ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Miray ETYEMEZ BÜYÜKDEVECİ

TİLAPYA (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) İÇİN KORUYUCU PROBİYOTİKLERİN ELDESİ: BÜYÜME PERFORMANSI VE *STREPTOCOCCUS İNİAE*'YE KARŞI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

ADANA, 2019

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİLAPYA (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) İÇİN KORUYUCU PROBİYOTİKLERİN ELDESİ: BÜYÜME PERFORMANSI VE *STREPTOCOCCUS İNİAE*'YE KARŞI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Miray ETYEMEZ BÜYÜKDEVECİ

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

Bu Tez / / Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……...	…….	…….
Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER	Prof. Dr. Mahmut Ali GÖKÇE	Prof.Dr. Ayşegül KUBİLAY
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE
……...	…….	
Doç.Dr. Behire IŞIL DİDİNEN	Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Erdem DÖNMEZ	
ÜYE	ÜYE	

Bu Tez Enstitümüz Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

TİLAPYA (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) İÇİN KORUYUCU PROBİYOTİKLERİN ELDESİ: BÜYÜME PERFORMANSI VE *STREPTOCOCCUS İNİAE*'YE KARŞI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Miray ETYEMEZ BÜYÜKDEVECİ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
Yıl: 2019, Sayfa: 147
Jüri : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
: Prof. Dr. Mahmut Ali GÖKÇE
: Prof.Dr. Ayşegül KUBİLAY
: Doç.Dr. Behire IŞIL DİDİNEN
: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Erdem DÖNMEZ

Bu çalışmada, Tilapya (*Oreochromis niloticus*)'nın bağırsak mukusundan izole edilen iki bacillus suşunun (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus mojavensis*) tilapyalarda büyüme performansı, bağırsak morfolojisi, doğal bağışıklık ve hastalık direncine karşı etkisi incelenmiştir. Toplam 375 balık bireyi üç tekerrür halinde beş gruba ayrılmıştır. Nil tilapyası, $1x10^6$ CFU/g (BM6;BS6) ve $1x10^8$ CFU/g (BM8;BS8) olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda probiyotik ve kontrol diyetler ile 60 gün beslenmiştir. Besleme denemesi sonrasında, probiyotik ilave edilmiş diyetler ile beslenen tilapya bireyleri, kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha iyi büyüme performansı göstermiştir. Işık mikroskobu incelemelerinde, probiyotikle beslenen tilapyanın bağırsaklarında kontrole kıyasla yüksek sayıda goblet hücreleri saptanmıştır ve bağırsak villus uzunluğunun ve perimetre oranının da arttığı gözlenmiştir. TEM incelemelerinde ise, probiyotik ile beslenen gruplarda kontrol grubuna kıyasla mikrovillus uzunluğu ve yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. Buna ek olarak, probiyotikle beslenen Tilapyaların bağırsak dokularında sitokin gen ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir. 60 günlük beslenmenin ardından, tilapya bireyleri i.p. yolla *Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiş, probiyotik ile beslenen gruplarda nispi yaşama oranlarının artığı görülmüştür. Elde edilen veriler, çalışmada kullanılan aday probiyotiklerin, tilapyanın büyüme performansı, bağırsak morfolojisi ve hastalığa karşı direncini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Tilapya, Gen Ekspresyonu, Bağırsak morfolojisi, Büyüme Performansı

ABSTRACT

PhD THESIS

ISOLATION OF PROTECTIVE PROBIOTICS FOR TILAPIA (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758): INVESTIGATION OF GROWTH PERFORMANCE AND PROTECTION AGAINST *STREPTOCOCCUS İNİAE*

Miray ETYEMEZ BÜYÜKDEVECİ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF AQUACULTURE

Supervisor : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
Year: 2019, Pages: 147
Jurry : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
: Prof. Dr. Mahmut Ali GÖKÇE
: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
: Assoc. Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN
: Assist. Prof. Dr. Ahmet Erdem DÖNMEZ

In the present study, the effects of two bacillus strains (*Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*), isolated from intestinal mucus of Tilapia (*Oreochromis niloticus*), on growth performance, intestinal morphology, innate immunity and disease resistance of fish were evaluated. A total of 375 indivual fish were divided into five groups in triplicate. Nile tilapia were fed a basal diet and probiotics at different concentrations of 1×10^6 (BM6;BS6) and 1×10^8 (BM8;BS8)(CFU/g) of feed for 60 days. After feding trial, probiotic-fed Tilapia showed significantly better growth performance than control group. Light microscopy observations revealed elevated goblet cells and intestinal villi length and perimeter ratio increase in the intestine of probiotic fed tilapia compared with control. Electron microscopy revealed an increase in microvilli length and density in probiotic fed tilapia compared with control. Additionally, probiotic-fed Tilapia showed significantly increased expression of cytokine genes in the intestine and protection against *Streptococcus iniae* compared to the control group. These data suggest that candidate probiotics used in the present study have positive effects on the growth performance, gut morphology and disease resistance of Tilapia.

Key Words: Probiotic, Tilapia, Gene expression, Gut Morphology, Growth Performance

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu tez çalışmasında, yetiştiriciliği dünyada en yaygın türlerden olan, ülkemizin bazı bölgelerinde de giderek yaygınlaşan, alternatif tür olma yönüyle öne çıkan tilapyanın, kendi doğal bağırsak florasından izole edilen *Bacillus subtilis* ve *Bacillus mojavensis* aday probiyotik bakteriler ile beslenmesinin, yetiştiriciliğinde major etken olarak bilinen *Streptococcus iniae* patojenine karşı koruyucu etkisi ile birlikte yem değerlendirme oranı, büyüme performansı, bağırsak morfolojisi ve immün ilişkili bazı sitokin genlerin ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneme planı, besleme denemesi ve bunu takiben eprüvasyon testleri olmak üzere iki aşamalı olarak kurgulanmıştır. Deneme grupları; Kontrol (probiyotik ilave edimeyen yem ile besleme), BM6 (1×10^6 CFU/g *Bacillus mojavensis*), BM8 (1×10^8 CFU/g *Bacillus mojavensis*), BS6 (1×10^6 CFU/g *Bacillus subtilis*), BS8 (1×10^8 CFU/g *Bacillus subtilis*) olarak oluşturulmuştur. Araştırma boyunca deneme gruplarındaki balıklar günde iki kez *ad libitum* metotla 60 gün süreyle beslenmiştir. Başlangıç ağırlık ortalamaları 52.78 ± 0.31 g olan balıkların, 60. gün sonundaki son ağırlıkları tüm gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p<0.05$). BS8 grubu (140.83±2.90 g) en yüksek final ağırlığa sahip iken bu grubu sırasıyla BM6 grubu (140.70±3.66 g), BS6 grubu (140.35±2.76 g), BM8 grubu (137.69±2.73 g) ve kontrol grubu (132.80±1.85 g) takip etmiştir. Besleme denemesinin sonunda, kontrol grubu (%152.28) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir Oransal Büyüme Oranı (OBO) sergilemiş, en yüksek OBO'nun %166.89 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir. Spesifik Büyüme Oranı değerleri incelendiğinde ise, 1.64±0.03 ile BS8 grubunda en yüksek olduğu belirlenmiştir. Yem değerlendirme parametrelerine bakıldığında denemenin sonunda, kontrol grubu (1.11±0.03) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha yüksek bir yem çevirim oranı (YÇO) göstermiş, en iyi yani düşük YÇO değerinin 1.01±0.02 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir. Büyüme parametreleri genel olarak deneme

