,150 sin grubu TAK miktarı, %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,075 sin grupları SOD enzim aktivitesi ise önemli oranda artmıştır. CAT enziminin deneme sonunda tüm gruplarda benzer olduğu görülmüştür.

Çalışmamıza benzer olarak gökkuşuğu alabalıklarında (113 g) yeme %0,4, 0,8, 1,2 ve 1,6 sitrik asit ilavesi ve 60 günlük besleme sonucunda serum SOD aktivitesinin %1,2 sitrik asit grubunda kontrole göre daha yüksek olduğu, ancak diğer asit içerikli grupların kontrole benzer olduğu bulunmuştur (Li ve ark., 2015). Aynı çalışmada toplam antioksidan kapasitesi sitrik asit ilavesiyle gruplar arasında değişim göstermemiştir. Çalışmalarda TAK ile diğer antioksidan enzim aktiviteleri arasında doğru orantılı bir değişim beklenilmemelidir. Çünkü TAK antioksidan defansın tüm radikallere karşı statik pontansiyelini göstermektedir (Chien ve ark., 2003). Farklı bir çalışmada karides (*Litopenaeus vannamei*) yemlerine farklı oranlarda sitrik asit (%0,1-%0,5) ilave edilmiş ve %0,2 oranından itibaren SOD aktivitesi kontrole göre önemli oranda artış göstermiştir (Su ve ark., 2014). Diğer yandan kedi balıklarında (*Pelteobagrus fulvidraco*) yapılan farklı bir çalışmada yeme organik asit karışımı (ACTIVATE®; fumarik ve benzoik vb.) %0,2 ve 0,4 oranlarında ilave edilmiş ve her iki dozda da serum SOD ve CAT aktiviteleri azalmıştır (Zhu ve ark., 2014). Araştırmacılar SOD ve CAT aktivitelerindeki azalmayla birlikte reaktif oksijen üretiminin de azaldığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise reaktif oksijen üretiminin tespitinde kullandığımız respiratöri burst aktivitesi ikinci denemede analiz edilmiş ve farklı denemede olsa 60. günün sonunda tüm sinnamik asit içerikli gruplarda kontrole göre yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak SOD ve CAT enzimlerindeki artışla birlikte respiratöri burst aktivitesinin de artacağı söylenebilir. Bu durum oksidatif stresin bir göstergesinden ziyade bağışık yanıtın sinnamik asit ilavesiyle uyarıldığına kanıt olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü bir çok çalışmada artan SOD ve CAT enzim aktiviteleri balıklarda bağışık yanıtın arttığının bir göstergesidir (Zhou ve ark., 2010; Park ve ark., 2016). Balıkların yem ile aldıkları sinnamik asiti antijen gibi görüp antioksidan salgılarının salınımını arttıran sistemi uyarmasıyla açıklanabilir.

Ancak diğ er denemede (Deneme 2.1.) probiyotik ilavesi ile birlikte elde edilen antioksidan sisten durumuyla ilgili sonuçlar değ iş miştir. Probiyotik ilavesi sonucunda TAK değerinin Kontrol+ *B.subtilis* ve %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre yüksek, SOD aktivitesinin Kontrol+*B.subtilis* grubu ve tüm sinnamik asit + *B.subtilis* içerikli gruplarda ve CAT aktivitesinin de %0,150 sin+*B.subtilis* grubu hariç tüm sinnamik asit içerikli deneme gruplarında kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızla benzer olarak ot sazanı (*Ctenopharyngodon idellus*) yemlerine *B.subtilis* ve suya *B.subtilis*+ *B.licheniformis* birlikte ilave edildiğinde serum SOD aktivitesinde azalma, TAK miktarında ise artma olduğu bildirilmiştir (Weifen ve ark., 2012). Ancak aynı probiyotik türü ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar alınabilmektedir. Örneğ in tilapia (*Oreochromis niloticus*) balıklarının yetiştirme suyuna *B.subtilis* ( $10^7$ /mL) ilave edildiğinde serum SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı, TAK miktarının ise değ iş mediğ i bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2010). Gökkuş aç ı alabalıklarında (5,8 g) yapılan farklı bir çalışmada *B.subtilis*, *B.licheniformis* ve *B.subtilis* + *B.licheniformis* yemlere ayrı ayrı ilave edilmiş ve 8 haftalık besleme denemesi sonucunda SOD aktivitesini *B.subtilis* ilavesi değ iş tirmezken *B.licheniformis* ilavesi arttırmıştır (Park ve ark., 2016). Alınan farklı sonuçların probiyotik bakterinin kullanılma şekli, balık büyüklüklerindeki veya balık türlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğ i düşünölmektedir.

Bu kısma kadar değerlendirilen Deneme 1.1., Deneme 2.1, Deneme 3 ve Deneme 4 elde ettiğ imiz bulgulardan ileriki büyüme performansı ve besin kompozisyonuna yönelik çalışmalarda sinnamik asitin %0,150 den daha yüksek dozları da ayrı veya *B.subtilis* ile birlikte denenebileceğ i sonucuna varılabilir. Çünkü sinnamik asitin %0,150 oranına kadar *B.subtilis* ile birlikte veya ayrı olarak balıkların büyüme performansına, yem tüketimine, besin kompozisyonuna, sindirim enzimlerine, iç organ indekslerine, bağ ırsak ve mide pH değerlerine, serum enzim ve yağlarına ve antioksidan kapasitesine herhangi bir olumsuz etkisi olmamıştır.

Çalışma kapsamında Deneme 1.2 ve Deneme 2.2 yeme ilave edilen sinnamik asit, *B.subtilis* ve sinnamik asit + *B.subtilis* katkılarının periyotik olarak (20 günde bir) balıkların genel sağ lık karakteristiklerine olan etkilerini tespit etmek amacıyla kurgulanmıştır. Ayrıca bu denemeler sonunda balıklar *Y. ruckeri* patojenine maruz bırakılmışlardır. Bu denemelerde çeşitli kan analizleri yapılmıştır. Balıklarda yaptığımız hematolojik, immunolojik ve serum biyokimya analizleri balıkların refah durumunun tespitinde kullanılan önemli parametrelerdir (Yılmaz ve ark., 2016). Bu çalışma kapsamında sinnamik asit, *B.subtilis* ve sinnamik asit + *B.subtilis* uygulamasının bu

bakteriye karşı balıklarda yaşama oranını arttırıp arttırmadığı da tespit edilmiştir. Sadece sinnamik asit içeren yemlerle beslenen balıklarda %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarının, *B.subtilis* ve sinnamik asit + *B.subtilis* uygulaması sonucunda ise tüm grupların kontrol grubuna göre *Y. ruckeri* bakterisine karşı yaşama oranını arttırdığı bulunmuştur. Farklı bir çalışmada organik asit (Mera™ Cid; propionik asit ve formik asit karışımı) ilaveli (%0,6) yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarında *Y. ruckeri* patojenine karşı yaşama oranlarında herhangi bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Jaafar ve ark., 2013). Balıklarda organik asit katkılarının hastalık direnci üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada sinnamik asitin ve sinnamik asit+*B.subtilis* in hastalık direncini arttırdığının bulunması literatür ve balık yetiştiricileri için önemli bir katkıdır. Probiyotik ilavesi ile *Y. ruckeri* patojenine karşı alabalıklarda yapılan çalışma sayısı nisbeten daha fazladır. Örneğin çalışmamıza benzer olarak balık yemlerine ilave edilen *Bacillus subtilis*+*Bacillus licheniformis* (Raida ve ark., 2003), *A. sobria* GC2 ve *B. subtilis* JB-1 (Abbass ve ark., 2010), *L. casei* ve *L. plantarum* (Andani ve ark., 2012), *Carnobacterium maltaromaticum* B26 ve *C. divergens* B33 (Kim ve Austin 2006a), *Bacillus* spp. JB-1, *A. sobria* GC2 (Brunt ve ark., 2007) ve *Enterobacter cloacae*, *B. mojavensis* (Capkin ve Altinok 2009) probiyotik bakterilerinin *Y. ruckeri* patojenine karşı direnç sağladığı bildirilmiştir.

Hematolojik parametreler balıkların stres veya hastalık durumlarının tespitinde kullanılan diğer önemli parametrelerdendir (Campbell, 2004). RBC, hematokrit, hemoglobin ve eritrosit indeksleri balıkların organ sağlık durumunun tespitinde kullanılmaktadır (Başusta, 2005). Gökkuşağı alabalıkları için hematolojik referans değerleri RBC için:  $0,74-4,45 \times 10^6 \text{mm}^{-3}$ , Hgb için: 6,2-11,5 g/dL, Hct için: %22,2-45, MCV için: 85,66-190,80 fL, MCH için: 23,16-68,06 pg ve MCHC için: %20-35,70 (Field ve ark., 1943; Bowser, 1993; Hassan ve ark., 2010; Fazio ve ark., 2016). Çalışmamızda elde ettiğimiz hematolojik bulguların literatürle benzer olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda 60 günlük besleme denemeleri süresince hematolojik parametrelerde ciddi bir değişim gözlemlenmemiştir. Ancak, *Y. ruckeri* ile enfekte edilen balıklarda deneme sonunda RBC ve hematokrit miktarının %0,05 sinnamik asit içeren grupta artış gösterdiği tespit edilmiştir. *B.subtilis* ilaveli gruplarda ise *Y. ruckeri* maruziyetinden sonra Kontrol+*B.subtilis* ve %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarının RBC miktarını, Kontrol+*B.subtilis* grubunun sadece hematokrit miktarını arttırdıkları bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda balıklarda immunostimulanların ilavesi ile hematolojik parametrelerde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Harikrishnan ve ark., 2012). Bu noktada Kontrol+*B.subtilis* ve

%0,025 sin+*B.subtilis* gruplarının bağıışıklık arttırıcı etkilerinin yanında hematolojik parametreleri de geliştirdiği söylenebilir.

Çalışmamızla benzer olarak gökkuşağı alabalıklarında yapılan farklı bir çalışmada araştırmacılar balık yemlerine %0,1 ve %0,2 oranlarında BioAcid Ultra® (organik asit karışımı) ilave etmişler ve 60 günlük besleme denemesi sonunda hematolojik parametrelerden RBC, Hct ve Hgb değerlerinde herhangi bir değerişim olmadığını tespit etmişlerdir (Saei ve ark., 2016). Çalışmamızla benzer diğer bir çalışmada *B.subtilis* PTCC 1720 ( $10^7$  /g) gökkuşağı alabalıklarının (60 g) yemine ilave edilmiş ve 60 günlük besleme denemesi sonunda hematolojik parametrelerden RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH ve MCHC'nin deneme grupları arasında değerişim göstermediği bulunmuştur (Kamgar ve Ghane 2014).

Denemeler süresince sinnamik asit, *B.subtilis* ve sinnamik asit + *B.subtilis* in immunolojik parametrelerle ilişkili beyaz kan hücre sayısı ve tipleri (lenfosit, granülosit ve monosit) ile spesifik olmayan immunolojik parametrelerden fagositik aktivite ve indeks, süperoksit anyon üretimi, respiratöri burst, lizozim, myeloperoksidaz (MPO), toplam antiproteaz,  $\alpha$ -1 antiproteaz aktiviteleri, toplam immunoglobulin (Ig) ve hemolitik komplement üzerine etkileri incelenmiştir. Balıklarda ayrıca toplam protein, albumin, globulin ve toplam globulin miktarlarındaki artış balıklarda gcl bir immun yanıt olduğunun bir göstergesidir (Wiegertjes, 1996; Al - Dohail ve ark., 2009). Deneme süresince sinnamik asit içeren grupların immunolojik parametrelerden sadece  $\alpha$ 1-antiproteaz aktivitesinde bir değerişime neden olmadığı görülmüştür. Diğer immunolojik parametrelerin sinnamik asit içerikli yemlerle beslenen gruplarda deneme süresi boyunca farklı rneklemeye dönemlerinde kontrole göre artış sağladığı tespit edilmiştir.

Organik asitlerin balıkların bağıışıklık parametrelerine veya ilişkili parametrelere olan etkilerine bakacak olursak gökkuşağı alabalığı yemlerine %0,1 ve %0,2 oranlarında BioAcid Ultra® (organik asit karışımı) ilavesi 60 günlük besleme denemesi sonunda toplam protein, lenfosit, nötrofil ve monosit oranlarında herhangi bir değerişime neden olmazken WBC (beyaz kan hücre sayısı), albumin ve globulin miktarlarını arttırmıştır (Saei ve ark., 2016). Çalışmamızda ise sinnamik asit ilavesi sonucunda tüm gruplarda beyaz kan hücre sayısı, serumda toplam protein, albumin ve globulin miktarları benzer bulunurken, %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında lenfosit miktarında azalma granülosit miktarında ise artış sağlanmıştır. alışmalar arasındaki değerişik sonuçların farklı organik asitlerin balıklar üzerindeki etki mekanizmalarındaki farklılıkları ile açıklanabilir. Çalışmamızda artan granülosit (fagositik hücreler) miktarı ile fagositik aktivite ve fagositik

indeks değerleri sinnamik asit içerikli gruplarda (%0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında) doğru orantılı olarak değişim göstermiştir.

Farklı bir çalışmada organik asit (Mera™ Cid; propionik asit ve formik asit karışımı) ilaveli (%0,6) yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarında 14. ve 45. günlerde serum lizozim miktarının kontrol grubuyla benzer olduğu bulunmuştur (Jaafar ve ark., 2013). Bizim alışmamızda da serum lizozim miktarının 40. günde sinnamik asit içerikli tüm gruplarda benzer olduğu, ancak 60. günde tüm sinnamik asit içerikli grupların kontrole göre önemli oranda lizozim aktivitesini arttırdıkları belirlenmiştir. Bu durum doza göre organik asitlerin bağışıklık yanıtındaki etki sürelerinin farklı olabileceğini kanıtlar niteliktedir.

*B.subtilis* ilavesi ile lizozim,  $\alpha$ 1-antiproteaz, toplam protein, albumin, globulin ve toplam Ig parametreleri bakımından deneme grupları arasında istatistiksel bir fark olamamıştır. Ancak diğer parametrelerde deneme gruplarının deneme süresi boyunca farklı örnekleme dönemlerinde kontrole göre artış sağladığı tespit edilse de bu artışın genel olarak *B.subtilis* ilavesi ile değil sinnamik asit ile ilişkili olduğu görölmektedir. Ancak *Y.ruckeri* bakterisine karşı yaşama oranını ve bu bakteriye karşı aglütinasyonu arttırması *B.subtilis* in moleküler düzeyde de immun sistemi uyardığının bir göstergesi olabilir. Örneğin gökkuşağı alabalığı yemlerine ilave edilen *B. subtilis* ( $10^9/g$ ), 45 günlük besleme sonunda balıkların komplement aktivitesini arttırdığı, süper oksit anyon üretimini etkilemediği ve bağışık yanıtla ilgili sitokinlerden (TGF)- $\beta$  'i indüklediği bildirilmiştir (Panigrahi ve ark., 2007). Yine alabalıklarda yapılan bir çalışmada yeme ilave edilen *B. subtilis* AB1 izolatının 14 günlük beslemeden sonra komplement aktivitesini arttırmadığı, lizozim, toplam antiproteaz,  $\alpha$ 1-antiproteaz, peroksidaz ve respiratöri burst aktivitelerini arttırdığı bulunmuştur (Newaj - Fyzul ve ark., 2007). Yine 14 günlük besleme denemesinin yapıldığı bir çalışmada gökkuşağı alabalığı (12 g) yemlerine *Bacillus* spp. JB-1 ( $2 \times 10^8/g$ ) ilave edilmiş ve anti-proteaz aktivitesi ve lökosit miktarında değişim olmazken serum toplam protein, fagositik öldürme kapasitesi ve serum lizozim aktivitesi artmıştır (Brunt ve ark., 2007). Bizim alışmamızda ise tek başına *B.subtilis* ilavesinin (Kontrol+*B.subtilis*) 20. günde fagositik indeksi, 60. günde toplam antiproteaz aktivitesini ve 80. günde fagositik aktivite ve süper oksit anyon üretimini arttırmış olduğu diğer parametreler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görölmektedir. Aynı balık türünde aynı probiyotik bakterinin farklı etkileri kullanılan suş farklılığından veya zamana bağlı etkilerin farklı olabileceğinden kaynaklandığı düşünceindeyiz. Ayrıca elde edilen

bulgulara bakıldığında *Y. ruckeri* ile infekte edilen balıkların 20 gün süreyle (80. gün) daha probiyotik ilaveli yemleri yemeleriyle birlikte daha sağlıklı oldukları söylenebilir.