grupları arasında değerlendirildiğinde yeme 10^8 CFU/g dozda eklenen *Bacillus subtilis* bakterisinin tilapyalarda büyüme performansını önemli ölçüde arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin anteriyor bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler sonucunda, villus boyu, goblet hücresi sayısı, perimetre oranı, mikrovilli uzunluğu ve yoğunluğu gibi parametrelerin probiyotik ile beslenen balıkların bağırsak dokularında kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, yeme probiyotik ilavesinin sindirim sistemini geliştirerek daha iyi sindirim sağladığı ve büyüme performansındaki artışın gelişen histomorfolojik özelliklerle orantılı olduğu belirlenmiştir. Özellikle günlük yem alımları düşük olan BS8 grubundaki balıkların en yüksek canlı ağırlık artışına sahip olmasının bağırsak dokularındaki histomorfolojik özelliklerinin gelişiminden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Probiyotik olarak *Basillus subtilis*'in 10^6 ve 10^8 CFU/g dozları ile *Bacillus mojavensis*'in 10^6 CFU/g dozunun yem katkısı olarak kullanılmasının anteriyor bağırsak morfolojisi üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir.

TGF-β (Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta) gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 gruplarının bağırsak dokularında yaklaşık 6.38, 6.23, 7.08, 9.93 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. IL-10 (Interlökin 10) gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 grupların bağırsak dokularında yaklaşık 5,82, 7.37, 11.68, 18 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. TNF-α (Tümör Nekroz Faktörü Alfa) gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm grupların kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 gruplarının bağırsak dokularında yaklaşık 11.71, 6.33, 14.17 ve 21.5 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. IL-1β (Interlökin 1 Beta) gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm

gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 grupların bağırsak dokularında yaklaşık 4.24, 2.47, 4.59, 8.71 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. Sitokin gen ekspresyon seviyeleri genel olarak değerlendirildiğinde, daha önce konuyla ilgili yapılan çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da kullanılan probiyotik bakterilerin, balığın bağırsak dokusunda antiinflamatuar (TGF-β ve IL-10) ve proinflamatuar (TNF-α, IL-1β) sitokinlerin ekspresyonunu kontrol grubuna göre artırdığı görülmüştür.

B.mojavensis ile beslenen gruplarda doz artışıyla birlikte HSP70 ekspresyon seviyesinin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). BM8 grubu hariç, kontrol grubu ile farklı dozlarda probiyotik ilave edilen yemlerle beslenen diğer gruplarda HSP70 mRNA seviyesindeki katlı değişim, istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Yapılan bu çalışmada probiyotiklerin HSP70 gen ekspresyonu üzerine elde edilen farklı sonuçların, balık türlerine, büyüklüğüne, bakteri suşuna, dozuna, probiyotiğin veriliş yöntemine, uygulama süresine ve kültür koşullarına bağlı olarak değişebileceği düşünülmüştür.

Elde edilen iki potansiyel probiyotik suşun, tilapya balıklarında *Streptococcus iniae*'ye karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek için tilapyalar (60. gün) besleme denemesinin sonunda, *Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiştir. Eprüvasyon uygulaması sonrasında balıklardaki RPS (Nispi Yaşama Oranı Yüzdesi) değerleri incelendiğinde, BM6, BM8, BS6 ve BS8 grubundaki balıklarda RPS değerleri sırasıyla %60, %40, %65 ve %70 olarak tespit edilmiştir. Tilapya bireylerinde *B.subtilis'*in 10^8 CFU/g doz uygulaması *Streptococcus iniae*'ya karşı diğer gruplara göre daha etkin bir koruma sağlamıştır. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan aday probiyotiklerin tilapyanın büyüme performansı ve bağırsak morfolojisini olumlu yönde etkilediği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, *S. iniae* patojenine karşı da koruma sağladığı belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda en etkili aday probiyotik bakteri türünün *Bacillus subtilis*, en etkili doz uygulamasının ise bu tür için 10^8 CFU/g olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan bir diğer aday probiyotik bakteri olan *Bacillus*

mojavensis türü için ise 10^6 CFU/g doz uygulamasının daha etkili olduğu ancak tilapyalarda bu suş için daha düşük dozların da denenebileceği düşünülmüştür.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimin her aşamasında ve tez çalışmam süresince geniş bilgi birikimi ve yardımını esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her an bana zaman ayıran değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama sundukları bilimsel katkılar için tez komisyon üyeleri saygıdeğer hocalarım Prof.Dr. Mahmut Ali GÖKÇE, Prof.Dr. Ayşegül KUBİLAY, Doç.Dr. Behire Işıl DİDİNEN ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Erdem DÖNMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Denemenin ön çalışmalarının gerçekleştirildiği ICRA Araştırma Enstitüsünden Dr. Jose Luis BALCAZAR'a, besleme denemelerinin kurulması ve yürültülmesindeki bilgi ve birikimlerini paylaşan Prof. Dr. Suat DİKEL'e, doktora çalışmamın mikrobiyolojik analizlerinde kendi laboratuvar olanaklarını sunan ve yardımcı olan Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a, histolojik analizlerin gerçekleştirilmesinde yönlendirici fikirleri ve katkılarından dolayı Dr. Öğr. Gör. İbrahim DEMİRKALE'ye ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Deneme ve laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerini paylaşmanın yanı sıra manevi yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Öğr. Gör. Suna KIZILYILDIRIM, Öğr. Gör. Serdar KİLERCİOĞLU, Öğr. Gör. Celal ERBAŞ, Arş. Gör. Ece EVLİYAOĞLU, Doktora Öğrencisi Bedrettin DUMAN'a, tez denemelerinin kurulması ve yürütülmesi esnasında yardımını esirgemeyen Dr. Nazmi TEKELLİOĞLU Araştırma ve Uygulama İstasyonu personeli Ali ÖZDEŞ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her döneminde olduğu gibi eğitim hayatımın tüm aşamasında desteğini yanımda hissettiğim çok değerli aileme ve eşim Ferhat BÜYÜKDEVECİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XII
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XX
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Tilapya Yetiştiriciliği 5
2.2. Streptokok İnfeksiyonu 7
2.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri ve Etki Mekanizmaları 10
2.4. Balıklarda Gastrointestinal Sistem Mikrobiyatası 16
2.5. Balıklarda Bağışıklık Sistemi 19
2.5.1. Balıklarda Bağışıklıkta Rol Oynayan Bazı Sitokinler ve Hsp70 Proteini 22
2.6. Probiyotik Bakteri Uygulamalarının Tilapyalar Üzerine Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar 24
3. MATERYAL VE METOD 43
3.1. Materyal 43
3.1.1. Denemede Kullanılan Balıklar, Uygulama Yeri ve Koşulları 43
3.1.2. Denemede Kullanılan Potansiyel Probiyotik Bakteriler ile Patojen Bakteri 44
3.1.3. Denemede Kullanılan Ticari Yem 45
3.2. Metod 45
3.2.1. *Bacillus* sporlarının ve Probiyotikli Yemlerin Hazırlanışı 45

3.2.2. Deneme Dizaynı Organizasyonu 48
3.2.3. Probiyotik Bakterilerin *in vivo* koşullarda *Streptococcus iniae* patojenine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi; Balıkların *Streptococcus iniae* ile Eprüvasyonu 49
3.2.4. Probiytotik bakterilerin Tilapyaların Büyüme Performası Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 50
3.2.4.1. Büyüme Parametrelerinin Hesaplanması 50
3.2.4.2. Yem Değerlendirme Parametrelerinin Hesaplanması 50
3.2.4.3. Kondüsyon Faktörü 50
3.2.4.4. Hepatosomatik İndeksin Hesaplanması 50
3.2.4.5. Viserosomatik İndeksin Hesaplanması 51
3.2.4.6. Yaşama Oranının Hesaplanması 51
3.2.5. Probiyotik Bakterilerin Balıkların Bağışıklık sistemi üzerine olan etkilerinin gen ekspresyonu ile belirlenmesi 51
3.2.5.1. Total RNA izolasyonu 51
3.2.5.2. cDNA Sentezi 53
3.2.5.3. RT-PCR Prosedürü 53
3.2.6. Probiytotik bakterilerin Tilapyaların Bağırsak Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi: Histolojik Değerlendirme 56
3.2.6.1. Histolojik Takip, Boyama ve İnceleme 56
3.2.6.1.(1). Işık Mikroskopi Yöntemleri 56
3.2.6.1.(2). Elektron Mikroskopi Yöntemleri 62
3.2.7. İstatistiksel Analizler 64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 67
4.1. Bulgular 67
4.1.1. Büyüme Parametreleri 67
4.1.1.1. Canlı Ağırlık Olarak Büyüme 67
4.1.1.2. Oransal Büyüme Oranı 68
4.1.1.3. Spesifik Büyüme Oranı 70

4.1.1.4. Boyca Büyüme 72
4.1.2. Yem Değerlendirme Parametreleri 73
4.1.2.1. Yem Çevirim Oranı 73
4.1.2.2. Günlük Yem Alım Oranı 75
4.1.3. Kondüsyon Faktörü 77
4.1.4. Hepatosomatik İndeks 78
4.1.5. Viserosomatik İndeks 79
4.1.6. Yaşama Oranı 79
4.1.7. Bağırsak Dokusundan Elde Edilen Histomorfometrik Bulgular 80
4.1.7.1. Villus Boyu, Perimetre Oranı Ölçümleri ve Goblet Sayısı 80
4.1.7.2. Mikrovilli Uzunluğu Ölçümleri ve Mikrovilli Yoğunluğu 85
4.1.8. Bağırsak Dokularında HSP70 ve Sitokinlerin mRNA Katlı Değişim Seviyeleri 89
4.1.8.1. HSP70 Gen Ekspresyon Seviyeleri 89
4.1.8.2. TGF-β Gen Ekspresyon Seviyeleri 90
4.1.8.3. IL-10 Gen Ekspresyon Seviyeleri 91
4.1.8.4. TNF-α Gen Ekspresyon Seviyeleri 93
4.1.8.5. IL-1β Gen Ekspresyon Seviyeleri 95
4.1.9. Probiyotik Bakteriler ile Beslenen Tilapya'larda *Streptococcus iniae* Eprüvasyon Uygulaması Bulguları 96
4.1.9.1. Enfekte Balıkların Klinik ve Otopsi Bulguları 98
4.2. Tartışma 100
4.2.1. Büyüme Parametreleri, Yem Değerlendirme Oranları ve Somatik İndeksler 100
4.2.2. Probiyotik ile Beslenen Tilapyaların Bağırsak Dokularında Histomorfometrik Değişimler 105
4.2.3. Probiyotik ile Beslemenin Tilapyaların Bağırsak Dokularında İmmün İlişkili bazı Sitokin Genler ile HSP70 Üzerine Etkileri 107

4.2.4. Probiyotik ile beslemenin Tilapyalarda *Streptococcus iniae* patojenine karşı etkisi 112
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 115
KAYNAKLAR 119
ÖZGEÇMİŞ 143
EKLER 145

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 2.1. *Streptococcus iniae*'nin fenotipik özellikleri 9
Çizelge 3.1. Deneme Dizaynı Organizasyonu 48
Çizelge 3.2. Hedef Genlerin Tespitinde Kullanılan Primerler 54
Çizelge 3.3. Ekspresyonda Kullanılan Reaksiyon Karışımın Hazırlanması 55
Çizelge 3.4. Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı 56
Çizelge 3.5. Işık Mikroskobu Doku Takip Protokolü 57
Çizelge 3.6. Hematoxylen-Eosin Boyama Yöntemi 58
Çizelge 3.7. Masson's–Trichrome Boyama Yöntemi 59
Çizelge 3.8. Millonig Fosfat Tamponunun Hazırlanışı 62
Çizelge 3.9. %5'lik Glutaraldehit Solüsyonun Hazırlanışı 62
Çizelge 3.10. %1'lik Osmiyum Tetraoksit Solüsyonun Hazırlanışı 63
Çizelge 3.11. Elektron Mikroskobu Doku Takip Protokolü 63
Çizelge 3.12. Gömme materyali içeriği 64
Çizelge 4.1. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının ölçüm dönemlerine göre canlı ağırlık ortalamaları 67
Çizelge 4.2. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlıkça oransal büyüme (OBO)(%) değerleri 69
Çizelge 4.3. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların spesifik büyüme oranı (SBO)(% gün^{-1}) değerleri 70
Çizelge 4.4. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının total boy ortalama (cm) değerleri 72
Çizelge 4.5. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının yem çevirim oranları 73
Çizelge 4.6. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının günlük yem alım oranları 75