Kortizol birincil olarak balıklarda stresin bir göstergesidir (Mazeaud ve ark., 1977). Genel olarak deneme grupları yapılan tüm denemelerde serum ve tüm balık kortizol düzeylerinde kontrole göre bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Bu durum yeme ilave edilen katkıların balıklarda bir strese neden olmadığına göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca *Y. ruckeri* ile infekte edilen balıkların 20 gün sonunda normal yaşamlarına döndükleri söylenebilir. Ayrıca bu çalışmada analiz edilen serum glikoz spesifik olmayan bir stres indikatörü olarak balık çalışmalarında kullanılmaktadır (Heath, 1995). Genel olarak deneme gruplarının normal deneme süresince serum glikoz düzeylerinde kontrole göre bir değişime neden olmadığı görülmüştür. Ancak *Y. ruckeri* ile infekte edilen balıklardan %0,075 ve %0,150 sinamik asit ile beslenenlerin serum glikoz düzeyleri kontrol ve diğer sinamik asit ile beslenen gruplardan istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Ancak *B.subtilis* ilavesinin ilavesi ile hiçbir örnekleme döneminde deneme grupları ile kontrol grubu arasında serum glikoz düzeyleri farklılık göstermemiştir. Bu durum sinamik asitin hipoglisemik etkisiyle açıklanabilir. Çünkü diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada sinamik asitin insülin salınımını arttırarak glikoz miktarını azalttığı bulunmuştur (Hafizur ve ark., 2015). Bu durumun normal deneme süresince değil *Y. ruckeri* ile infekte edilen balıklarda görülmesi sinamik asitin balıklarda glikoz metabolizmasının daha detaylı araştırılması gerektiğini göstermektedir. Çünkü farelerdeki çalışmada örnekleme ilk 3 saat içerisinde saatlik olarak yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında balıklardan kan örnekleri alınmadan önce balıklar 1 gün aç bırakıldığından glikoz miktarları normal deneme süresince değişmemiş olabilir. İleriki çalışmalarda balıklarda sinamik asitin kısa sürede serum glikoz düzeylerine etkisi araştırılabilir.

Kan pH değeri balık çalışmalarında kullanılabilen spesifik kan patolojisi parametresi olup balık türlerine göre normal değerleri değişebilmektedir (Field ve ark., 1943). Gökkuşuğu alabalıkları için normal kan pH değerleri 7,28-7,6 aralığında bildirilmiştir (Field ve ark., 1943; Bowser, 1993). Bu çalışmada ise pH 7,04-7,38 aralığında bulunmuş ve düşük pH değerlerine özellikle sinamik asit içerikli gruplar neden olmuştur. Yüksek oranda sinamik asit içeren yemlerle beslenen balıkların kan pH miktarının 20. günde kontrol grubundan daha düşük olduğu görülmüştür. Bu duruma bakıldığında sinamik asitin yüksek dozda kan pH miktarını düşürücü etki yaptığını gösterse de devam eden normal örnekleme dönemlerinde bu etki görülmemiştir. Ancak, *Y. ruckeri* ile infekte edilen balıklarda kan pH değerinin %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrol ve %0,075 sin

gruplarına göre önemli oranda düşüş gösterdiği bulunmuştur. Normal dönemde balığın sınınamik asitin kanda pH düşürücü etkisine adapte olarak düşen pH miktarını tamponladığı ve devam eden günlerde kan pH miktarının normale döndüğü söylenebilir. Ancak hastalığa bağlı olarak balıklarda fizyolojik değişimlerin neden olduğu etkiyle birlikte, sınınamik asitin özellikle yaşama oranı yüksek olan gruplarda, kan pH değerini düşürmüş olması ileriki çalışmalarda araştırılması gereken bir konudur. Alabalıklarda yapılan bir çalışmada *Y. ruckeri* ile infekte olan balıkların kanında *Y. ruckeri* miktarı özellikle 2. günden sonra artış göstermiştir (Raida ve Buchmann 2008). Bu nedenle ileriki çalışmalarda kısa sürede sınınamik asitin kanda *Y. ruckeri* yoğunluğu üzerine etkileri araştırılabilir.

Proje kapsamında yapılan *in vitro* denemelerde sınınamik asitin 26 adet bakteri türü üzerinden sadece *Aeromonas sobria* SY-AS1 balık patojeni üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca alabalık bağırsak izolatlarından *Aeromonas sobria* SY-AS3 ve *Shewanella baltica*, SY-S145, bağırsaktan izole edilmemiş alabalık izolatu *Flavobacterium spartansii* SY-FS1 ve balık patojenlerinden *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Listonella anguillarum*, SY-L24 ve *Yersinia ruckeri*, E42 üzerine sınınamik asitin orta derecede inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalara baktığımızda sınınamik asitin *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter aerogenes* ve *Escherichia coli* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu bildirilmiştir (Nascimento ve ark., 2000). Ancak çalışmamızda farklı olarak *E. coli*'e karşı herhangi bir etkinin olmaması değerlendirilmede kabul edilen inhibisyon zon çapı ile ilişkilidir. Bizim çalışmamızda <12 mm olan zon çapları etkisiz olarak değerlendirilirken diğer çalışmada <7 mm (Nascimento ve ark., 2000) olarak değerlendirilmiştir. Farklı bir çalışmada sınınamik asitin MİK değeri hastane izolatlarından *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* ve *Vibrio parahemolyticus* için 1000 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) olarak *Klebsiella pneumoniae* için ise >1000 olarak tespit edilmiştir (Chang ve ark., 2001). Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda *E. coli* için MİK değeri pH nötürlemesiz grupta >1000 olarak tespit edilmiştir. Bu farklılığın suş farkından kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Balık patojenlerinden *E.tarda* (MTCC 2400), *A. salmonicida* (MTCC 1522) ve *A.hydrophila* (MTCC 646) üzerine sınınamik asitin antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada sırasıyla MİK değerleri 1040, 830 ve 1140 olarak bildirilmiştir (Prasad ve ark., 2014). Çalışmamızda iki farklı *E.tarda* izolatu için MİK değerleri >1000 olarak ve *A. salmonicida* için ise 1000 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda 1000 üzerindeki değerler için pH nötürlemesi yapıldığından *E.tarda* ile ilgili elde edilen sonuçlar diğer çalışmadan çok farklı gözükmemektedir. *A. salmonicida* için ise



diğer çalışmada daha düşük bulunan MİK değeri bakteri suşlarındaki farklılıktan veya seyreltmelerdeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Genel olarak baktığımızda sinnamik asitin çok güçlü bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı ancak tür bazında bazı türler üzerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterebildiği görülmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda test edilen türler arasında sinnamik asitin güçlü antimikrobiyal etkili olduğu herhangi bir bakteri türü bildirilmemiştir. Ancak çalışmamızda sinnamik asitin bazı bakteri türleri üzerinde güçlü etki ve orta dereceli etki gösterdiği bulunmuştur.

*B. subtilis* üs fazının balık patojenleri üzerindeki etkileriyle ilgili yapılan diğer çalışmalara baktığımızda *B. subtilis* UTM 126 probiyotik bakterisinin *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* ve *V. parahaemolyticus* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Balcazar ve Rojas-Luna 2007). Benzer bir çalışmada *B. subtilis* BT23 üs fazının *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* ve *V. damsela* bakterileri üzerinde antionistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Vaseeharan ve Ramasamy 2003). Ancak çalışmamızda *B. subtilis* üs fazının tek başına *L. anguillarum* üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni farklı suşların kullanılmış olmasıyla açıklanabilir. Bu hipotezi doğrular nitelikte olan farklı bir çalışmada *B. subtilis* BS üs fazının dört farklı *V. harveyi* (Thailand, Philippines, IFO 15634 ve LMG 4044) suşu üzerine antagonistik etkileri araştırılmış ve sadece *V. harveyi* LMG 4044 suşu üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Nakayama ve ark., 2009). Aynı çalışmada sıvı kültür inhibisyon testinde *B. subtilis* BS üs fazının IFO 15634 suşunun üremesini etkilemediği, ancak Thailand, Philippines ve LMG 4044 izolatlarının üremesini engellediği bulunmuştur. *B. subtilis* E20 üs fazının *Vibrio parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Lactococcus garvieae*, *Debaryomyces hansenii*, *Photobacteria damsela*, *Streptococcus sp.*, ve *Aeromonas hydrophila* patojenleri üzerine etkilerinin araştırıldığı farklı bir çalışmada disk difüzyon testi sonucunda sadece *A. hydrophila* üzerinde engelleyici etki tespit edilmiştir (Tseng ve ark., 2009). Çalışmamızda ise *B. subtilis* üs fazının *L. garvieae* ve *S. iniae* bakterilerinin üremesini engellediği bulunmuştur. Yapılan çalışmalara bakıldığında elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların farklı suşların kullanılmış olması yanı sıra engelleyici etkinin belirlenmesinde kullanılan farklı testlerden de kaynaklandığı düşünülmektedir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE ÖNERİLER

#### 5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada yeme ilave edilen sinnamik asit, *B. subtilis* veya *B. subtilis* + sinnamik asitin alabalıklarda büyüme performansına, besin kompozisyonuna, yağ asit kompozisyonuna, iç organ indekslerine, karaciğer yağına, bağırsak ve mide enzimlerine, bağışıklık parametrelerine, bağırsak mikrobiyotasına, antioksidan kapasitesine, kortizol seviyesine, hematolojik ve serum biyokimyasal parametrelere olan etkileri 6 farklı *in vivo* deneme ile araştırılmıştır. Ayrıca sinnamik asitin balık patojenleri ve alabalık bağırsak izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkileri ve *B. subtilis* üs fazı ile birlikte inhibe edici etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak:

❖ Yeme ilave edilen katkıların yavru balıklarda büyüme performansına, besin kompozisyonuna, kortizol miktarına ve hematolojik parametrelere herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.

❖ Genç alabalıklarda ise yeme ilave edilen sinnamik asit, *B. subtilis* veya *B. subtilis* + sinnamik asitin özellikle bağışıklık parametrelerinde, mide ve bağırsak enzimlerinde ve serumda karaciğer ile ilgili enzimlerde ve antioksidan kapasite üzerinde dozlara ve/veya zamana göre değişebilen olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

❖ Sinnamik asitin %0,075 sin grubunda mide de pepsin enziminin aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Ancak bağırsakta alkalen fosfataz aktivitesi %0,025 sin, %0,050 sin ve %0,075 sin gruplarında kontrol ve %0,150 sin grubuna göre azalmıştır.

❖ Sinnamik asitin %0,050 sin, %0,075 sin ve %0,150 sin gruplarında serum trigliserit seviyelerini azalttığı bulunmuştur. Ayrıca serum enzimlerinden GOT ve GPT miktarlarının %0,075 sin grubunda, LDH miktarının %0,050 sin, %0,075 sin ve %0,150 sin gruplarında ve ALP miktarının ise %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında kontrole göre azaldığı görülmüştür.

❖ Sinnamik asit içerikli %0,025 sin ve %0,050 sin gruplarında 40. ve 60. günlerde lenfosit yüzdesi önemli oranda azalmış ve granülosit yüzdesi artış göstermiştir (60. gün %0,025 sin hariç).

❖ Deneme sonunda fagositik aktivite %0,050 sin grubunda, fagositik indeks, süperoksit anyon, toplam Ig, toplam protein ve globulin %0,025 sin ve

%0,050 sin gruplarında artış göstermiştir. Respiratöri burst ve lizozim ise tüm sinnamik asit içerikli gruplarda artmıştır. MPO ise sadece %0,050 sin grubunda artmış ve toplam antiproteaz aktivitesi sadece %0,150 sin grubunda azalmıştır. Hemolitik komplement ise %0,050-0,150 gruplarında artmıştır.

❖ *B. subtilis* ilaveli deneme gruplarının etkisine baktığımızda *B. subtilis'* in üreyebilen toplam bakteri yükü içerisindeki yüzdeleri kontrol için %0, kontrol+ *B. subtilis* için %81,61, %0,025 sin+*B.subtilis* için %87,11, %0,050 sin+ *B. subtilis* için %97,67, %0,75 sin+*B. subtilis* için %93,14 ve %0,150 sin+*B. subtilis* için %96,50 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak sinnamik asit oranı arttıkça *B. subtilis* bakterilerinin bağırsak florasına yerleşme oranında arttığı ve %0,150 sin+*B. subtilis* grubunda Kontrol+ *B. subtilis* grubuna göre yaklaşık %15 daha fazla yerleştiği bulunmuştur.

❖ *B. subtilis* ile birlikte sinnamik asit (%0,025 - %0,075) ilavesi bağırsaklarda amilaz aktivitesini arttırmıştır.

❖ İç organ indekslerinden HSİ ve KSİ oranlarının %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda düşük ve DSİ oranının %0,150 sin+*B.subtilis* grubunda kontrole göre yüksek olduğu bulunmuştur.

❖ Deneme sonunda trigliserit miktarının %0,075 sin+*B.subtilis* ile %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında, GPT miktarının %0,075 sin+*B.subtilis* grubunda, GOT miktarının tüm gruplarda, LDH miktarının %0,075 sin+*B.subtilis* ve %0,150 sin+*B.subtilis* gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür.

❖ Deneme sonunda toplam antioksidan kapasite miktarının Kontrol+ *B.subtilis* ve %0,025 sin+*B.subtilis* gruplarında daha yüksek, SOD aktivitesinin Kontrol+*B.subtilis* grubu ve tüm sinnamik asit içerikli gruplarda, CAT aktivitesinin de %0,150 sin+*B.subtilis* grubu hariç tüm sinnamik asit içerikli deneme gruplarında kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur.

❖ Lenfosit yüzdesi sadece %0,150 sin+*B. subtilis* grubunda azalırken ve granülosit yüzdesi aynı grupta deneme sonunda artmıştır. Deneme sonuna baktığımızda fagositik aktivite sadece %0,025 sin+ *B. subtilis* ve fagositik indeks, süperoksit anyon ve respiratöri burst aktivitesi ise %0,025 sin+ *B. subtilis* ile %0,150 sin+ *B. subtilis* gruplarında artış göstermiştir. MPO aktivitesi ise deneme sonunda %0,050 sin+ *B. subtilis* ve %0,075 sin+ *B. subtilis* gruplarında artmıştır. Toplam antiproteaz aktivitesi Kontrol+ *B. subtilis*, %0,025 sin+ *B. subtilis* ve %0,150 sin+ *B. subtilis* gruplarında deneme sonunda artmıştır. Hemolitik

komplement ise %0,075 sin+ *B. subtilis* ve %0,150 sin+ *B. subtilis* gruplarında kontrole göre azalmıştır.

❖ Özellikle alabalık yemlerinde %0,025 veya %0,050 sinnamik asit gruplarının, *B. subtilis* grubunun veya tüm sinnamik asit (%0,025-0,150)+*B. subtilis* gruplarının kızıl ağız hastalığına karşı (*Y. ruckeri*) yaşama oranının arttığı bulunmuştur.

❖ Sonuç olarak sinnamik asit veya *B. subtilis*+sinnamik asit antibiyotiklere alternatif olarak kızıl ağız hastalığıyla mücadelede kullanılabilecek katkıları olarak gözükmektedir.

❖ *In vitro* deneme sonuçlarına baktığımızda 26 adet bakteri türü üzerinde sinnamik asitin sadece *A. sobria* SY-AS1 balık patojeni üzerinde güçlü inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca alabalık bağırsak izolatlarından *A. sobria* SY-AS3 ve *S. baltica*, SY-S145, bağırsaktan izole edilmemiş alabalık izolatu *F. spartansii* SY-FS1 ve balık patojenlerinden *A. salmonicida* ATCC 33658, *L. anguillarum*, SY-L24 ve *Y. ruckeri*, E42 üzerine sinnamik asitin orta derecede inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.