Çizelge 4.7. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının kondüsyon faktörü değerleri 77
Çizelge 4.8. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının Hepatosomatik indeks değerleri 78
Çizelge 4.9. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının Viserosomatik indeks değerleri 79
Çizelge 4.10. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler 80
Çizelge 4.11. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan mikrovilli uzunluğu ölçümleri ve mikrovilli yoğunluğu 85
Çizelge 4.12. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda HSP70 mRNA düzeylerinin katlı değişim seviyeleri 89
Çizelge 4.13. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TGF-β mRNA katlı değişim seviyeleri 90
Çizelge 4.14. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-10 mRNA katlı değişim seviyeleri 92
Çizelge 4.15. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TNF-α mRNA katlı değişim seviyeleri 93
Çizelge 4.16. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-1β mRNA katlı değişim seviyeleri 95

Çizelge 4.17. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen ölüm oranları (%)..... 97

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 2.1. Toplam Tilapya Üretim Miktarları ve Ticari Değeri 5
Şekil 2.2. *Oreochromis* cinsine ait türlerin üretim oranları 6
Şekil 2.3. Ülkelere göre *O. niloticus* türüne ait üretim miktarları. 7
Şekil 2.4. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Seçimi için İzlenecek Yol ... 12
Şekil 2.5. İntestinal sistemdeki kommensal bakterilerin patojene karşı koruma yolu 14
Şekil 3.1. Denemelerin Yürütüldüğü Sera Ünitesi 44
Şekil 3.2. Deneme Yemlerinin Hazırlanışı ve Yemdeki Probiyotik Bakteri Konsantrasyonlarının Kontrolü 47
Şekil 3.3. RNA İzolasyon Aşamaları 52
Şekil 3.4. cDNA Sentezi Aşamaları 53
Şekil 3.5. RT-PCR Hazırlık Aşaması 54
Şekil 3.6. Doku takibi ve Boyama işlemleri 57
Şekil 3.7. Villus Yüksekliğinin Ölçülmesinde Kullanılan Referans Noktaları 60
Şekil 3.8. Bağırsak Çevre Oranını Ölçmek İçin İzlenen Prosedür 61
Şekil 4.1. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlık olarak büyüme eğrisi 68
Şekil 4.2. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlıkça oransal büyüme oranları 70
Şekil 4.3. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının canlı ağırlıkça spesifik büyüme oranları 72
Şekil 4.4. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının boyca büyüme eğrisi 73
Şekil 4.5. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının yem çevirim oranları 75
Şekil 4.6. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının günlük yem alım oranları 77

Şekil 4.7. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının kondüsyon faktörü değerleri..... 78
Şekil 4.8. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler 82
Şekil 4.9. Villus boyunca epitel içinde goblet hücrelerin görünümü E: Epitel, LP: Lamina propria, GH: Goblet Hücresi, L: Lümen 83
Şekil 4.10. M-T(A-E) ve H&E(a-e) ile boyanmış barsak kesitleri; A, a- Kontrol, B,b - BM6, C, c- BM8, D, d- BS6, E,e- BS8 Grubu. Bar: A-E: 120µ, a-e: 60µ 84
Şekil 4.11. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler 86
Şekil 4.12. Geçirimli Elektron Mikroskobisinde Deneme Gruplarına ait Microvilli Görünümleri. A- Kontrol, B- BM6, C- BM8, D- BS6, E- BS8 Grubu. 87
Şekil 4.13. Geçirimli Elektron Mikroskobisinde Barsak Yüzey Absorbsiyon Hücreleri, Goblet hücreleri ve Hücre içi Organeller. YAH: Yüzey Absorbsiyon, MV: Mikrovilli, tw: Terminal Web, L: Lizozom, M: Mitokondri, L: Lümen, Dez: Desmosom, G: Goblet, TJ: Tight Junction 88
Şekil 4.14. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda HSP70 mRNA katlı değişim seviyeleri 90
Şekil 4.15. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TGF-β mRNA katlı değişim seviyeleri 91

Şekil 4.16. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-10 mRNA katlı değişim seviyeleri 93
Şekil 4.17. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TNF-α mRNA katlı değişim seviyeleri 94
Şekil 4.18. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-1β mRNA katlı değişim seviyeleri 96
Şekil 4.19. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen ölüm oranları (%)..... 97
Şekil 4.20. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen nispi yaşama oranı yüzdeleri (RPS)..... 98
Şekil 4.21. Enfeksiyon sonrası Tilapya bireylerinde gözlemlenen klinik bulgular 99
Şekil 4.22. Enfeksiyon sonrası Tilapya bireylerinde gözlemlenen internal bulgular 100

SİMGELER VE KISALTMALAR

HSP 70 : Isı Şok Proteini 70
CA : Canlı ağırlığı
YÇO : Yem Çevirim Oranı
OBO : Oransal Büyüme Oranı
SBO : Spesifik Büyüme Oranı
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO : World Health Organization
GYA : Günlük Yem Alımı
HSI : Hepatosomatik İndeks
VSI : Viserosomatik İndeks
MT : Masson's Trichrome
HE : Hematoksilen Eosin
mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit
cDNA : Komplementer Deoksiribonükleik Asit
IL-1ß : Interlökin 1 Beta
TGF-β : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF-α : Tümör Nekroz Faktörü Alfa
IL-10 : İnterlökin 10
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi
CT : Eşik Döngüsü
TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Sucul ortamda, balıkların çevresel kalite parametreleri ile hastalık durumu arasında ters bir ilişki vardır. Çevresel koşullar bozulduğunda, bulaşıcı hastalıkların şiddeti artar; bu nedenle, sağlıklı balıkların yetiştirilebileceği uygun bir ortamın sağlanmasında sağlık yönetimi uygulamaları önemli rol oynamaktadır. Balık sağlığı yönetimi, hastalıkların önlenmesine yardımcı olan, hastalık döngüsünün kesintiye uğratıldığı ve daha verimli bir üretimin gerçekleştirilmesine yardımcı olan olumlu bir kavramdır. Stres ise, biyolojik varlığa fiziksel, kimyasal veya biyolojik etki ulaştığında o varlığın göstermiş olduğu tepkiler bütünlüğüdür. Balıklarda temel olarak strese neden olan faktörler; aşırı stoklama yoğunluğu, besleme uygulamalarındaki hatalar, tedavi amacıyla uygulanan her türlü medikament ve çevresel faktörlerin (su sıcaklığı, pH, oksijen, çözünmüş gazlar) değişimi olarak sıralanabilmektedir (Cengizler, 2006).