❖ Diğer bir *in vitro* denemede sinnamik asit, *B. subtilis* üs fazı veya *B. subtilis* üs fazı +sinnamik in balık patojenlerinin üremesi üzerindeki etkileri sıvı kültür inhibisyon testi ile belirlenmiş ve *B. subtilis* üs fazının tek başına *A. sobria*, SY-AS1, *E. tarda* SY-ED1, *L. garvieae*, SY-LG1 ve *S. iniae* ATCC 2917 patojenlerinin ürmesini engellediği bulunmuştur. Sinnamik asit (0,5 ve 1 mg/mL) ve sinnamik asit (0,5 ve 1 mg/mL) içeren *B. subtilis* üs fazının ise *A. sobria*, SY-AS1, *A. salmonicida*, ATCC 33658, *Citrobacter sp.*, SY-C10, *E. tarda* SY-ED1, *L. garvieae*, SY-LG1, *L. anguillarum*, SY-L24, *Y. ruckeri*, E42 ve *S. iniae* ATCC 2917 patojenlerinin ürmesini engellediği tespit edilmiştir.

❖ Sinnamik asit veya *B. subtilis*+sinnamik in bağışık yanıtı uyarıcı ve gökkuşığı alabalığının genel sağlık durumunu iyileştirici etkileri olduğu tespit edilmiştir.

## 5.2. Öneriler

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda aşağıdaki önerilerde bulunulabilir:

❖ Yeme ilave edilen Sinnamik asit, *B. subtilis* veya *B. subtilis* + sinnamik asitin yavru veya genç balıklarda büyüme performansı üzerinde etkili

olabilmesi için daha yüksek oranda probiyotik ilavesi ve farklı dozlarda sinnamik asit içerikleri yeni araştırmalarda denenebilir.

❖ Bununla birlikte çalışma sonuçlarına baktığımızda aynı dozlar kullanılarak daha uzun süreli denemeler de yürütülebileceği görülmektedir.

❖ Sinnamik asitin alabalık bağırsağında bulunan bazı bakteriler üzerinde orta dereceli inhibisyon göstermiş, ancak bu durum klasik sayım yönteminde tespit edilememiştir. İleriki çalışmalarda sinnamik asitin bağırsak florası üzerindeki etkisi daha kapsamlı moleküler teknikler ile incelenebilir gözükmetedir.

❖ Sinnamik asitin balık patojenlerinden *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Listonella anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olması ileride farklı balıklarda bu patojenlerin neden olduğu hastalıklarla mücadelede sinnamik asit yem katkısı olarak kullanılabilir.

❖ Ayrıca sinnamik asit bağışılık parametrelerini arttırdığından ileride gökkuşağı alabalıklarında farklı hastalıklarla mücadelede değerlendirilebilir.

❖ Bu çalışmada sinnamik asit balıklar üzerinde ilk defa denenmiş ve bağışıklık arttırıcı ve sağlık durumunu iyileştirici etkileri bir çok test ile tespit edilmiştir. İleriki çalışmalarda sinnamik asitin sitokinler üzerine etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Abbass A., Sharifuzzaman S.M., Austin B. 2010. Cellular Components Of Probiotics Control *Yersinia ruckeri* Infection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 33: 31-37.
- Adam B., Ardiçoğlu Y., 2001. Klinik Biyokimya Analiz Metotları 1. Baskı). Atlas Kitapçılık Ankara. 415 p.
- Adams D., Boopathy R. 2013. Use of Formic Acid to Control Vibriosis in Shrimp Aquaculture. Biologia, 68: 1017-1021.
- Adil S., Banday T., Bhat G.A., Mir M. S., Rehman M. 2010. Effect of Dietary Supplementation of Organic Acids on Performance Intestinal Histomorphology and Serum Biochemistry of Broiler Chicken. Veterinary Medicine International, 2010:7.
- Akhter N., Wu B., Memon A.M., Mohsin M. 2015. Probiotics and Prebiotics Associated with Aquaculture: a Review. Fish and Shellfish Immunology, 45: 733-741.
- Aldman G., Grove D., Holmgren S. 1992. Duodenal Acidification and Intra-Arterial Injection of CCK8 Increase Gallbladder Motility in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, 86: 20-25.
- Al - Dohail M. A., Hashim R., Aliyu - Paiko M. 2009. Effects of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* on the Growth Performance haematology Parameters and Immunoglobulin Concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822 Fingerling. Aquaculture Research, 40: 1642-1652.
- Alp M., Kocabağlı N., Kahraman R., Bostan K. 1999. Effects of Dietary Supplementation with Organic Acids and Zinc Bacitracin on Ileal Microflora pH and Performance in Broilers. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 235: 451-456.
- Alsop D.H., Wood C.M., 1997. The Interactive Effects of Feeding and Exercise on Oxygen Consumption Swimming Performance and Protein Usage in Juvenile Rainbow Trout. Journal of Experimental Biology, 200: 2337–2346.
- Altun S., Diler Ö. 1999. *Yersinia ruckeri* ile İnfekte Edilmiş Gökkuşadı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Hematolojik İncelemeler. Turk Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23: 301-309.
- Altun S., Onuk E.E., Ciftci A., Duman M., Büyükekiz A.G. 2013. Determination of Phenotypic Serotypic and Genetic Diversity and Antibiotyping of *Yersinia ruckeri* Isolated from Rainbow Trout. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19: 225-232.

- Aly S.M., Ahmed Y.A.G., Ghareeb A.A.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 and Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995 Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143–169.
- Andani H.R.R., Tukmechi A., Meshkini S., Sheikhzadeh N. 2012. Antagonistic Activity of two Potential Probiotic Bacteria from Fish Intestines and Investigation of their effects on Growth Performance and Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 728-734.
- Anderson D.P., 1974. *Fish Immunology* (Ed: Snieszko S.F. and Axelrod H.A.), T.F.H Publications W.Sylvania. 239 p.
- Anonim. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Antychowicz J., Kozinska A., 1993. Phagocytosis. In: Siwicki A.K., Anderson D.P. and Waluga J., Eds. *Disease Diagnosis and Prevention Methods*. FAO-project GCP/INT/JPA. IFI Olsztyn Poland. 89-93.
- AOAC 1998. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC Int., Gaithersburg MD.
- Arceci R.J., Hann I.M., Smith O.P., 2006. *Pediatric Hematology* 3rd Ed. Blackwell Publishing Massachusetts. 826 p.
- Arda M., 1985. *İmmunoloji Ankara Üniversitesi Basımevı Ankara*. 305 p.
- Arijo S., Brunt J., Chabrillón M., Díaz - Rosales P., Austin B. 2008. Subcellular Components of *Vibrio harveyi* and Probiotics Induce Immune Responses in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Against *V. harveyi*. *Journal of Fish Diseases*, 31: 579-590.
- Aubin J., Gatesoupe F. J., Labbé, L., Lebrun L. 2005. Trial of Probiotics to Prevent the Vertebral Column Compression Syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36: 758-767.
- Austin B., Austin D.A. 2007. *Bacterial Fish Pathogens*. Heidelberg, Germany: Springer.
- Babin P.J., Vernier J.M., 1989. Plasma Lipoproteins in Fish. *Journal of Lipid Research*, 30: 467-489.

- Bagheri T., Hedayati S.A., Yavari V., Alizade M., Farzanfar A. 2008. Growth Survival and Gut Microbial Load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry Given Diet Supplemented with Probiotic During the two Months of First Feeding. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8: 43-48.
- Bairagi A., Ghosh K.S., Sen S.K., Ray A.K. 2002. Duckweed (*Lemna polyrhiza*) Leaf Meal as a Source of Feedstuff in Formulated Diets for Rohu (*Labeo rohita* Ham.) Fingerlings after Fermentation with a Fish Intestinal Bacterium. Bioresource Technology, 85: 17-24.
- Bairagi A., Sarkar Ghosh K., Sen S.K., Ray A.K. 2004. Evaluation of the Nutritive Value of *Leucaena leucocephala* Leaf Meal Inoculated with fish Intestinal Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in Formulated Diets for Rohu *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings. Aquaculture Research, 35: 436-446.
- Balcazar J.L., Vendrell D., Blas I.D., Ruiz-Zarzuola I., Muzquiz J.L. 2004. Probiotics: a Tool for the Future of Fish and Shellfish Health Management. Journal of Aquaculture in the Tropics, 19:239–242.
- Balcazar J.L., Rojas–Luna T. 2007. Inhibitory Activity of Probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 Against *Vibrio* Species Confers Protection Against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Current Microbiology, 55: 409–412.
- Balfry S. K., and Higgs D. A. 2001. Influence of Dietary Lipid Composition on the Immune System and Disease Resistance of Finfish. Nutrition and Fish Health, 11:213-234.
- Banerjee S., Khatoon H., Shariff M., Yusoff F.M. 2010. Enhancement of *Penaeus monodon* Shrimp Postlarvae Growth and Survival Without Water Exchange using Marine *Bacillus pumilus* and Periphytic Microalgae. Fisheries Science, 763: 481-487.
- Barcellos L.J.G., Ritter F., Kreutz L.C., Quevedo R.M., da Silva L.B., Bedin A.C., Cericato L. 2007. Whole-body Cortisol Increases after Direct and Visual Contact with a Predator in Zebrafish *Danio rerio*. Aquaculture, 272: 774-778.
- Barroso J.B., Carreras A., Esteban F.J., Peinado M.A., Martínez-Lara E., Valderrama R., Lupiáñez J. A. 2000. Molecular and Kinetic Characterization and Cell Type Location of Inducible Nitric Oxide Synthase in Fish. American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 279: R650-R656.
- Baruah K., Pal A.K., Sahu N.P., Jain K.K., Mukherjee S.C., Debnath D. 2005. Dietary Protein Level Microbial Phytase Citric Acid and Their Interactions on Bone



- Mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) Juveniles. *Aquaculture Research*, 36: 803-812.
- Başusta G.A. 2005. Fish Hematology and Hematological Techniques. In: Karatas M (ed) *Research Techniques in Fish Biology* (in Turkish), 1st edn. Nobel Publications Ankara pp 275–300.
- Blaxhall P.C., Daisley K.W. 1973. Routine Hematological Methods for Use with Fish Blood. *Journal of Fish Biology*, 5:771-781.
- Blier P.U., Pelletier D., Dutil J.D. 1997. Does Aerobic Capacity Set a Limit on Fish Growth Rate?. *Reviews in Fisheries Science*, 5: 323-340.
- Bone Q., Moore R. 2008. *Biology of Fishes*. Taylor and Francis.
- Booth I.R., Stratford M. 2003. Acidulants and Low pH. In: Russell NJ Gould GW (eds) *Food Preservatives* pp. 25–47. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York.
- Borlongan I.G. 1990. Studies on the Digestive Lipases of Milkfish *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 89: 315-325.
- Bowden T.J., Butler R., Bricknell I.R., Ellis A.E. 1997 Serum Trypsin-Inhibitory Activity in Five Species of Farmed Fish. *Fish Shellfish Immunology*, 7: 377–385.
- Bowser P.R. 1993. Clinicalpathology of Salmonid Fishes. In: M. K. Stoskopf, ed. *Fish Medicine*. Saunders, Philadelphia. 327-332.
- Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Protein Utilizing the Principle of Dye- Protein Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brix O., 2002. The Physiology of Living in Water. In: Hart P.J.B. and Reynolds J.D., Ed. *Handbook of Fish Biology and Fisheries*. Blackwell Publishing. 71-96.
- Brown G.D., Netea M.G., 2007. *Immunology of Fungal Infections*. Springer Netherlands. 492 p.
- Brul S., Coote P. 1999. Preservative Agents in Foods: Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 1–17.
- 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., Hansen R., Jamieson D.J., Austin B. 2008. Proteomic Analysis of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Serum after Administration of Probiotics in Diets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121: 199-205.

- Brunt J., Newaj - Fyzul A., Austin B. 2007. The Development of Probiotics for the Control of Multiple Bacterial Diseases of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30: 573-579.
- Bui H.T.D., Khosravi S., Fournier V., Herault M., Lee K. J. 2014. Growth Performance Feed Utilization Innate Immunity Digestibility and Disease Resistance of Juvenile Red Seabream (*Pagrus major*) Fed Diets Supplemented with Protein Hydrolysates. *Aquaculture*, 418: 11-16.
- Burbank D.R., LaPatra S.E., Fornshell G., Cain K.D. 2012. Isolation of Bacterial Probiotic Candidates from the Gastrointestinal Tract of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and Screening for Inhibitory Activity Against *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 35: 809-816.
- Burbank D.R., Shah D.H., LaPatra S.E., Fornshell G., Cain K.D. 2011. Enhanced Resistance to Coldwater Disease Following Feeding of Probiotic Bacterial Strains to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 321: 185-190.
- Bureau D.P., Kaushik S.J., Cho C.Y., 2002. Bioenergetics. In: Halver J.E., Hardy R.W., Eds. *Fish Nutrition* 3rd ed. Academic Press. 1-59.
- Camejo G., Wallin B., Enojärvi M. 1998. Analysis of Oxidation and Antioxidants Using Microtiter Plates. In *Free Radical and Antioxidant Protocols*. (ed. D. Armstrong), *Methods in Molecular Biology* 108: 377-386.
- Campbell T.W. 2004. Clinical Chemistry of Fish and Amphibians. In: Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., DeNicola D., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A., Weiser G., (eds). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, 1st edn. Lippincott Williams and Wilkins Pennsylvania pp 499–517.
- Candan A., Karataş S., 2010. *Balık Sağlığı*. Kalmak Ofset, 328 pp.
- Capkin E., Altinok I. 2009. Effects of Dietary Probiotic Supplementations on Prevention/Treatment of Yersiniosis Disease. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1147-1153.
- Castillo S., Rosales M., Pohlenz C., Gatlin D.M. 2014. Effects of Organic Acids on Growth Performance and Digestive Enzyme Activities of Juvenile Red Drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 433: 6-12.
- Chaiyapechara S., Casten M.T., Hardy R.W., Dong F.M., 2003. Fish Performance Fillet Characteristics and Health Assessment Index of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed Diets Containing Adequate and High Concentrations of Lipid and Vitamin E. *Aquaculture*, 219: 715-738.

- Chamkha M., Garcia J.L., Labat M. 2001. Metabolism of Cinnamic Acids by Some Clostridiales and Emendation of the Descriptions of *Clostridium aerotolerans*, *Clostridium celerecrescens* and *Clostridium xylanolyticum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 2105-2111.
- Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C. 2001. Antibacterial Activity of Leaf Essential Oils and Their Constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. Journal of Ethnopharmacology, 77: 123-127.
- Cherrington C.A., Hinton M., Chopra I. 1990. Effect of Short - Chain Organic Acids on Macromolecular Synthesis in *Escherichia coli*. Journal of Applied Bacteriology, 68: 69-74.
- Cherrington C.A., Hinton M., Mead G.C., Chopra I. 1991. Organic Acids: Chemistry Antibacterial Activity and Practical Applications. Advances in Microbial Physiology, 32: 87-108.
- Chesley L.C., 1934. The Concentrations of Proteases Amylase and Lipase In Certain Marine Fishes. Biological Bulletin, 66: 133-144.
- Chien Y.H., Pan C.H., Hunter B. 2003. The Resistance to Physical Stresses by *Penaeus monodon* Juveniles fed Diets Supplemented with Astaxanthin. Aquaculture, 216: 177-191.
- Cho C.Y., Cowey C.B. 1991 Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In: Wilson R.P. (ed.) Handbook of Nutrient Requirements of Finfish. CRC Press Boca Raton pp. 131-143.
- Chong A.S., Hashim R., Chow-Yang L., Ali A.B. 2002. Partial Characterization and Activities of Proteases from the Digestive Tract of Discus Fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture, 203: 321-333.
- Choudhary D., Chandra D., Choudhary S., Kale R.K. 2001. Modulation of Glyoxalase Glutathione S-Transferase and Antioxidant Enzymes in the Liver Spleen and Erythrocytes of Mice by Dietary Administration of Fenugreek Seeds. Food and Chemical Toxicology, 39:989-997.
- Chuchird N., Rorkwiree P., Rairat T. 2015. Effect of Dietary Formic Acid and Astaxanthin on the Survival and Growth of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Their Resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. SpringerPlus 4: 1.
- Citarasu T. 2010. Herbal Biomedicines: a New Opportunity for Aquaculture Industry. Aquaculture International, 18: 403-414.
- CLSI 2005. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Proposed

- Guideline. CLSI document M42-P [ISBN 1-56238-576-3]. Clinical and Laboratory Standards Institute 940 West Valley Road Suite 1400: Wayne Pennsylvania 19087-1898 USA 2005.
- CLSI 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically 7th ed. Approved Standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne PA.
- Cummings J.H., Pomare E.W., Branch W.J., Naylor C.P.E., Macfarlane G.T., 1987. Short Chain Fatty Acids in Human Large Intestine Portal Hepatic and Venous Blood. *Gut*, 28: 1221-1227.
- Çelik E.Ş., Sağır Odabaşı S., Anıl Odabaşı D. 2006. Farklı Tür Balıklarda Hematolojik İndekslerin Referans Değerleri. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23:49-55.
- D'Agaro E., Lanari D. 2009. Effects of Dietary Energy Content on the Voluntary Feed Intake and Blood Parameters of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Italian Journal of Animal Science*, 2: 181-189.
- Dabrowski K., Guderley H. 2002. Intermediary Metabolism. In: Halver J.E., Hardy R.W., Eds. *Fish Nutrition* 3rd ed. Academic Press. 310-365.
- Daxboeck C., Davie P.S. 1986. Physiological Investigations of Marlin. In *Fish Physiology: Recent Advances*. Springer Netherlands, 50-70.
- De Wet L. 2005. Organic Acids as Performance Enhancers. *Aqua Feeds: Formulation and Beyond*, 2: 12-14.
- Defoirdt T., Boon N., Bossier P., Verstraete W. 2004. Disruption of Bacterial Quorum Sensing: an Unexplored Strategy to Fight Infections in Aquaculture. *Aquaculture*, 240: 69-88.
- Delbert M., Gatlin III., Peng Li T. 2007. Nucleotides. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 12: 193-209.
- Dias J., Alvarez M.J., Arzel J., Corraze G., Diez A., Bautista J.M., Kaushik S.J. 2005. Dietary Protein Source Affects Lipid Metabolism in the European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 142: 19-31.
- Dibner J.J., Buttin P. 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. *The Journal of Applied Poultry Research* 114, 453-463.
- Diker K.S., 2005. *İmmunoloji*. 2. Baskı, Medisan, Ankara. 304 p.

- Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H. 2000. AiiA an Enzyme that Inactivates the Acylhomoserine Lactone Quorum-Sensing Signal and Attenuates the Virulence of *Erwinia carotovora*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97: 3526-3531.
- Dong Y.H., Zhang X.F., Xu J.L., Zhang L.H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism Signal Interference. Applied and Environmental Microbiology, 70: 954-960.
- Drew M.D., Ogunkoya A.E., Janz D.M., Van Kessel A.G. 2007. Dietary Influence of Replacing Fish Meal and Oil with Canola Protein Concentrate and Vegetable Oils on Growth Performance Fatty Acid Composition and Organochlorine Residues in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 267: 260-268.
- Dunham R.A., 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches. CABI Publishing UK. 372 p.
- Ekmekcioglu C., Feyertag J., Marktl W. 1998. Cinnamic Acid Inhibits Proliferation and Modulates Brush Border Membrane Enzyme Activities in Caco-2 Cells. Cancer Letters, 128: 137-144.
- Elala N.M.A., Ragaa N.M. 2015. Eubiotic Effect of a Dietary Acidifier (Potassium Diformate) on the Health Status of Cultured *Oreochromis niloticus*. Journal of Advanced Research, 6: 621-629.
- EL - Dakar A.Y., Shalaby S.M., Saoud I.P. 2007. Assessing the Use of a Dietary Probiotic/Prebiotic as an Enhancer of Spinefoot Rabbitfish *Siganus rivulatus* Survival and Growth. Aquaculture Nutrition, 13: 407-412.
- EL - Haroun E.R., Goda A.S., Chowdhury K. 2006. Effect of Dietary Probiotic Biogen® Supplementation as a Growth Promoter on Growth Performance and Feed Utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Aquaculture Research, 37: 1473-1480.
- Ellis T., North B., Scott A.P., Bromage N.R., Porter M., Gadd D. 2002. The Relationships Between Stocking Density and Welfare in Farmed Rainbow Trout. Journal of Fish Biology, 61: 493-531.
- Ellis A.E. 1999. Immunity to Bacteria in Fish. Fish and Shellfish Immunology, 9: 291-308.
- Ellis A.E. 2001. Innate Host Defense Mechanisms of Fish Against Viruses and Bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25: 827-839.

- Ellis A.E. 1990. Serum Antiproteases in Fish. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Anderson D.P., Roberson B.S., van Muiswinkel W.B., eds. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven N.J: SOS:95–9.
- Evenhuis J.P., Wiens G.D., Wheeler P., Welch T.J., LaPatra S.E., Thorgaard G.H. 2014. Transfer of Serum and Cells from *Yersinia ruckeri* Vaccinated Doubled-Haploid Hot Creek Rainbow Trout into Outcross F1 Progeny Elucidates Mechanisms of Vaccine-Induced Protection. *Developmental and Comparative Immunology*, 44: 145-151.
- Eya J.C. Lovell R.T., 1998. Effects of Dietary Phosphorus on Resistance of Channel Catfish to *Edwardsiella ictaluri* Challenge. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10: 28–34.
- Fallah R., Saghafi M., Rezaei H., Parvar R. 2013. Effect of Bioplus 2B® and Protoxin Probiotics Supplementation on Growth Performance Small Intestinal Morphology and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *British Journal of Poultry Sciences*, 2: 11-15.
- Fange R., 1986. Physiology of Haemopoiesis. In: Nilsson S. and Holmgren S., Eds. Fish Physiology: Recent Advance. Groom Helm., London. 1–23.
- Fange R., 1992. Fish Blood Cells. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Farrel A.P., Eds. Fish Physiology: The Cardiovascular System Part B volume XII. Academic Press Inc., California. 2–46.
- FAO 2016. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Cowx, I. G. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 15 June 2005. [Cited 15 December 2016].
- Farzanfar A. 2006. The Use of Probiotics in Shrimp Aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 149-158.
- Fauconneau B. 1988. Partial Substitution of Protein by a Single Amino Acid or an Organic Acid in Rainbow Trout Diets. *Aquaculture*, 70: 97-106.
- Faulk C.K., Benninghoff A.D., Holt G.J. 2007. Ontogeny of the Gastrointestinal Tract and Selected Digestive Enzymes in Cobia (*Rachycentron canadum* L.). *Journal of Fish Biology*, 70: 567-583.
- Fazio F., Saoca C., Piccione G., Kesbiç, O.S., Acar Ü. 2016. Comparative Study of Some Hematological and Biochemical Parameters of Italian and Turkish Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16: 715-721.

- FEFANA 2014. Organic Acids in Animal Nutrition. European Association of Specialty Feed Ingredients and their Mixtures Working Group Organic Acids pp. 97. FEFANA Brussels Belgium.
- Fernandez I., Moyano F.J., Diaz M., Martinez T., 2001. Characterization of  $\alpha$ -Amylase Activity in Five Species of Mediterranean Sparid Fishes (Sparidae Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262:1–12.
- Fernandez M.A., Saenz M.T., Garcia M.D. 1998. Natural Products: Anti - Inflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 1183-1186.
- Field J.B., Elvehjem C.A., Juday C. 1943. A study of the Blood Constituents of Carp and Trout. *Journal of Biological Chemistry*, 148: 261-269.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Food U.S. 2010 Drug Administration Code of Federal Regulation; Title 21: Vol. 3.
- Fooks L.J., Gibson G.R. 2002. Probiotics as Modulators of the Gut Flora. *British Journal of Nutrition*, 88: 39-49.
- Fraisse M., Woo N.Y.S., Noaillac-Depeyre J., Murat J.C. 1981. Distribution Pattern of Digestive Enzyme Activities in the Intestine of the Catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and of the Carp (*Cyprinus carpio* L.) *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 70: 443-446.
- Francis G., Becker K. 2007. Plant Saponins. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 11: 178-192.
- Freese E., Sheu C.W., Galliers E. 1973. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature*, 241: 321-325.
- Freitag M. 2007. Organic Acids and Salts Promote Performance and Health in Animal Husbandry. In: Lückstädt C (ed) *Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance*. Nottingham University Press Nottingham, 1–11.
- Fukami K., Nishijima T., Ishida Y. 1997. Stimulative and Inhibitory Effects of Bacteria on the Growth of Microalgae. In *Live Food in Aquaculture*. Springer, Netherlands, 185-191.
- Furne M., Hidalgo M.C., Lopez A., Garcia-Gallego M., Morales A.E., Domezain A., Sanz A. 2005. Digestive Enzyme Activities in Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii* and

- Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, a Comparative Study. *Aquaculture*, 250: 391-398.
- Gao Y., Storebakken T., Shearer K.D., Penn M., Øverland M. 2011. Supplementation of Fishmeal and Plant Protein-Based Diets for Rainbow Trout with a Mixture of Sodium Formate and Butyrate. *Aquaculture*, 311: 233-240.
- Garcia L.C., Minghetti M., Navarro I., Tocher D.R., 2009. Molecular Cloning Tissue Expression and Regulation of Liver X Receptor (LXR) Transcription Factors of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 153: 81–88.
- Gatesoupe F.J. 1997. Siderophore Production and Probiotic Effect of *Vibrio* sp. Associated with Turbot Larvae *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*, 10: 239-246.
- Gatesoupe F.J. 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147–165.
- Gaw A., Murphy M.J., Cowan R.A., Shepherd M.J., 1999. *Clinical Biochemistry: An Illustrated Colour Text* 2nd Ed. Churchill Livingstone 165 p.
- German D.P., Horn M.H., Gawlicka A. 2004. Digestive Enzyme Activities in Herbivorous and Carnivorous Prickleback Fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic Dietary and Phylogenetic Effects. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 789-804.
- Geurden I., Coutteau P., Sorgeloos P., 1997. Effect of a Dietary Phospholipid Supplementation on Growth and Fatty Acid Composition of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Juveniles from Weaning Onwards. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16: 259-272.
- Giannenas I., Triantafyllou E., Stavrakakis S., Margaroni M., Mavridis S., Steiner T., Karagouni E. 2012. Assessment of Dietary Supplementation with Carvacrol or Thymol Containing Feed Additives on Performance Intestinal Microbiota and Antioxidant Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350: 26-32.
- Goosen N.J., Görgens J.F., De Wet L.F., Chenia H. 2011. Organic Acids as Potential Growth Promoters in the South African Abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*, 321: 245-251.
- Gorczynski R., Stanley J. 1999. *Clinical Immunology*. Landes Bioscience Texas. 403 p.
- Goth L. 1991. A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. *Clinica Chimica Acta*, 196: 143-151.



- Grigorakis K. 1999. Quality of Cultured and Wild Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). PhD (Doktora Tezi). University of Lincolnshire and Humberside.
- Grigorakis K. 2007. Compositional and Organoleptic Quality of Farmed and Wild Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Factors Affecting It: A Review. *Aquaculture*, 272: 55–75.
- Gunter G., Sulya L.L. Box B.E. 1961. Some Evolutionary Patterns in Fishes' Blood. *The Biological Bulletin*, 121: 302–306.
- Hadas E., Koven W., Sklan D. Tandler A. 2003. The Effect of Dietary Phosphatidylcholine on the Assimilation and Distribution of Ingested Free Oleic Acid 18:1n-9 in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Larvae. *Aquaculture*, 217: 577–588.
- Hadidi S., Glenney G.W., Welch T.J., Silverstein J.T., Wiens G.D. 2008. Spleen Size Predicts Resistance of Rainbow Trout to *Flavobacterium psychrophilum* Challenge. *The Journal of Immunology*, 180: 4156-4165.
- Hafizur R.M., Hameed A., Shukrana M., Raza S.A., Chishti S., Kabir N., Siddiqui R.A. 2015. Cinnamic Acid Exerts Anti-Diabetic Activity by Improving Glucose Tolerance *In Vivo* and by Stimulating Insulin Secretion *In Vitro*. *Phytomedicine*, 22: 297-300.
- Hang T.N.A. 2012. Effects of Dietary Oxidation Status and Vitamin E Level on Performance Fillet Quality and Robustness to Acute Stress in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). Master Thesis in Aquaculture Norwegian University of Life Sciences. Norveç.
- Hardy R.W., Barrows F.T. 2002. Diet Formulation and Manufacture. In: Halver J.E., Hardy R.W., Eds. *Fish Nutrition* 3rd ed. Academic Press. 506-600.
- Hardy R.W. 2002. Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. (eds C.D. Webster and C. Lim). CAB International 14: 184-202.
- Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.S. 2011. Impact of Plant Products on Innate and Adaptive Immune System of Cultured Finfish and Shellfish. *Aquaculture*, 317: 1-15.
- Harikrishnan R., Kim J.S., Balasundaram C., Heo M.S. 2012. Immunomodulatory Effects of Chitin and Chitosan Enriched Diets in *Epinephelus bruneus* Against *Vibrio alginolyticus* Infection. *Aquaculture*, 326: 46-52.
- Hart S.D., Bharadwaj A.S., Brown P.B. 2010. Soybean Lectins and Trypsin Inhibitors but not Oligosaccharides or the Interactions of Factors Impact Weight Gain of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 306: 310–314.

- Hassan M.D., Gholizadeh M., Saidi A.A. 2010. Study of Some Hematological and Biochemical Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry in Western Part of Mazandaran Province Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9: 185-198.
- Heath A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Lewis Publishers London.
- Heinsbroek S.E.M., Gordon S., 2007. Macrophages. In: Brown G.D., Netea M.G., Ed. Immunology of Fungal Infections. Springer Netherlands. 3-25.
- Hendricks J.D., 2002. Adventitious Toxins. In: Halver J.E., Hardy R.W., Eds. Fish Nutrition 3rd ed. Academic Press. 602-649.
- Hernandez A.J., Satoh S., Kiron V. 2012. Supplementation of Citric Acid and Amino Acid Chelated Trace Elements in Low - Fish Meal Diet for Rainbow Trout Affect Growth and Phosphorus Utilization. Journal of the World Aquaculture Society, 43: 688-696.
- Higgs D.A., Dong F.M. 2000. Lipids and Fatty Acids. In R.R. Stickney (Ed.), The Encyclopedia of Aquaculture. New York: John Wiley and Sons Inc., 1-20.
- Hoar W.S., Randall D.J., Iwama G., Nakanishi T. 1997. The Fish Immune System: Organism Pathogen and Environment. Academic Press, Vol. 15.
- Hofer R., Schiemer F. 1981. Proteolytic Activity in the Digestive Tract of Several Species of Fish with Different Feeding Habits. Oecologia, 48: 342-345.
- Holland M.C.H., Lambris J.D. 2002. The Complement System in Teleosts. Fish and Shellfish Immunology, 12: 399-420.
- Holyoak C.D., Stratford M., McMullin Z., Cole M.B., Crimmins K., Brown A.J., Coote P.J. 1996. Activity of the Plasma Membrane H (+)-ATPase and Optimal Glycolytic Flux are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3158-3164.
- Hoşsu B., Korkut A.Y., Fırat A. 2003. Balık Besleme ve Yem Teknolojileri 1 (Balık Besleme Fizyolojisi ve Kimyası) 3. Baskı. Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, 276 p.
- Hoyle I., Shaw, B.J., Handy R.D. 2007. Dietary Copper Exposure in the African Walking Catfish *Clarias gariepinus*: Transient Osmoregulatory Disturbances and Oxidative Stress. Aquatic Toxicology, 83: 62-72.
- Hong H.A., Cutting S.M. 2005. The use of Bacterial Spore Formers as Probiotics. FEMS microbiology reviews, 29: 813-835.
- Hrubec T.C., Smith S.A. 2010. Hematology of Fishes. In: Weiss D.J., Wardrop K.J., Eds. Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing 994-1003.