Üretim tesislerinde balıklarda meydana gelen stres, hastalık ve çevre koşullarının bozulması ile ilgili sorunlar ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıkların kontrolü ve tedavisi son yıllarda medikament kullanımında önemli bir artışa neden olmuştur. Önleyici tedbir olarak kullanılan kemoterapötik ajanların yararı sorgulanmış, çevre kirliliği, rezidü, antibiyotik direncinin ortaya çıkması gibi sorunlar da alternatif koruma ve tedavi yollarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle çevre dostu sürdürülebilir yetiştiriciliğe olan talep ile birlikte probiyotiklerin kullanımı su ürünleri yetiştiriciliğinde artarak önem kazanmaktadır (Gatesoupe, 1999).

Probiyotik terimi, yunanca kökenli ‘pros’ ve ‘bios’ kelimelerinden türemiş olup, ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk kez 1965 yılında Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar tarafından, “Bir mikroorganizma tarafından salgılanıp başka birinin büyümesini destekleyen bileşikler” olarak tanımlanmıştır (Lilly ve Stillwell, 1965). Daha sonra, Parker (1974) probiyotik kelimesinin tanımını bugünkü kullanımına en yakın anlamda “bağırsak dengesine yardım eden

organizmalar ve maddeler" olarak geliştirmiştir. En geniş probiyotik tanımı Fuller (1989) tarafından yapılmış olup, probiyotikleri "bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçı hayvanda yararlı etkiler sağlayan ve böylece hayvanların yemden yararlanmasını artıran, ağız yoluyla veya yeme ilave edilerek verilen canlı mikrobiyal yem katkı maddeleri" olarak tanımlamıştır.

FAO ve WHO ise probiyotikleri; yeterli miktarda uygulandıklarında konak sağlığı üzerinde fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamışlardır (FAO/WHO Report, 2002). Yetiştiricilikte biyolojik kontrol ajanı olarak önerilen probiyotiklerin; konağın intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik ettiği, tüketilmeleri sonucunda sindirim sistemindeki yararlı etkileriyle konağın sağlığında iyileşme ve hızlı büyümeye neden olduğu, sudaki organik yükün mineralizasyonuna yardımcı olarak kalitesinin düzeltilmesinde kullanıldığı bildirilmiştir (Koca ve ark., 2011). Probiyotik olarak önerilen bakteri gruplarının çoğunluğunu Laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* ve *Carnobacterium*), *Vibrio* (*V. alginolyticus*), *Bacillus* ve *Pseudomonas*, *Aeromonas* ve *Flavobacterium* cinsine ait bakterilerin olduğu bildirilmiştir (Balcazar ve ark., 2006).

Çeşitli antagonistik bileşikler üreten, spor oluşturan bakteriler arasında *Bacillus* genusuna ait bazı türler, su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nayak , 2010; Dawood ve Koshio, 2016; AlGburi ve ark., 2016). Probiyotik olarak kullanılan Bacillus türlerinin *B. subtilis, B. cereus, B. coagulans, B. clausii, B. megaterium* ve *B. licheniformis* olduğu bildirilmiştir (Oggioni ve ark., 2003). Spor oluşturanlar arasında *Bacillus* sporları, probiyotik olarak, immünostimülatör özelliklerinden dolayı insan ve hayvan uygulamalarında rutin olarak kullanılmakta (Casula ve ark., 2002; Hong ve ark., 2005) ve genel olarak *Bacillus subtilis*'in insan ve hayvanlarda kullanımının güvenli olduğu (GRAS) kabul edilmektedir (AlGburi ve ark., 2016). Sporlar *Lactobacillus* sp. gibi diğer spor oluşturmayan formlara göre bazı avantajlara sahiptir. Isıya dayanıklı olmaları ve mide bariyerinin düşük pH'sından etkilenmeyip hayatta kalabilmeleri bu avantajlardan en önemlileridir (Huang ve ark., 2008). Bunun yanı sıra spor

oluşturma kabiliyetleri sayesinde, yem formülasyonlarında canlılıkları ve stabiliteleri diğer probiyotik bakterilere göre oldukça gelişmiştir (Hong ve ark., 2005). *Bacillus* türü, tek bir endospor (spor) oluşturan gram pozitif çubuklardır. Sporun fiziksel ve biyolojik özellikleri nedeniyle, bu preparatların toz veya distile sudaki spor süspansiyonlarının çevreye çok dayanıklı formlar olduğu, uzun bir raf ömrüne sahip olduğu ve ayrıca su ürünleri yetiştiriciliği için üretim maliyetinin de düşük olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008).

Tilapyanın 2016 yılı itibariyle dünyadaki üretimi 5.9 milyon tona ulaşarak büyüme oranı önemli derecede artmış, sazan üretiminin hemen ardından ikinci sıraya yerleşmiştir. Benzer şekilde pazar değeri de 2016 yılında 11.29 milyar USD'a ulaşmıştır (FAO, 2018).

Önceleri Tilapyanın, yetiştiriciliği yapılan diğer türlere kıyasla tüm hastalık etmenlerine daha dirençli olduğu düşünülmekteydi (Popma ve ark., 1999, Klessius ve ark., 2008, Amal ve Zamri-Saad, 2011). Ancak yakın zamanda, tilapyanın da birçok hastalık etmenine duyarlı olduğu görülmüştür. Tilapya'da en sık görülen bakteriyel patojenler; *Streptococcus* spp., *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophila* ve *Edwardsiella tarda*'dır (Iregui ve ark., 2004, Klessius ve ark., 2008). 2008 yılında 250 milyon USD olarak hesaplanan ve ciddi ekonomik kayba neden olan en önemli sağlık probleminin *Streptococcus* genusuna ait enfeksiyonların olduğu bildirilmiştir (Klessius ve ark., 2008, Gültepe ve ark., 2014). Dünya genelinde tilapya endüstrisinde hastalığa neden olan en önemli *Streptococcus* türleri başta *S. iniae* olmak üzere *S. agalactiae, S. dysgalactiae* ve *Lactococcus garviae* 'dir (Evans ve ark., 2006; Netto ve ark., 2011; Welker ve Lim, 2011).

Bugüne kadar farklı balık türlerinde probiyotiklerin etkisi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen tilapyada probiyotiklerin kullanımı üzerine sınırlı sayıda araştırma mevcuttur (Hai., 2015).