- Infante J.Z., Cahu C.L. 2001. Ontogeny of the Gastrointestinal Tract of Marine Fish Larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 130: 477-487.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. 2012. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press ISBN: 008088671X.
- Ishikawa M. 2007. Lipids. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 5: 64-73.
- Ivanovska N., Neychev H., Stefanova Z., Bankova V., Popov S. 1995. Influence of Cinnamic Acid on Lymphocyte Proliferation Cytokine Release and Klebsiella Infection in Mice. *Apidologie*, 26: 73-81.
- Iversen M., Finstad B., McKinley R.S., Eliassen R.A. 2003. The Efficacy of Metomidate Clove Oil AQUI-ST<sup>TM</sup> and Benzoak<sup>®</sup> as Anaesthetics in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Smolts and Their Potential Stress-Reducing Capacity. *Aquaculture*, 221: 549-566.
- İspir U., Şeker E., Sarıyüpoğlu M. 2004. *Yersinia ruckeri* ile İnfekte Edilen Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792) Oluşan İmmunolojik Değişimlerin Araştırılması. *FÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16: 393-400.
- Jaafar R.M., Kania P.W., Larsen A.H., Nielsen D.S., Fouz B., Browdy C., Buchmann K. 2013. Gut Microbiota Changes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), During Organic Acid Feed Supplementation and *Yersinia ruckeri* Infection. *Journal of Fish Diseases*, 36: 599-606.
- Janz D.M., Weber L.P. 2000. Endocrine System. In: Ostrander G.K., Ed. *The Laboratory Fish*. Academic Press London. 415–439.
- Jensen B.B. 2001. Possible Ways of Modifying Type and Amount of Products from Microbial Fermentation in the Gut. In: Black P Linberg K (eds) *Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press Nottingham, 181–200.
- Jiang H., Wang X. 2012. Time-Dependent Nanogel Aggregation for Naked-Eye Assays of  $\alpha$ -Amylase Activity. *Analyst*, 137: 2582-2587.
- Jobling M. 1996. *Environmental Biology of Fishes* 2nd Ed. Chapman and Hall London. 455 p.
- Jobling M., Gomes E., and Dias J. 2001. Feed Types Manufacture and Ingredients. *Food Intake in Fish* 1: 25-48.
- Jonas A. 2002. Lipoprotein Structure. In: Vance D.E. and Vance J.E., Eds. *Biochemistry Lipids Lipoproteins and Membranes*. 4th Ed. Elsevier Scienc B.V. 483-504.

- Kaattari S.L., Piganelli J.D. 1996. The Specific Immune Response: Humoral Defense. In: Iwama G. and Nakanishi T. Ed. The Fish Immune System: Organism Pathogen and Environment. Academic Press California. 207–254.
- Kamei Y., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T. 1988. Screening of Bacteria with Antiviral Activity From Fresh Water Salmonid Hatcheries. Microbiology and Immunology, 32: 67-73.
- Kamgar M., Ghane M. 2014. Studies on *Bacillus subtilis* as Potential Probiotics on the Hematological and Biochemical Parameters of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Applied and Environmental Microbiology, 2: 203-207.
- Karagül H., Altıntaş A., Fidancı U.R., Sel T., 2000. Klinik Biyokimya. 1. Baskı. Medisan Yayınevi. Ankara, 428 p.
- Karataş S., Candan A., Demircan D. 2004. Enteric Red Mouth Disease in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on The Black Sea Coast of Turkey. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 56: 226-231.
- Kawai T. 1996. Fish Flavor. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36: 257–298.
- Keogan M., Wallace E.M., O'Leary P. 2006. Concise Clinical Immunology for Healthcare Professionals. Routledge. Oxon. 426 p.
- Keyer K., Gort A.S., Imlay J.A., 1995. Superoxide and the Production of Oxidative DNA Damage. Journal of Bacteriology, 177: 6782–6790.
- Khouti Z., Simon J.P. 1997. Detection and Partial Characterization of a Bacteriocin Produced by *Carnobacterium piscicola* 213. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19: 28–33.
- Kim D.H., Austin B. 2006a. Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Induced by Probiotics. Fish and Shellfish Immunology, 21: 513-524.
- Kim D.H., Austin B. 2006b. Cytokine Expression in Leucocytes and Gut Cells of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum Induced by Probiotics. Veterinary Immunology and Immunopathology, 114: 297-304.
- Kim D.H., Brunt J., Austin B. 2007. Microbial Diversity of Intestinal Contents and Mucus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Microbiology, 102: 1654-1664.
- Klebanoff S.J. 1968. Myeloperoxidase-Halide-Hydrogen Peroxide Antibacterial System. Journal of Bacteriology, 95: 2131-2138.

- Kluge H., Broz J., Eder K. 2006. Effect of Benzoic Acid on Growth Performance Nutrient Digestibility Nitrogen Balance Gastrointestinal Microflora and Parameters of Microbial Metabolism in Piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 316-324.
- Koh C.B., Romano N., Zahrah A.S., Ng W.K. 2016. Effects of a Dietary Organic Acids Blend and Oxytetracycline on the Growth Nutrient Utilization and Total Cultivable Gut Microbiota of the Red Hybrid Tilapia *Oreochromis sp.*, and Resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*. 47: 357-369.
- Kongnum K., Hongpattarakere T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Digestive Tract of Wild Shrimp on Growth and Survival of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 170-177.
- Korkmaz A., Yaren H., Topal T., Oter S. 2006. Molecular Targets Against Mustard Toxicity: Implication of Cell Surface Receptors Peroxynitrite Production and PARP Activation. *Archives of Toxicology*, 80: 662-670.
- Krogdahl A., Hemre G.I., Mommsen T.P. 2005. Carbohydrates in Fish Nutrition: Digestion and Absorption in Postlarval Stages. *Aquaculture Nutrition*, 11: 103-122.
- Krogdahl A., Lea T.B., Olli J.J. 1994. Soybean Proteinase Inhibitors Affect Intestinal Trypsin Activities and Amino Acid Digestibilities in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 107: 215-219.
- Kroll R.G., Booth I.R. 1983. The Relationship Between Intracellular pH the pH Gradient and Potassium Transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 216: 709-716.
- Kubo K., Kiyose C., Ogino S., Saito M. 2005. Suppressive Effect of *Citrus aurantium* Against Body Fat Accumulation and its Safety. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 36: 11-17.
- Kumaran S., Deivasigamani B., Alagappan K.M., Sakthivel M. 2010. Infection and Immunization Trials of Asian Seabass (*Lates calcarifer*) Against Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Environmental Biology*, 31: 539-541.
- Kumari J., Sahoo P.K. 2006. Dietary Levamisole Modulates the Immune Response and Disease Resistance of Asian Catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 37: 500-509.
- Lambert R.J., Stratford M. 1999. Weak - Acid Preservatives: Modelling Microbial Inhibition and Response. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 157-164.

- Lara-Flores M., Aguirre-Guzman G. 2009. The use of Probiotic in Fish and Shrimp Aquaculture. A review. *Probiotics: Production Evaluation and Uses in Animal Feed. Research Signpost Kerala*, 75-89.
- Lategan M.J., Torpy F.R., Gibson L.F. 2004a. Control of Saprolegniosis in the Eel *Anguilla australis*, Richardson by Aeromonas Media Strain A199. *Aquaculture*, 240: 19-27.
- Lategan M.J., Torpy F.R., Gibson L.F. 2004b. Biocontrol of Saprolegniosis in Silver Perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell) by Aeromonas Media Strain A199. *Aquaculture* 235: 77-88.
- Lauff M., Hofer R. 1984 Proteolytic Enzymes in Fish Development and the Importance of Dietary Enzymes. *Aquaculture* 37: 335–346.
- Lauff R.F., Wood C.M., 1996. Respiratory Gas Exchange Nitrogenous Waste Excretion and Fuel Usage During Aerobic Swimming in Juvenile Rainbow Trout. *Journal of Comparative Physiology*, 166: 501–509.
- Laurence A., Chowdary P., Ancliff P. 2006. Disorders of Granulopoiesis and Granulocyte Function. In: Arceci R.J., Hann I.M., Smith O.P., Ed. *Pediatric Hematology* 3rd Ed. Blackwell Publishing Massachusetts. 305-339.
- Lemaire P., Draï P., Mathieu A., Lemaire S., Carriere S., Giudicelli J., Lafaurie M. 1991. Changes with Different Diets in Plasma Enzymes (GOT GPT LDH ALP) and Plasma Lipids (Cholesterol, Triglycerides) of Sea-Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 93: 63-75.
- Lewis Jr W.M., Morris D.P. 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: a Review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 183-195.
- Lewis S.M., Bain B.J., Bates I., Dacie J.V. 2006. *Dacie and Lewis practical haematology*. Elsevier Health Sciences.
- Li J.S., Li J.L., Wu T.T. 2009. Effects of Non - Starch Polysaccharides Enzyme Phytase and Citric Acid on Activities of Endogenous Digestive Enzymes of Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Aquaculture Nutrition*, 15: 415-420.
- Li J., Tan B., Mai K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus* OJ and Isomaltooligosaccharides Influence the Intestine Microbial Populations Immune Responses and Resistance to White Spot Syndrome Virus in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291: 35-40.
- Li X.Q., Cui W.O., Leng X.J. 2015. Citric Acid Substituted the Inclusion of Inorganic Phosphorus in Diet of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*,

- Lim C., Yıldırım - Aksoy M., Klesius P.H. 2009. Growth Response and Resistance to *Edwardsiella ictaluri* of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Fed Diets Containing Distiller's Dried Grains with Solubles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 182-193.
- Liu L., Hudgins W.R., Shack S., Yin M.Q., Samid D. 1995. Cinnamic Acid: a Natural Product with Potential use in Cancer Intervention. *International Journal of Cancer*, 62: 345-350.
- Liu M., Guo W., Wu F., Qu Q., Tan Q., Gong W. 2016. Dietary Supplementation of Sodium Butyrate may Benefit Growth Performance and Intestinal Function in Juvenile Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Research*.
- Liu W., Yang Y., Zhang J., Gatlin D.M., Ringø, E., Zhou Z. 2014. Effects of Dietary Microencapsulated Sodium Butyrate on Growth Intestinal Mucosal Morphology Immune Response and Adhesive Bacteria in Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*) Pre-Fed with or Without Oxidised Oil. *British Journal of Nutrition*, 112: 15-29.
- Luo Z., Liu Y., Mai K., Tian L., Liu D., Tan X., Lin H., 2005. Effect of Dietary Lipid Level on Growth Performance Feed Utilization and Body Composition of Grouper *Epinephelus coioides* Juveniles Fed Isonitrogenous Diets in Floating Netcages. *Aquaculture International*, 13: 257–269.
- MacArthur J.I., Fletcher T.C. 1985. Phagocytosis in Fish. In: Manning M.J., Tatner M.F. Eds. *Fish Immunology*. Academic Press London. 29– 46.
- Macfarlane S., Macfarlane G.T. 2003. Regulation of Short-Chain Fatty Acid Production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 67-72.
- MacIntyre C.M., Ellis T., North B.P., Turnbull J.F. 2008. The Influences of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: a Review. J. E. Branson (Ed. Blackwell Publishing Ltd Oxford. 150-184.
- Magnadóttir B. 2006. Innate Immunity of Fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20: 137–151.
- Magnadóttir B., Jónsdóttir H., Helgason S., Björnsson B., Jørgensen T.Ø., Pilström L. 1999. Humoral Immune Parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): I. The Effects of Environmental Temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 122: 173-180.

- Manning M.J., Nakanishi T. 1996. The Specific Immune System: Cellular Defenses. In: Iwama G., Nakanishi T., Ed. The Fish Immune System Organism Pathogen and Environment. Academic Press California. 160-205.
- Maoka T., Tanimoto F., Sano M., Tsurukawa K., Tsuno T., Tsujiwaki S., Takii K. 2008. Effects of Dietary Supplementation of Ferulic Acid and g-Oryzanol on Integument Color and Suppression of Oxidative Stress in Cultured Red Sea Bream *Pagrus major*. Journal of Oleo Science, 57: 133-137.
- Masella R., Benedetto R.D., Vari R., Filesi C., Giovannini C. 2005. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. Journal of Nutritional Biochemistry, 16: 577–586.
- Mayes P.A., Botham K.M. 2003a. Metabolism of Acylglycerols and Sphingolipids. In: Murray R.K. Granner D.K. Mayes P.A. Rodwell V.W., Eds. Harper's Illustrated Biochemistry 26th Ed. McGraw-Hill. 197-204.
- Mayes P.A., Botham K.M. 2003b. Cholesterol Synthesis Transport and Excretion In: Murray R.K. Granner D.K. Mayes P.A. Rodwell V.W., Eds. Harper's Illustrated Biochemistry 26th Ed. McGraw-Hill. 219-230.
- Mazeaud M.M., Mazeaud F., Donaldson E.M. 1977. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review. Transactions of the American Fisheries Society, 106: 201-212.
- McClelland G., Zwingelstein G., Weber J.-M., Brichon G. 1995. Lipid Composition of Tissue and Plasma in two Mediterranean Fishes the Gilt-head Sea Bream (*Chrysophrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52: 161–170.
- McDonald D.G., Milligan C.L., 1992. Chemical Properties of the Blood. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Farrel A.P., Eds. Fish Physiology: The Cardiovascular System Part B volume XII. Academic Press Inc., California. 56-113.
- McLoughlin M.F., Graham D.A. 2007. Alphavirus Infections in Salmonids—a Review. Journal of Fish Diseases 30: 511-531.
- Mehmetoğlu İ., 2007. Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul. 409 p.
- Meister A., Anderson M.E. 1983. Glutathione. Annual Review Biochem, 52: 11-760.
- Merrifield D.L., Bradley G., Baker R.T.M., Davies S.J. 2010d. Probiotic Applications for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on Growth Performance



- Feed Utilization Intestinal Microbiota and Related Health Criteria Postantibiotic Treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16: 496-503.
- Merrifield D.L., Burnard D., Bradley G., Davies S.J., Baker R. 2009. Microbial Community Diversity Associated with the Intestinal Mucosa of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 40: 1064-1072.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Bradley G., Baker R.T.M., Davies S.J. 2010a. Probiotic Applications for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on Growth Performance Feed Utilization Intestinal Microbiota and Related Health Criteria. *Aquaculture Nutrition*, 16: 504-510.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T., Børgwald J., Ringø, E. 2010c. The Current Status and Future Focus of Probiotic and Prebiotic Applications for Salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- Merrifield D.L., Harper G.M., Dimitroglou A., Ringø E., Davies S.J. 2010b. Possible Influence of Probiotic Adhesion to Intestinal Mucosa on the Activity and Morphology of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Enterocytes. *Aquaculture Research*, 41: 1268-1272.
- Message J.-L., Stéphan G., Quentel C., Laurencin B.F., 1992. Effects of Dietary Oxidized Fish Oil and Antioxidant Deficiency on Histopathology Haematology Tissue and Plasma Biochemistry of Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Living Resources*, 53: 205–214.
- Metzler B., Mosenthin R. 2007 Effects of Organic Acids on Growth Performance and Nutrient Digestibility in Pigs. In: Lückstädt C (ed) *Acidifiers in Animal Nutrition- A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance*. Nottingham University Press Nottingham. 39-54.
- Milano E.G., Basari F., Chimenti C. 1997. Adrenocortical and Adrenomedullary Homologs in Eight Species of Adult and Developing Teleosts: Morphology Histology and Immunohistochemistry. *General and Comparative Endocrinology*, 108: 483-496.
- McKnight I.M., 1966. A Hematological Study on the Mountain Whitefish, *Prosopium williamsoni*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 23: 45-64.
- Miller R.A., Walker R.D., Baya A., Clemens K., Coles M., Hawke J.P., Reimschuessel R. 2003. Antimicrobial Susceptibility Testing of Aquatic Bacteria: Quality Control Disk Diffusion Ranges for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida*