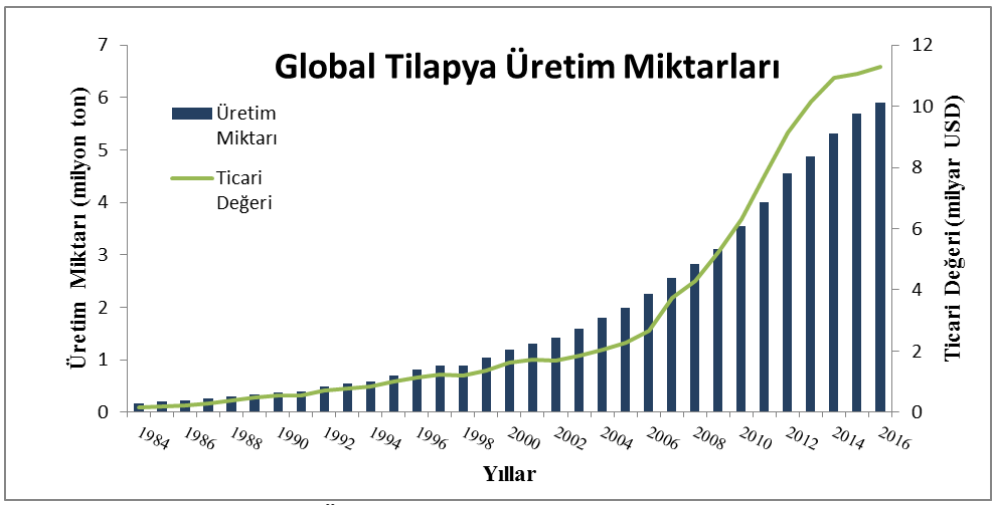
Kurgulanan bu tez çalışmasında yetiştiriciliği dünyada en yaygın türlerden biri olan, ülkemizin bazı bölgelerinde de giderek yaygınlaşan ve alternatif tür olma yönüyle öne çıkan tilapyanın, kendi doğal bağırsak florasından izole edilen

Bacillus subtilis ve *Bacillus mojavensis* aday probiyotik bakteriler ile beslenmesinin, yetiştiriciliğinde başlıca hastalık etkeni olarak bilinen *Streptococcus iniae* patojenine karşı koruyucu etkisi ile birlikte yem değerlendirme oranı, büyüme performansı, bağırsak morfolojisi ve immün ilişkili bazı genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilecek verilerin yetiştiricilik sektöründe uygulamaya dönük olması yönüyle önem taşımaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tilapya Yetiştiriciliği

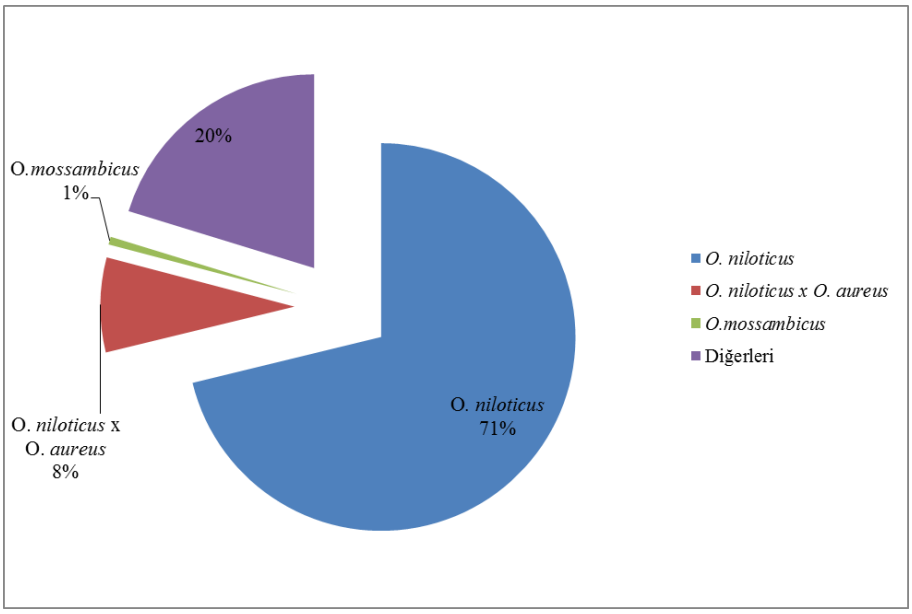
Tilapya, Cichlidae familyasına ait ekonomik olarak önemli "*Tilapia, Sarotherodon* ve *Oreochromis*" balık türünün genel adıdır (Fitzsimmons, 2000). Tilapya yetiştiriciliğinde en yüksek üretim, gelişmekte olan ülkelerde tropik ve subtropikal bölgelerde gerçekleşmektedir. Ancak daha ılıman ülkelerde de üretim, kapalı devre sistemleriyle yapılmaktadır. Tilapya, su ürünleri yetiştiriciliği için bu türü popüler bir seçenek haline getiren bir dizi özelliğe sahiptir. Bunlar arasında; hızlı büyüme, fiziksel ve çevresel koşullara geniş tolerans, stres ve hastalığa karşı nispi direnç, kısa bir üretim süresine sahip olma ve düşük maliyetli beslemeyi yüksek kaliteli proteine dönüştürebilme özellikleri yer almaktadır (El-Sayed, 2006). Toplam tilapya üretimi 2016 yılı itibari ile 5.9 milyon ton, pazar değeri ise 11.29 milyar dolara ulaşmıştır (Şekil 2.1.) (FAO, 2018).



Şekil 2.1. Toplam Tilapya Üretim Miktarları ve Ticari Değeri (FAO, 2018)

Su ürünleri yetiştiriciliği için önemli olan türler *Oreochromis* cinsine ait türlerdir ve bunlar; Nil tilapyası, *O. niloticus*; Mozambik tilapyası, *O.*

mossambicus; Mavi tilapya, *O. aureus* ve hibrit türleri içermektedir (Şekil 2.2.) (Fitzsimmons, 2000; Lim ve Webster, 2008).

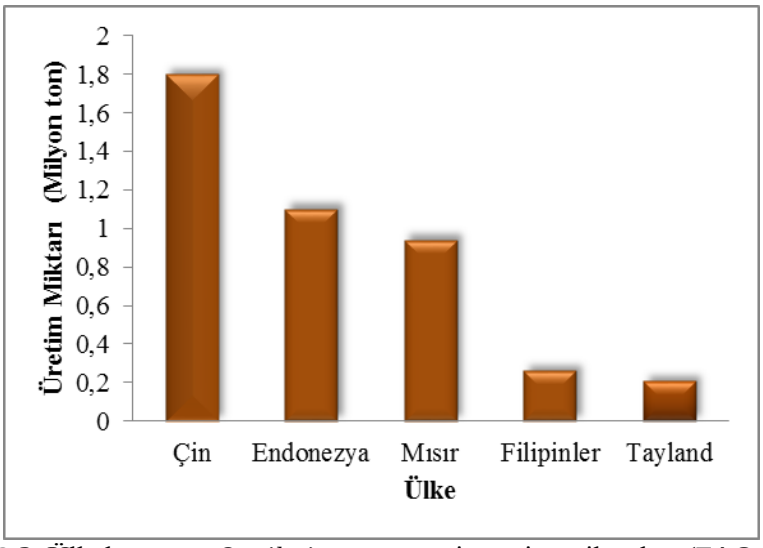


Şekil 2.2. *Oreochromis* cinsine ait türlerin üretim oranları (FAO, 2018)

Bununla birlikte, Nil tilapyası (*O. niloticus*), diğer türlere göre hızlı büyümesi, genç yaşta cinsel olgunluğa erişmesi, çevresel koşullara karşı yüksek toleransı ve omnivor besleme alışkanlıkları nedeniyle dünyada en yaygın kültürü yapılan tilapya türüdür (Winfree ve Stickney, 1981; Twibell ve Brown, 1998; Dikel, 2009).