- subsp. *salmonicida* ATCC 33658 at 22 and 28 °C. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4318–4323.
- Mira L., Fernandez M.T., Santos M., Rocha R., Florencio M.H., Jennings K.R. 2002. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for Their Antioxidant Activity. *Free Radical Research*, 36: 1199–1208.
- Mohamed M.H., Refat N.A.G.A. 2011. Pathological Evaluation of Probiotic *Bacillus subtilis* Against *Flavobacterium columnare* in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*) Fish in Sharkia Governorate Egypt. *Journal of American Science*, 7: 244-256.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Kumar V., DeBoeck G., Mohanta K.N. 2013. Aquaculture and Stress Management: a Review of Probiotic Intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97: 405-430.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Prusty A.K., Das P., Paniprasad K., Mohanta K.N. 2012. Use of Different Microbial Probiotics in the Diet of Rohu *Labeo rohita* Fingerlings: Effects on Growth Nutrient Digestibility and Retention Digestive Enzyme Activities and Intestinal Microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18: 1-11.
- Molina L., Constantinescu F., Michel L., Reimmann C., Duffy B., Défago G. 2003. Degradation of Pathogen Quorum-Sensing Molecules by Soil Bacteria: a Preventive and Curative Biological Control Mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 45: 71-81.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W. 1999. Cortisol in Teleosts: Dynamics Mechanisms of Action and Metabolic Regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.
- Moon T.W., 2001. Glucose Intolerance in Teleost Fish: Fact or Fiction?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129: 243-249.
- Morais S., Cahu C., Zambonino-Infante J.L., Robin J., Rønnestad I., Dinis M.T., Conceição L.E.C. 2004. Dietary TAG Source and Level Affect Performance and Lipase Expression in Larval Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39: 449-458.
- Morgan J.D., Iwama G.K. 1997. Measurements of Stressed States in the Field. In: Iwama G.K.; Pickering A.D.; Sumpter J.P.; Schreck C.B., Eds. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press Cambridge. 247-270.
- Morken T., Kraugerud O.F., Barrows F.T., Sørensen M., Storebakken T., Øverland M. 2011. Sodium Diformate and Extrusion Temperature Affect Nutrient Digestibility

- and Physical Quality of Diets with Fish Meal and Barley Protein Concentrate for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317: 138-145.
- Mroz Z. 2005. Organic Acids as Potential Alternatives to Antibiotic Growth Promoters for Pigs. *Advances in Pork Production*, 16: 169-182.
- Munilla-Moran R., Stark J.R. 1990. Metabolism in Marine Flatfish—VI. Effect of Nutritional State on Digestion in Turbot *Scophthalmus maximus* (L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 95: 625-634.
- Murray K., Rodwell V., Bender D., Botham K.M., Weil P.A., Kennelly P.J. 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 28. 693 p.
- Nakagawa H. 2007. Chitin. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 10: 168-177.
- Nakagawa H., Montgomery L. 2007. Algae. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 9: 133-167.
- Nakagawa H., Sato M., Gatlin D.M. 2007. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. CABI Publication. 224 pp.
- Nakano T. 2007. Microorganisms. *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. Cabi, 5: 86-108.
- Nakayama T., Lu H., Nomura N. 2009. Inhibitory Effects of *Bacillus* Probiotics on Growth and Toxin Production of *Vibrio harveyi* Pathogens of Shrimp. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 679–684.
- Nascimento G.G., Locatelli J., Freitas P.C., Silva, G.L. 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. *Brazilian journal of Microbiology*, 31: 247-256.
- Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. 2004. Characterization of Digestive Enzymes in a Carnivorous Ornamental fish the Asian Bony Tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, 233: 305-320.
- Nayak S.K. 2010. Probiotics and Immunity: a Fish Perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29: 2-14.
- Newaj - Fyzul A., 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: 1699-1706.
- Newaj-Fyzul A., Al-Harbi A.H., Austin B. 2014. Review: Developments in the use of Probiotics for Disease Control in Aquaculture. *Aquaculture*, 431: 1-11.

- Ng W.K., Koh C.B. 2016. The Utilization and Mode of Action of Organic Acids in the Feeds of Cultured Aquatic Animals. *Reviews in Aquaculture*.
- Ng W.K., Koh C.B., Sudesh K., Siti - Zahrah A. 2009. Effects of Dietary Organic Acids on Growth Nutrient Digestibility and Gut Microflora of Red Hybrid Tilapia *Oreochromis sp.*, and Subsequent Survival During a Challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research* 40: 1490-1500.
- Ng W.K., Koh C.B., Teoh C.Y., Romano N. 2015. Farm-Raised Tiger Shrimp *Penaeus monodon* Fed Commercial Feeds with Added Organic Acids Showed Enhanced Nutrient Utilization Immune Response and Resistance to *Vibrio harveyi* Challenge. *Aquaculture* 449: 69-77.
- North B. P., Turnbull J. F., Ellis T., Porter M.J., Migaud H., Bron J., Bromage N.R. 2006. The Impact of Stocking Density on the Welfare of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255: 466-479.
- Nicky B.B. 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: a Practical Identification Manual*.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A.C., Bylund G., Salminen S., Lilius E.M. 2003. Immune Enhancement in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Potential Probiotic Bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 15: 443-452.
- Noguchi G.E., 1998. Immunological Disorders Associated with Polychlorinated Biphenyls and Related Halogenated Aromatic Hydrocarbons. In: Leatherland J.F., Woo P.T.K. Eds. *Fish Diseases and Disorders*. CAB International, 163–186.
- Nudo L.P., Catap E.S. 2011. Immunostimulatory Effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) Vinebark Aqueous Extract in Balb/C Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 613-620.
- Nwamba H.O., Mgbenka B.O., Ugwu L.L.C., Chifomma A.N., 2006. The Exposure of *Heterobranchus bidorsalis* Juveniles to Different Concentrations of Bonny-Light Crude Oil and Their Effects on Amylase and Cretinine Kinase Activities. *Animal Research International*, 3: 516-520.
- Nya E. 2009. *Studies on Dietary Supplements for the Control of Aeromonas hydrophila Infection in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum)*. Doctoral Dissertation Heriot-Watt University.
- Nya E.J., Austin B. 2011. Dietary Modulation of Digestive Enzymes by the Administration of Feed Additives to Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquaculture Nutrition*, 17: 459-466.

- Odling T.E., Caputo R.A., Graham G.S. 1981. Heat Resistance and Population Stability of Lyophilized *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 1374-1377.
- Opuszynski K., Shireman J.V. 1995. Digestive Mechanisms. In: Opuszynski K., Shireman J.V. (Eds.), *Herbivorous Fishes: Culture and Use for Weed Management*. CRC Press Boca Raton FL, 21–31 pp.
- Osserman E.F., Lawlor D.P. 1966. Serum and Urinary Lysozyme (Muramidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. *The Journal of Experimental Medicine* 124: 921-952.
- Owens C.W.I., Belcher R.V. 1965. A Colorometric Micro-Method for Determination of Glutathione. *Biochem Journal*, 94: 705-711.
- Pandey A., Satoh S. 2008. Effects of Organic Acids on Growth and Phosphorus Utilization in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 74: 867-874.
- Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh 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: 379-388.
- Panigrahi A., Kiron V., Puangkaew, J., Kobayashi T., Satoh S., Sugita H. 2005. The Viability of Probiotic Bacteria as a Factor Influencing the Immune Response in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243: 241-254.
- Panigrahi A., Kiron V., Satoh S., Hirono I., Kobayashi T., Sugita H., Aoki T. 2007. Immune Modulation and Expression of Cytokine Genes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* upon Probiotic Feeding. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 372-382.
- Papoutsoglou E.S., Lyndon A.R. 2003. Distribution of  $\alpha$ -Amylase along the Alimentary Tract of two Mediterranean Fish Species the Parrotfish *Sparisoma cretense* L. and the Stargazer *Uranoscopus scaber* L. *Mediterranean Marine Science*, 4: 115-124.
- Park G., ho Lee J., ho Yun H., Browdy C.L., Bharadwaj A.S., Bai S.C. 2011. Effects of two Different Organic Acid Blands in Olive Flounder. *한국유기농업학회지*, 19: 39-42.
- Park Y., Lee S., Hong J., Kim D., Moniruzzaman M., Bai S.C. 2016. Use of Probiotics to Enhance Growth Stimulate Immunity and Confer Disease Resistance to *Aeromonas salmonicida* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*.

- Parpoura A.C., Alexis M.N. 2001. Effects of Different Dietary Oils in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Nutrition. *Aquaculture International*, 9: 463-476.
- Partanen K.H., Mroz Z. 1999. Organic Acids for Performance Enhancement in Pig Diets. *Nutrition Research Reviews*, 121:117-145.
- Percin F., Konyalioglu S., 2008. Serum Biochemical Profiles of Captive and Wild Northern Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Eastern Mediterranean. *Aquaculture Research*, 39: 945-953.
- Peres H., Teles A.O., 1999a. Influence of Temperature on Protein Utilization in Juvenile European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170: 337–348.
- Peres H., Teles A.O., 1999b. Effect of Dietary Lipid Level on Growth Performance and Feed Utilization by European Sea Bass Juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179: 325–334.
- Pérez-Sánchez T., Balcazar J. L., Merrifield D. L., Carnevali O., Gioacchini G., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I. 2011. Expression of Immune-Related Genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Induced by Probiotic Bacteria During *Lactococcus garvieae* Infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 31: 196-201.
- Pérez - Sánchez T., Ruiz - Zarzuela I., Blas I., Balcazar J.L. 2014. Probiotics in Aquaculture: a Current Assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6: 133-146.
- Perry S.F., Bernier N.J. 1999. The Acute Humoral Adrenergic Stress Response in Fish: Facts and Fiction. *Aquaculture*, 177: 285-295.
- Pieters N., Brunt J., Austin B., Lyndon A.R. 2008. Efficacy of in - Feed Probiotics Against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* Skin Infections in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 105: 723-732.
- Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Litinas K., Geromichalos G. 2014. Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design Synthesis and Modeling Studies. *Molecules*, 19: 9655-9674.
- Pottinger T.G. 2008. The Stress Response in Fish-Mechanisms Effects and Measurement. *Fish Welfare*. Blackwell Publishing Ltd UK 3: 32-48.
- Prasad V.G.N.V., Swamy P.L., Rao T.S., Rao G.S. 2014. Antibacterial Synergy Between Quercetin and Polyphenolic Acids against Bacterial Pathogens of Fish. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4: S326-S329.

- Press C.M. 1998. Immunology of Fishes. P.-P. Pastoret P. Griebel H. Bazin A. Govaerts (Eds.), Handbook of Vertebrate Immunology Academic Press London United Kingdom. 3-62.
- Quade M.J., Roth J.A. 1997. A Rapid Direct Assay to Measure Degranulation of Bovine Neutrophil Primary Granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58: 239-248.
- Raida M.K., Buchmann K. 2008. Development of Adaptive Immunity in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Surviving an Infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 533-541.
- 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.
- Rand D. 1997. Reactive Oxygen Species (ROS). First printed in RandD Systems' 1997 Catalog.
- Ravindran V., Kornegay E.T. 1993. Acidification of Weaner Pig Diets: a Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62: 313-322.
- Reid S.G., Vijayan M.M., Perry S.F. 1996. Modulation of Catecholamine Storage and Release by the Pituitary-Interrenal Axis in the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165: 665-676.
- Reuter K., Steinbach A., Helms V. 2016. Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 8: 1-15.
- Ribeiro L., Couto A., Olmedo M., Álvarez - Blázquez B., Linares F., Valente L.M. 2008. Digestive Enzyme Activity at Different Developmental Stages of Blackspot Seabream *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Aquaculture Research*, 39: 339-346.
- Ricke S.C. 2003. Perspectives on the use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. *Poultry Science*, 824: 632-639.
- Ringo E., Birkbeck T.H. 1999. Intestinal Microflora of Fish Larvae and Fry. *Aquaculture Research*, 30: 73-93.
- Ringo E., Myklebust R., Mayhew, T.M., Olsen R.E. 2007. Bacterial Translocation and Pathogenesis in the Digestive Tract of Larvae and Fry. *Aquaculture*, 268: 251-264.
- Ringo E., Olsen R.E., Gifstad T.Ø., Dalmo R.A., Amlund H., Hemre G.I., Bakke A.M. 2010. Probiotics in Aquaculture: a Review. *Aquaculture Nutrition*, 16: 117-136.

- Ringo E., Strom E., Tabachek J.A. 1995. Intestinal Microflora of Salmonids: a Review. *Aquaculture Research*, 26: 773-789.
- Roberts R.J., 2001. *Fish Pathology*, 3rd Ed. WB Saunders Toronto. 472 p.
- Rodriguez-Estrada U.R.I.E.L., Satoh S., Haga Y., Fushimi H., Sweetman J. 2009. Effects of Single and Combined Supplementation of *Enterococcus faecalis* Mannan Oligosaccharide and Polyhydroxybutyrate Acid on Growth Performance and Immune Response of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult Sci*, 57: 609-617.
- Roe A.J., McLaggan D., Davidson I., O'Byrne C., Booth I.R. 1998. Perturbation of Anion Balance During Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids. *Journal of Bacteriology*, 180: 767-772.
- Roitt I.M., Delves P.J. 2001. *Roitt's Essential Immunology* 10th Ed. Blackwell Science Oxford. 481 p.
- Romano N., Koh C.B., Ng W.K. 2015. Dietary Microencapsulated Organic Acids Blend Enhances Growth Phosphorus Utilization Immune Response Hepatopancreatic Integrity and Resistance against *Vibrio harveyi* in White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 435: 228-236.
- Romano N., Simon W., Ebrahimi M., Fadel A.H., Chong C.M., Kamarudin M.S. 2016. Dietary Sodium Citrate Improved Oxidative Stability in Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis sp.*) but Reduced Growth Health Status Intestinal Short Chain Fatty Acids and Induced Liver Damage. *Aquaculture*, 458: 170-176.
- Ronzio R.A. 2003. *The Encyclopedia of Nutrition and Good Health*. Infobase Publishing.
- Rota M.C., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J.A., Jordán M.J. 2008. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Thymus vulgaris* *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* Essential Oils. *Food control*, 19: 681-687.
- Roth R.Z., Kirchgessner M. 1998. Organic Acids as Feed Additives for Young Pigs: Nutritional and Gastrointestinal Effects. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7: 25-33.
- Rudolph A., Yanez R., Troncoso L., González R. 2002. Stimulation of Enzymatic Defense Mechanisms and Appearance of Liver Damage in Juvenile Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Water-Accommodated Trace Petroleum Residues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 644-651.
- Russell N.J., Gould G.W. 2003 Major Preservation Technologies. In: Russell NJ Gould GW (eds) *Food Preservatives*. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York. 14–24 pp.



- Saei M.M., Beiranvand K., Taei H.M., Nekoubin H. 2016. Effects of Different Levels of BioAcid Ultra on Growth Performance Survival Hematological and Biochemical Parameters of Fingerlings Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Aquaculture Research & Development, 7:455.
- Saera-Vila A., Benedito-Palos L., Sitjà-Bobadilla A., Náchter-Mestre J., Serrano R., Kaushik S., Pérez-Sánchez J. 2009. Assessment of the Health and Antioxidant Trade-off in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) fed Alternative Diets with Low Levels of Contaminants. Aquaculture, 296: 87-95.
- Said S., Neves F.M., Griffiths A.J.F. 2004. Cinnamic Acid Inhibits the Growth of the Fungus *Neurospora crassa* but is Eliminated as Acetophenone. International Biodeterioration and Biodegradation, 54: 1-6.
- Sakai M., 1999. Current Research Status of Fish Immunostimulants. Aquaculture, 172: 63–92.
- Salminen S., Isolauri E., Salminen E. 1996. Clinical Uses of Probiotics for Stabilizing the Gut Mucosal Barrier: Successful Strains and Future Challenges. Antonie Van Leeuwenhoek, 70: 347-358.
- Samanta S., Haldar S., Ghosh T.K. 2010. Comparative Efficacy of an Organic Acid Blend and Bacitracin Methylene Disalicylate as Growth Promoters in Broiler Chickens: Effects on Performance Gut Histology and Small Intestinal Milieu. Veterinary medicine International.
- Sanger A.M., Stoiber W., 2001. Muscle Fibre Diversity and Placticity. In: Johnston I.A., Ed. Muscle Developemnet and Growth. Academic Press London. 187-250.
- Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G. 2002. The Lipids. Fish Nutrition, 4: 181-257.
- Sarker M.S.A., Satoh S., Kiron V. 2007. Inclusion of Citric Acid and/or Amino Acid-Chelated Trace Elements in Alternate Plant Protein Source Diets Affects Growth and Excretion of Nitrogen and Phosphorus in Red Sea Bream *Pagrus major*. Aquaculture, 262: 436-443.
- Satchell G.H., 1991. Physiology and Form of Fish Circulation. Cambridge University Press Cambridge. 235 p.
- Sava X. 2011. Formic Acid and Propionic Acid: an Ideal Pair for Feed Preservation. In: Lückstädt C. (ed.) Standards for Acidifiers-Principles for the Use of Organic Acids in Animal Nutrition. Proceeding of the 1st International Acidifier Summit. Nottingham University Press Nottingham. 15-23 pp.