Tilapya yetiştiriciliğinin günümüzden 4000 yıl öncesinde eski Mısır dönemiminde başladığı düşünülmektedir. Gupta ve Acosta (2004)'ya göre, bilimsel olarak ilk kaydedilen tilapya kültürünün 1924'te Kenya'da gerçekleştirildiği ve buradan Afrika'ya yayıldığı bildirilmiştir. Tilapya kültürü 1950'den 1970'e kadar yavaş bir büyüme sergilemiş ancak 1980'lerde hız kazanmıştır. 1978 yılında Nil Tilapyası, tilapya üretiminde dünyaya liderlik eden ve 1992'den beri sürekli olarak küresel üretimin yarıdan fazlasını üreten Çin'e tanıtılmıştır (Xia, 2000).

FAO, 135 ülkede özellikle Çin (~ 1,8 milyon ton), Endonezya (~ 1,2 milyon ton), Mısır (~940, 330 ton), Filipinler (~ 259, 045 ton) ve Tayland (~ 208, 144 ton)' da tilapya üretimini kaydetmiştir (FAO, 2018). Çin, bu üretim miktarıyla şu anda en büyük üretici, tüketici ve ihracatçı konumundadır (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Ülkelere göre *O. niloticus* türüne ait üretim miktarları (FAO, 2018).

2.2. Streptokok İnfeksiyonu

Streptokoklar dünyanın çeşitli yerlerinde tatlı su ve deniz balıkları türlerinde hastalık salgınlarıyla ilişkili olan hemolitik, gram-pozitif, kok şeklindeki bakterilerdir (Eldar ve Ghittino, 1999). Streptokokozis farklı cins ve türlerin neden olduğu hastalığın ortak bir adıdır ve klinik olarak iki gruba ayrılmaktadır. "Sıcak su" streptokokozis olarak bilinen hastalık (15°C su sıcaklığı üzerinde hastalık ve mortaliteye neden olan) *Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae, Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus agalactiae* etkenlerinden kaynaklanırken, vagokokkozis olarak bilinen hastalık (15°C su sıcaklığının altında hastalık ve mortaliteye neden olan) ise *Vagococcus salmoninarum* etkeninden kaynaklanmaktadır (Öztürk ve Altınok, 2014).

Dünya genelinde tilapyalarda en sık olarak bildirilen streptokokosiz enfeksiyonu etkenleri ise *S. iniae ve S. agalactiae'*dir.

Streptococcus iniae ilk kez 1976 yılında tatlı su yunusu (*Inia geoffrensis*)'ndan izole edilmiştir (Pier ve Madin 1976). Sonrasında çoğunluğu Japonya ve Amerika Birleşik Devletlerinde olmak üzere çiftliklerde daha fazla streptokok infeksiyonu ölüm nedeni olarak tanımlanmıştır (Kitao ve Aoki, 1981; Kusuda ve ark., 1979).

Bu güne kadar tilapya, sarıkuyruk, çipura, alabalık, levrek gibi türleri içeren otuzdan fazla balık türünü enfekte ettiği bildirilmiştir (Agnew ve Barnes, 2007; Cheng ve ark., 2010). Bu hastalık dünya su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmakta ve bu kaybın yılda 150 milyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (Shoemaker ve ark., 2001). Su ürünleri yetiştiriciliğindeki önemine ek olarak, *S. iniae*, zoonoz karakteri nedeniyle, enfekte balıkların işlenmesinde meydana gelen yaralanmalardan kaynaklı enfekte olmuş insanlardan izole edilmesinden dolayı da halk sağlığına bir tehdit olarak ortaya çıkmıştır (Facklam ve ark., 2005; Sun ve ark., 2007).

Streptococcus iniae gram pozitif koklardır ve sıvı besiyerinde üretildiklerinde uzun zincirler oluştururlar (Agnew ve Barnes, 2007). Kanlı agarda 28-37 °C'de, 24-48 saat inkübasyonda α/β hemolitik, küçük beyaz koloniler meydana getirirler (Plumb ve Hanson, 2011). Ayrıca *S. iniae'* nin izolasyonu için talyum asetat-oksolinik asit ya da kolistin sülfateoksolinik asit ile kombine edilen Brain-Heart İnfüzyon Agar ve Todd-Hewitt Broth'un etkili olduğu bildirilmiştir. (Nguyen ve Kanai, 1999; Nguyen ve ark., 2002). Streptokok türlerinin tanımlanmasında kültür yöntemleri, biyokimyasal testler, enzim reaksiyonları, fenotipik testler ve hücre yağ asidi analizleri kullanılmaktadır (Klesius ve ark., 2006). Bunun yanı sıra tür düzeyinde bakterilerin tanımlanabilmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) gibi moleküler tanı teknikleri de kullanılmaktadır. *S. iniae'*nin tanı ve tespitinde hızlı, duyarlı ve spesifik çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Günümüzde 16S rRNA, chaperonin HSP60, 16S-23S rRNA

intergenik spacer bölgesi ve laktat oksidaz (*lctO*) genlerinin amplifikasyonu, *S. iniae*' nin tanımlanmasında başarıyla kullanılan PCR bazlı moleküler tekniklerdir (Al-Harbi, 2011).