- Serrano P.H. 2005. Responsible use of Antibiotics in Aquaculture (No. 469). Food & Agriculture Org.
- Schoster A., Kokotovic B., Permin A., Pedersen P.D., Dal Bello F., Guardabassi L. 2013. In Vitro Inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by Commercial Probiotic Strains. *Anaerobe*, 20: 36–41.
- Sharafat D., Bhutto A.L., Rajput I.R., Memon M.I., Shah M.G., Rajput Z.I. 2015. *Bacillus subtilis* as Remedy of Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens* in Broilers. *Lasbela University Journal of Science and Technology*, 4: 157-167.
- Sharifuzzaman S.M., Austin B. 2009. Influence of Probiotic Feeding Duration on Disease Resistance and Immune Parameters in Rainbow Trout. *Fish and Shellfish Immunology*, 27: 440-445.
- Sheikhzadeh N., Tayefi-Nasrabadi H., Oushani A.K., Enferadi M.H.N. 2012. Effects of *Haematococcus pluvialis* Supplementation on Antioxidant System and Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 413-419.
- Sheridan M.A., 1988. Lipid Dynamics in Fish: Aspects of Absorption Transportation Deposition and Mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90: 679-690.
- Silva B.C., do Nascimento Vieira F., Mouriño J.L.P., Ferreira G.S., Seiffert W.Q. 2013. Salts of Organic Acids Selection by Multiple Characteristics for Marine shrimp Nutrition. *Aquaculture*, 384: 104-110.
- Silva B.C., Nolasco - Soria H., Magallón - Barajas F., Civera - Cerecedo R., Casillas - Hernández R., Seiffert W. 2016. Improved Digestion and Initial Performance of Whiteleg Shrimp Using Organic Salt Supplements. *Aquaculture Nutrition*, 22: 997–1005.
- Singh R.P., Murthy K.N.C., Jayaprakasha G.K. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using *In Vitro* Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 81-86.
- Siwicki A.K. Anderson D.P. 1993b. Immunostimulation In Fish: Measuring the Effects of Stimulants by Serological and Immunological Mmethods. Abstract and Techniques Manual Presented at The Nordic Symposium on Fish Immunology Lysekil Sweden 19-22 May 1993.

- Siwicki A.K., Anderson D.P., Antychowitz J. 1993. Non-Specific Defence Mechanisms Assay in Fish: I. Phagocytic Index, Adherence and Phagocytic Ability of Neutrophils (NBT test) and Myeloperoxidase Activity Test. Siwicki A.K., Anderson D.P. and Waluga J., Eds. Disease Diagnosis and Prevention Methods. FAO-project GCP/INT/JPA. IFI Olsztyn Poland. 95-103.
- Siwicki A.K., Anderson D.P. 1993a. Nonspecific Defense Mechanisms Assay in Fish: II. Potential Killing Activity of Neutrophils and Macrophages Lysozyme Activity in Serum and Organs and Total Immunoglobulin Level in Serum. Disease Diagnosis and Prevention Methods. FAO-project GCP/INT/JPA IFI Olsztyn Poland pp. 105–112.
- Skřivanová E., Marounek M., Benda V., Brezina P. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to Organic Acids and Monolaurin. Veterinarni Medicina Praha, 3: 81-88.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene V., Kazlauskiene N., Vosyliene M.Z., Virbickas T. 2012. *Aeromonas salmonicida* Infected Fish Transfer Disease to Healthy Fish Via Water. Central European Journal of Biology, 7: 878-885.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene V., Kazlauskiene N., Vosyliene M.Z., Virbickas T. 2010. Identification of *Aeromonas salmonicida* in European Perch from North Lithuanian Rivers During Mass Mortalities in 2008. Central European Journal of Biology, 5: 831-838.
- Slover H.T., Lanza E. 1979. Quantitative Analysis of Food Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography. Journal of the American Oil Chemists' Society, 56: 933-943.
- Smigic N., Rajkovic A., Nielsen D.S., Siegmundfeldt H., Uyttendaele M., Devlieghere F., Arneborg N. 2009. Intracellular pH as an Indicator of Viability and Resuscitation of *Campylobacter jejuni* after Decontamination with Lactic Acid. International Journal of Food Microbiology, 135: 136-143.
- Sova M. 2012. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 12: 749-767.
- Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Nielsen T., Appel K.F. Gram L. 2000. The Microflora of Rainbow Trout Intestine: a Comparison of Traditional and Molecular Identification. Aquaculture, 182: 1–15.
- Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Sick E.B., Pipper C.B., Martinussen T., Gram L. 2001. The Probiotic Potential Against Vibriosis of the Indigenous Microflora of Rainbow Trout. Environmental Microbiology, 3: 755-765.

- Srivastava P.K., Pandey A.K. 2015. Role of Immunostimulants in Immune Responses of Fish and Shellfish. *Biochemical and Cellular Archives*, 15:47-73.
- Stasiak S.A., Baumann P.C. 1996. Neutrophil Activity as a Potential Bioindicator for Contaminant Analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 6: 537-539.
- Stoskopf M. 1993. *Fish Medicine*. Saunders Company Philadelphia. 882 p.
- Stratford M., Eklund T. 2003 Organic acids and esters. In: Russell NJ Gould GW (eds) *Food Preservatives*. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York. 48–84 pp.
- Studnicka M., Siwicki A.K. Kazun K. 1993. In: Nonspecific Defence Barriers and Mechanisms in Fish. Siwicki A.K., Anderson D.P. and Waluga J., Eds. *Disease diagnosis and prevention methods*. FAO-project GCP/INT/JPA. IFI Olsztyn Poland. 11-15.
- Su X., Li X., Leng X., Tan C., Liu B., Chai X., Guo T. 2014. The Improvement of Growth Digestive Enzyme Activity and Disease Resistance of White Shrimp by the Dietary Citric Acid. *Aquaculture International*, 22: 1823-1835.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.-J., Gibson G.R., Collins M.D., Doré, J. 1999. Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4799-4807.
- Subhadra B., Lochmann R., Rawles S., Chen R. 2006. Effect of Dietary Lipid Source on the Growth Tissue Composition and Hematological Parameters of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 255: 210-222.
- Sugita H., Fujie T., Sagesaka T., Itoi S. 2009. The Effect of *Lactococcus lactis* on the Abundance of Aeromonads in the Rearing Water of the Goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 41: 153-156.
- Sugiura S.H., Dong F.M., Hardy R.W. 1998. Effects of Dietary Supplements on the Availability of Minerals in Fish Meal; Preliminary Observations. *Aquaculture*, 160: 283-303.
- Sugiura S.H., Gabaudan J., Dong F.M., Hardy R.W. 2001. Dietary Microbial Phytase Supplementation and the Utilization of Phosphorus Trace Minerals and Protein by Rainbow Trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)] Fed Soybean Meal - Based Diets. *Aquaculture Research*, 32: 583-592.
- Sugiura S.H., Roy P.K., Ferraris R.P. 2006. Dietary Acidification Enhances Phosphorus Digestibility but Decreases H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Expression in Rainbow Trout. *Journal of Experimental Biology*, 209: 3719-3728.

- Sunyer J.O., Tort L. 1995. Natural Hemolytic and Bactericidal Activities of Sea Bream *Sparus aurata* Serum are Effected by the Alternative Complement Pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45: 333-345.
- Šyvokienė J., Vosylienė M.Z. 2013. Impact of Copper and Zinc Mixture on Bacterial Flora of Digestive Tract of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 21 : 288–295.
- Tappenden K.A., Mcburney M.I. 1998. Systemic Short-Chain Fatty Acids Rapidly Alter Gastrointestinal Structure Function and Expression of Early Response Genes. *Digestive Diseases and Sciences*, 43: 1526-1536.
- Tidwell J. 2012. *Aquaculture Production Systems*. John Wiley and Sons.
- Tietz N.W. 1986. *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company Philadelphia.
- Timur G., Timur M., 2003. *Balık Hastalıkları*. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayın No:5: 538: İstanbul.
- Timur M., 2006. *Balık Fizyolojisi*, Nobel Yayın Dağıtım Ankara. 192 p.
- Tinh N.T.N., Linh N.D., Wood T.K., Dierckens K., Sorgeloos P., Bossier P. 2007. Interference with the Quorum Sensing Systems in a *Vibrio harveyi* Strain alters the Growth Rate of Gnotobiotically Cultured Rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 194-203.
- Topping D.L., Clifton P.M. 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81: 1031-1064.
- Touraki M., Karamanlidou G., Karavida P., Karamanoli C. 2012. Evaluation of the Probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* Bioencapsulated in *Artemia nauplii* Against Vibriosis in European Sea Bass Larvae (*Dicentrarchus labrax* , L.), *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 2425–2433.
- Tramati C., Savona B., Mazzola A., 2005. A Study of the Pattern of Digestive Enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti 1777 (Osteichthyes Sparidae): Evidence for the Definition of Nutritional Protocols. *Aquaculture International*, 13: 89–95.
- Tseng D.-Y., Ho P.-L., Huang S.-Y., Cheng S.-C., Shiu Y.-L., Chiu C.-S., Liu C.-H., 2009. Enhancement of Immunity and Disease Resistance in the White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the Probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, 26: 339–344.
- TÜİK 2015. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- Ulukaya E. 1998. *Klinik Biyokimya*. Melisa Matbaacılık İstanbul. 343 p.

- Van Dam H., Na L.B., K-sorb B.T., K-benz M.M., Corrosive H. 2006. Organic Acids and Their Salts. Feed mix, 14: 28.
- Van Immerseel F., Cauwerts K., Devriese L.A., Haesebrouck F., Ducatelle R. 2002. Feed Additives to Control Salmonella in Poultry. World's Poultry Science Journal, 58: 501-513.
- Vandenbergh P.A. 1993. Lactic Acid Bacteria their Metabolic Products and Interference with Microbial Growth. FEMS Microbiology Reviews, 12: 221-237.
- Vaseeharan B.A.R.P., Ramasamy P. 2003. Control of Pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a Possible Probiotic Treatment for Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology, 36: 83-87.
- Vendrell D., Balcazar J. L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Gironés O., Muzquiz J.L. 2008. Protection of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Lactococcosis by Probiotic Bacteria. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 31: 337-345.
- Verschuere L., Heang H., Criel G., Dafnis S., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000a. Protection of Artemia Against the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by Selected Bacterial Strains. Applied and Environmental Microbiology, 66: 1139-1146.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000b. Probiotic Bacteria as Biological Control agents in Aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 655-671.
- Vielma J., Lall S.P. 1997. Dietary Formic Acid Enhances Apparent Digestibility of Minerals in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Nutrition, 3: 265-268.
- Vielma J., Ruohonen K., Lall S.P. 1999. Supplemental Citric Acid and Particle Size of Fish Bone-Meal Influence the Availability of Minerals in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Nutrition, 5: 65-71.
- Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., Daya S., Baxter J., Hecht T. 2004. Competition for Attachment of Aquaculture Candidate Probiotic and Pathogenic Bacteria on Fish Intestinal Mucus. Journal of Fish Diseases, 27: 319-326.
- Wagner E.J., Routledge M.D., Intelmann S.S. 1996. Assessment of Demand Feeder Spacing on Hatchery Performance Fin Condition and Size Variation of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society, 27: 130-136.

- Wagner T., Congleton J.L., 2004. Blood Chemistry Correlates of Nutritional Condition Tissue Damage and Stress in Migrating Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 61: 1066–1074.
- Walter F., Addis T. 1939. Organ Work and Organ Weight. The Journal of Experimental Medicine, 69: 467-483.
- Wang Y.B., Li J.R., Lin J. 2008. Probiotics in Aquaculture: Challenges and Outlook. Aquaculture, 281: 1-4.
- Warth A.D. 1991. Mechanism of Action of Benzoic Acid on *Zygosaccharomyces bailii*: Effects on Glycolytic Metabolite Levels Energy Production and Intracellular pH. Applied and Environmental Microbiology, 57: 3410-3414.
- Weifen L., Xiaoping Z., Wenhui S., Bin D., Quan L., Luoqin F., Dongyou Y. 2012. Effects of Bacillus Preparations on Immunity and Antioxidant Activities in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish Physiology and Biochemistry, 38: 1585-1592.
- Wiegertjes G.F., Stet R.M., Parmentier H.K., Van Muiswinkel W.B. 1996. Immunogenetics of Disease Resistance in Fish: a Comparative Approach. Developmental and Comparative Immunology, 20: 365-381.
- Wiens G.D., Vallejo R.L. 2010. Temporal and Pathogen-Load Dependent Changes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Immune Response Traits Following Challenge with Biotype 2 *Yersinia ruckeri*. Fish and Shellfish Immunology, 29:639-647.
- Willcox J.K., Ash S.L., Catignani G.L. 2004. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44: 275–295.
- Wilson R.P. 2002. Amino Acids and Proteins. In: Halver J.E., Hardy R.W., Eds. Fish Nutrition 3rd ed. Academic Press. 143-179.
- Wilson R.P. 1994. Utilization of Dietary Carbohydrate by Fish. Aquaculture, 124: 67-80.
- Wolfe L., Manley P.E. 2006. Disorders of Erythrocyte Metabolism Including Porphyria Disorders of Erythrocyte Metabolism. In: Arceci R.J., Hann I.M., Smith O.P., Ed. Pediatric Hematology 3rd Ed. Blackwell Publishing Massachusetts. 171-212 pp.
- Worthington V. 1993. Worthington Enzyme Manual. Enzymes and Related Biochemicals Worthington Chemical. New Jersey US. 399 p.
- Xie S., Zhang L., Wang D. 2003. Effects of Several Organic Acids on the Feeding Behavior of *Tilapia nilotica*. Journal of Applied Ichthyology, 19: 255-257.

- Yano T. 1996. The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. In: Iwama G., Nakanishi T., Ed. The Fish Immune System Organism Pathogen and Environment. Academic Press California. 106-157.
- Yıldırım M., Lim C., Wan P.J., Klesius P.H. 2003. Growth Performance and Immune Response of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Fed Diets Containing Graded Levels of Gossypol–Acetic Acid. *Aquaculture*, 219: 751-768.
- Yılmaz S., Ergün S. 2012. Effects of Garlic and Ginger Oils on Hematological and Biochemical Variables of Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24: 219-224.
- Yılmaz S., Ergün S. 2014. Dietary Supplementation with Allspice *Pimenta dioica* Reduces the Occurrence of Streptococcal Disease During First Feeding of Mozambique Tilapia Fry. *Journal of Aquatic Animal Health*, 26: 144-148.
- Yılmaz S., Ergün S., Çelik E.Ş. 2012. Effects of Herbal Supplements on Growth Performance of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in Body Composition and Some Blood Parameters. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1: 217-222.
- Yılmaz S., Ergün S., Çelik E.Ş. 2013. Effect of Dietary Herbal Supplements on Some Physiological Conditions of Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25: 98-103.
- Yılmaz S., Ergün S., Kaya H., Gürkan M. 2014. Influence of *Tribulus terrestris* Extract on the Survival and Histopathology of *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) Fry Before and After *Streptococcus iniae* Infection. *Journal of Applied Ichthyology*, 30: 994-1000.
- Yılmaz S., Ergün S., Çelik E.Ş. 2016. Effect of Dietary Spice Supplementations on Welfare Status of Sea Bass *Dicentrarchus labrax* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B: Biological Sciences* 86: 229-237.
- Yiğit M., Bulut M., Ergün S., Güroy D., Karga M., Kesbiç O.S., Yılmaz S., Güroy B. 2012. Utilization of Corn Gluten Meal as a Protein Source in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Journal of Fisheries Sciences*. com 6: 63.
- Yiğit M., Aral O. 1999. A Comparison of the Growth Differences of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) in Freshwater and Seawater (The Black Sea). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 23: 53-60.
- Zacks M.A., Wen J.J., Vyatkina G., Bhatia V., Garg N. 2005. An Overview of Chagasic Cardiomyopathy: Pathogenic Importance of Oxidative Stress. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: 691-715.



- Zhou X., Tian Z., Wang Y., Li W. 2010. Effect of Treatment with Probiotics as Water Additives on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Growth Performance and Immune Response. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 501-509.
- Zhou Z., Liu Y., He S., Shi P., Gao X., Yao B., Ringø, E. 2009. Effects of Dietary Potassium Difformate (KDF) on Growth Performance Feed Conversion and Intestinal Bacterial Community of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus*♀× *O. aureus*♂). *Aquaculture*, 291: 89-94.
- Zhu Y., Qiu X., Ding Q., Duan M., Wang C. 2014. Combined Effects of Dietary Phytase and Organic Acid on Growth and Phosphorus Utilization of Juvenile Yellow Catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 430: 1-8.
- Zingg J.M., Azzi A., 2005. Significance of the  $\alpha$ -Tocopherol Salvage Pathway. In: Grune T., Ed. *Free Radicals and Diseases: Gene Expression Cellular Metabolism and Pathophysiology*. IOS Press Amsterdam, 113-136.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevdan YILMAZ

Doğum Yeri : Bulgaristan

Doğum Tarihi : 1986

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ, Su Ürünleri, Su Ürünleri, 2004-2008

Yüksek Lisans Öğrenimi : ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ, Fen Bilimleri, Su Ürünleri, 2008-2011

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce (Orta)

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar -SCI -Diğer

1. Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., ve Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282-286.
2. Acar, Ü., Türker, A., Bulut, M., Yıldırım, Ö., Yılmaz, S., ve Kesbiç, O. S. (2013). The effect of dietary soybean meal on growth, nutrient utilization, body composition and some serum biochemistry variables of two banded seabream, *Diplodus vulgaris* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(4), 749-758.
3. Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Kaya, H., Yılmaz, S., ve Camas, M. (2016). Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses. *Aquatic Toxicology*, 177, 22-32.
4. Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., ve Yılmaz, S. (2016). Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture*, 465, 13-18.
5. Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O. S., ve Yılmaz, S. (2016). The use of *Avena sativa* extract against *Aeromonas hydrophila* and its effect on growth performance, hematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Italian Journal of Animal Science*, 1-9.
6. Bilen, S., Yılmaz, S., ve Bilen, A. M. (2013). Influence of Tetra (*Cotinus coggygia*) extract against *Vibrio anguillarum* infection in koi carp, *Cyprinus carpio* with reference to haematological and immunological changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(3).
7. Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A. M., ve Biswas, G. (2014). Effects of Dietary Incorporation of Tetra (*Cotinus coggygia*) Extract on Immune Response and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Koi Carp (*Cyprinus carpio*). *Bamidgeh*.
8. Bulut, M., Yiğit, M., Ergün, S., Kesbiç, O. S., Acar, Ü., Gültepe, N., ... ve Güroy, D. (2014). Evaluation of dietary protein and lipid requirements of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) cultured in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture international*, 22(3), 965-973.
9. Celik, I., Yılmaz, S., Celik, P., Saygı, H., Önal, U., ve Bashan, T. (2010). The general profile of aquarium sector in Istanbul (Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(23), 2973-2978.

10. Çelik, E. S., Kaya, H., ve Yılmaz, S. (2012). Effects of phosalone on mineral contents and spinal deformities in common carp (*Cyprinus carpio*, L. 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(2).
11. Çelik, E. Ş., Hasan, K. A. Y. A., Yılmaz, S., ve Çakici, H. (2012). Karagöz İstavrit (*Trachurus trachurus*) Balığının Hematolojik Parametrelerine Su Sıcaklığı, Tuzluluk, Mevsim, Üreme, Cinsiyet, Balık Büyüklüğü ve Yaşın Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(4).
12. Çelik, E. Ş., Kaya, H., Yılmaz, S., Akbulut, M., ve Tulgar, A. (2013). Effects of zinc exposure on the accumulation, haematology and immunology of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *African Journal of Biotechnology*, 12(7).
13. Çelik, E., Kaya, H., ve Yılmaz, S. (2012). Changes in Hematological and Biochemical Parameters of European Chub (*Squaliuscephalus* L.) in Unpolluted Reservoir and Polluted Creek. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(3), 413-418.
14. Ergün, S., Emre, Y., Yılmaz, S., Kurtoğlu, A., Yiğit, M., Güroy, D., ... ve Bulut, M. (2013). Effects of High Levels of Dietary Fish Oil on the Immune Response of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Marine Science and Technology Bulletin*, 2(2), 23-27.
15. Gurkan, M., Yılmaz, S., Kaya, H., Ergun, S., ve Alkan, S. (2015). Influence of three spice powders on the survival and histopathology of *Oreochromis mossambicus* before and after *Streptococcus iniae* infection. *Marine Science and Technology Bulletin*, 4(1), 1-5.
16. Güllü, K., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Ağdamar, S., Ergün, S., ve Türker, A. (2015). Beneficial effects of Oral Allspice, *Pimenta dioica* powder supplementation on the hemato - immunological and serum biochemical responses of *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*.
17. Gültepe, N., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Yıldırım, Ö., ve Türker, A. (2014). Effects of Dietary *Tribulus terrestris* Extract Supplementation on Growth, Feed Utilization, Hematological, Immunological, and Biochemical Variables of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*.
18. Gültepe, N., Bilen, S., Yılmaz, S., Güroy, D., ve Aydın, S. (2014). Effects of herbs and spice on health status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Streptococcus iniae*. *Acta Veterinaria Brno*, 83(2), 125-131.
19. Hisar, O., Yılmaz, S., ve Yiğit, M. (2016). Effects of different probiotic bacteria on growth, body composition, immune response and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sublethal water temperature. *Marine Science and Technology Bulletin*, 4(2), 21-28.
20. Hisar, Ş. A., Hisar, O., Yılmaz, S., Çakır, F., Şahin, T., ve Uyanık, M. H. (2014). In vitro antimicrobial and antifungal activities of aqueous skin mucus from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human pathogens.
21. Irkin, L. C., Yiğit, M., Yılmaz, S., ve Maita, M. (2014). Toxicological Evaluation of Dietary Garlic (*Allium sativum*) Powder in European Sea Bass *Dicentrarchuslabrax* Juveniles. *Food and Nutrition Sciences*, 2014.
22. Kaya, H., Akbulut, M., Çelik, E. Ş., ve Yılmaz, S. (2013). Impacts of sublethal lead exposure on the hemato-immunological parameters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Toxicological ve Environmental Chemistry*, 95(9), 1554-1564.
23. Kaya, H., Aydın, F., Gürkan, M., Yılmaz, S., Ates, M., Demir, V., ve Arslan, Z. (2015). Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(3), 936-947.

24. Kaya, H., Aydın, F., Gürkan, M., Yılmaz, S., Ates, M., Demir, V., ve Arslan, Z. (2016). A comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Organ pathologies, osmoregulatory responses and immunological parameters. *Chemosphere*, 144, 571-582.
25. Kaya, H., Çelik, E. Ş., Gürkan, M., Yılmaz, S., ve Akbulut, M. (2013). Effects of subchronic exposure to phosalone on oxidative stress and histopathological alterations in common carp (*Cyprinus carpio*, L., 1758). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(14), 853-864.
26. Kaya, H., Çelik, E. Ş., Yılmaz, S., Tulgar, A., Akbulut, M., ve Demir, N. (2015). Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology*, 24(3), 497-507.
27. Kaya, H., Duysak, M., Akbulut, M., Yılmaz, S., Gürkan, M., Arslan, Z., ... ve Ateş, M. (2016). Effects of subchronic exposure to zinc nanoparticles on tissue accumulation, serum biochemistry, and histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*.
28. Kaya, H., Hisar, O., Yılmaz, S., Gürkan, M., ve Hisar, Ş. A. (2016). The effects of elevated carbon dioxide and temperature levels on tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Respiratory enzymes, blood pH and hematological parameters. *Environmental toxicology and pharmacology*, 44, 114-119.
29. Kaya, H., Yılmaz, S., Gürkan, M., ve Hisar, O. (2013). Effects of environmental hypercapnia on hemato-immunological parameters, carbonic anhydrase, and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Toxicological ve Environmental Chemistry*, 95(8), 1395-1407.
30. Kenanoğlu, O. N., Yılmaz, S., Ergün, S., ve Akı, C. (2013). A Preliminary Study on the Determination of Triploidy by Chromosome Analysis at the Different Stages of Development in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Marine Science and Technology Bulletin*, 2(2), 17-21.
31. Kenanoğlu, O. N., Yılmaz, S., Soyaş, N., Ergün, S., Akı, C., ve Tapan, F. (2012). Determination of Triploidy in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* using Erythrocyte Measurements. *Marine Science and Technology Bulletin*, 1(1), 17-19.
32. Kesbiç, O. S., Acar, Ü., Yigit, M., Bulut, M., Gültepe, N., ve Yılmaz, S. (2016). Unrefined Peanut Oil as a Lipid Source in Diets for Juveniles of Two-banded Seabream *Diplodus vulgaris*. *North American Journal of Aquaculture*, 78(1), 64-71.
33. Sönmez, A. Y., Bilen, S., Albayrak, M., Yılmaz, S., Biswas, G., Hisar, O., ve Yanık, T. (2015). Effects of Dietary Supplementation of Herbal Oils Containing 1, 8-cineole, Carvacrol or Pulegone on Growth Performance, Survival, Fatty Acid Composition, and Liver and Kidney Histology of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 813-819.
34. Yılmaz, E., Yılmaz, S., Ergün, S., Kaya, H., Kızılkaya B., and Soyaş. N. (2014). A preliminary study of the effect of phytoadditive carvacrol on the trace elements (Cu, Mn and Zn) content in fish tissues. *J. BioSci. Biotech.* 3(1). 43-47.
35. Yılmaz, S. (2012). Effects of herbal supplements on growth performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Change in body composition and some blood parameters. *Energy (kJ/g)*, 500(21.79), 21-66.
36. Yılmaz, S., ve Ergün, S. (2011). Effect of red pepper (*Capsicum annum*) on pigmentation of blue streak hap (*Labidochromis caeruleus*). *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 63.

37. Yılmaz, S., ve Ergün, S. (2012). Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of aquatic animal health*, 24(4), 219-224.
38. Yılmaz, S., ve Ergün, S. (2013). Chickweed (*Stellaria media*) Leaf Meal as a Feed Ingredient for Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Applied Aquaculture*, 25(4), 329-336.
39. Yılmaz, S., ve Ergün, S. (2014). Dietary supplementation with allspice *Pimenta dioica* reduces the occurrence of streptococcal disease during first feeding of Mozambique Tilapia fry. *Journal of aquatic animal health*, 26(3), 144-148.
40. Yılmaz, S., Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Gültepe, N., ve Ergün, S. (2015). Effects of dietary allspice, *Pimenta dioica* powder on physiological responses of *Oreochromis mossambicus* under low pH stress. *SpringerPlus*, 4(1), 1.
41. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Çelik, E. Ş. (2013). Effect of dietary herbal supplements on some physiological conditions of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of aquatic animal health*, 25(2), 98-103.
42. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Çelik, E. Ş. (2016). Effect of Dietary Spice Supplementations on Welfare Status of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(1), 229-237.
43. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Soytaş, N. (2013). Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Bio. Sci. Biotech*, 2(2), 117-124.
44. Yılmaz, S., Kaya, H., Gürkan, M., Hisar, O., Selvi, K., Türel, S., ... ve Çetin, S. Impacts of High Concentration of CO<sub>2</sub> on the Serum Biochemistry and Carbonic Anhydrase Enzyme Activity of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*.
45. Yigit, M., Bulut, M., Ergün, S., Güroy, D., Karga, M., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., ve Güroy, B. (2012). Utilization of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 6(1), 63.
46. Yildirim, O., Acar, U., Turker, A., Sunar, M. C., ve Yılmaz, S. (2013). Effects of Partial or Total Replacement of Fish Oil by Unrefined Peanut Oil on Growth and Chemical Composition of Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Bamidgeh*, 65.
47. Yılmaz, E., Ergün, S. ve Yılmaz, S. (2015). Influence of carvacrol on the growth performance, hematological, non-specific immune and serum biochemistry parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Nutrition Sciences*, 6(05), 523.
48. Yılmaz, S., ve Ergün, S. (2012). Tıbbi Bitki Özütlerinin Melek Balığı (*Pterophyllum scalare*) Yumurtasının Açılımı Üzerine Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2).
49. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Soytaş, N. (2013). Herbal supplements are useful for preventing streptococcal disease during first-feeding of tilapia fry, *Oreochromis mossambicus*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 65.
50. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Soytaş, N. (2013). Enhancement of growth performance and pigmentation in red *Oreochromis mossambicus* associated with dietary intake of astaxanthin, paprika, or capsicum.
51. Yılmaz, S., Ergün, S., ve Turk, N. (2012). Effects of cumin-supplemented diets on growth and disease (*Streptococcus iniae*) resistance of tilapia (*Oreochromis mossambicus*).

52. Yılmaz, S., Ergün, S., Kaya, H., ve Gürkan, M. (2014). Influence of Tribulus terrestris extract on the survival and histopathology of Oreochromis mossambicus (Peters, 1852) fry before and after Streptococcus iniae infection. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(5), 994-1000.
53. Yılmaz, S., Sarvan, C., Hisar, O., Karatas, S., Turgay, E., ve Katra, N. (2016). In vitro antimicrobial activities of extracts from ballan wrasse (Labrus bergylta) skin mucus.

b) Katıldığı Projeler

1. Organik Asit (Sinnamik Asit) veya Organik Asit+Probiyotik (*Bacillus subtilis*) Katkılarının Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Büyüme Performansı, Yağ Asit Kompozisyonu, Sağlık Karakteristikleri ve Hastalık Direnci (*Yersinia ruckeri*) Üzerine Etkileri, TÜBİTAK-1001, No: 113O364, Bursiyer, 2016
2. Tilapia'da (*Oreochromis niloticus*) Çinko Oksit Nanopartiküllerinin (ZnO- NPs) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz, Glutasyon ve Hemato-İmmun Parametreler Üzerine Etkileri, BAP Araştırma Projesi, FBA-2014-205, Araştırmacı, 2015
3. Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Alt Yapı Geliştirme Proje Başvurusu, BAP Alt Yapı, FAY-2014-256, Araştırmacı, 2014
4. Çevresel stresin triploid ve diploid gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularının hematolojik, immunolojik ve biyokimyasal kan parametreleri üzerine etkileri, BAP Araştırma Projesi, FBA-2014-354, Araştırmacı, 2015
5. Comparison of Growth Performance and Feed Utilization of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W., 1792) in Freshwater and Seawater with Environmental Effects for Life Cycle Assessment in Offshore Cage Systems with Copper Alloy Netting in the Northern Aegean Sea, ENV- 25686 A-12, Araştırmacı, 2014
6. Evaluation of Metal Contents in Various Tissues of Sea Bream Cultured to Market Size in Offshore Cage Systems with Copper Alloy Netting in the Northern Aegean Sea, TEK-1049-20, Araştırmacı, 2013
7. Phosalone'nin Sazan Balığındaki (*Cyprinus carpio* L., 1758) Kan Parametre Değişimleri ve Histopatolojik Etkilerinin Araştırılması, BAP Araştırma Projesi, 2010/80, Araştırmacı, 2014
8. Yeme Eklenen Bazı Tıbbi Bitkilerin Levrek Balığı (*Dicentrarchus labrax*)'nda Büyüme Performansı, Yem Kullanımı ve Kan Parametrelerine Etkisi, BAP Araştırma Projesi, 79, Araştırmacı, 2011

## İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Çankale Onsekiz Mart Üniversitesi, 2009-

## İLETİŞİM

E-posta Adresi :sevdanyilmaz@comu.edu.tr