Streptococcus iniae'nin fenotipik özellikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *Streptococcus iniae*'nin fenotipik özellikleri (Plumb ve Hanson, 2011; Austin ve Austin, 2012)

Karakteristik Özellikleri	***S.iniae***
Hücre Morfolojisi	**Kok**
Gram Boyama	**+**
Hareketlilik	**-**
Aerobik Üreme	**+**
Katalaz	**-**
Oksidaz	**-**
O/F	**F**
10C'de üreme	**-**
45C'de üreme	**-**
%6.5 NaCl üreme	**-**
Hemoliz	**α/β**
Eskulin Hidrolizi	**+**
Laktoz	**-**
Mannitol	**+**
Rafinoz	**-**
Salisin	**+**
Sorbitol	**-**
Trehaloz	**+**
Vages-Proskauer	**-**
Glukoz	**+**
MacConkey Agar	**-**
H_2S Üretimi	**-**
Lancefield Grup	**-**

Yapılan çalışmalarda hastalığın bulaşma şeklinin; enfekte balıktan, kontamine yemden (Shoemaker ve ark., 2000; Bromage ve Owens, 2002), kontamine sudan (Rasheed ve Plumb, 1984) ve deneysel amaçlı intraperitonal veya intramuskuler enjeksiyon yoluyla (Shoemaker ve ark., 2000, 2001; Bromage ve Owens, 2002) olduğu gösterilmiştir. Streptokok enfeksiyonları balıklarda 3-7 gün içersinde yüksek mortalite (>%50)'ye sebep olmaktadır. Klinik bulgular etkilenen

balık türüne göre değişkenlik gösterebilir. Ancak ekzoftalmus, korneada opaklaşma, melanosis, yüzgeç diplerinde ve operkulumda hemoraji, oryantasyon bozukluğu, dengesiz yüzme, omurga deformasyonu, hızlı solunum genel semptomlardır (Sarıhan, 2005; Bromage ve Owens, 2002; Eldar ve Ghittino, 1999). İç bakıda asites, genişlemiş ve siyah dalak, solgun karaciger ve gastrointestinal kanalda kanlı mukoid sıvı birikimi gözlenmektedir (Plumb ve Hanson, 2011; Darwish ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalarda *Steptococcus iniae* enfeksiyonlarının tedavisinde Oksitetrasiklin (82.7 mg/kg/10 gün; Terramisin) antibiyotik uygulamasının başarısız olmasına rağmen, enrofloksasin (5 ve 10 mg/kg/10 gün) ile tedavinin daha etkili olduğu gösterilmiştir (Agnew ve Barnes, 2007). Deneysel olarak enfekte olmuş Mavi Tilapya'larda amoksisilin oral yolla verildiğinde hayatta kalma oranının arttığı bulunmuştur. Avustralya'da Barramundi balığında, etkene karşı oksitetrasiklin, furazolidon ve amoksisilin en çok kullanılan antibiyotikler olsa da eritromisinin en etkili antibiyotik olduğu bildirilmiştir (Agnew ve Barnes, 2007).

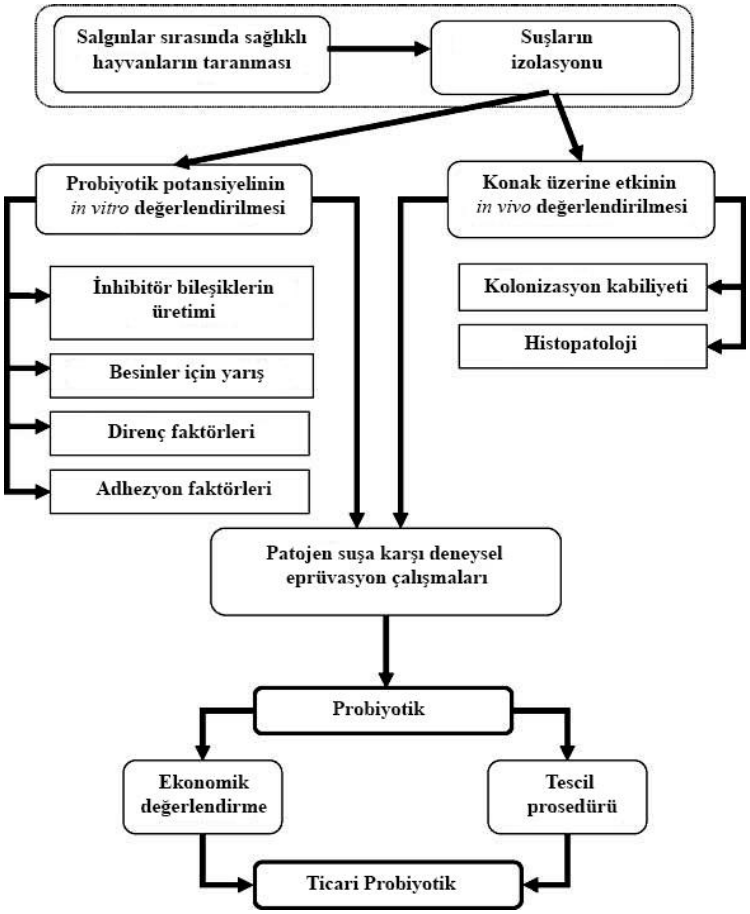
2.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri ve Etki Mekanizmaları

Probiyotik bakterilerin seçimi genellikle sınırlı bilimsel kanıtlara dayalı deneysel bir süreç olmuştur. Probiyotik araştırmalarındaki başarısızlıkların çoğu uygun olmayan mikroorganizmaların seçimi ile ilişkilendirilmektedir. Probiyotiklerin seçim kriterleri tanımlanmıştır, ancak farklı türler ve çevresel ortamlar için bu kriterlerin uyarlanması gerekmektedir. Probiyotik etki mekanizmalarını anlamak ve potansiyel probiyotikler için seçim kriterlerini tanımlamak bu anlamda önemlidir. Genel seçim kriterleri esas olarak biyo güvenlik hususları göz önünde tutularak belirlenmelidir. Bir bakteri suşunun probiyotik olabilmesi için bulundurması gereken bazı kriterler şu şekilde sıralanabilir; (Verschuere ve ark., 2000; Balcazar ve ark., 2006; Can, 2011)

1. Konak orijinli olmalıdır,

2. Güvenilir olmalı ve antibiyotik direnç genlerini taşımamalıdır,
3. Patojen olmamalıdır,
4. Antimikrobiyal bileşikler üretebilmelidir,
5. İmmün cevabı modüle etme yeteneğine sahip olmalıdır,
6. Etkin bir şekilde bağırsak mukozasına tutunmalıdır,

   Probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışması gerek patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu azalttığı gerekse immün sistemi modüle ettiği ve zarar gören mukozanın iyileşmesini artırdığı için önemlidir. Probiyotik mikroorganizmalar bağırsağa ulaştığında, bağırsağın peristaltik hareketleri ile kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine yapışması gerekmektedir. Bağırsak mukozasına probiyotik mikroorganizmaların yapışması, kolonizasyon ve enteropatojenlere karşı antagonistik etki gösterebilmesi açısından önemli bir unsurdur.
7. Gastrointestinal sistemde kolonize olabilmek için asit ve safra tuzuna yüksek tolerans göstermelidir,
8. Ticari üretim için gerekli olan teknolojik süreçlere direnç göstermelidir,
9. Kolay kültür edilebiliyor olmalı ayrıca depolama koşulları altında ve yem üretimi sonrasında canlılığını sürdürebilmelidir.



Şekil 2.4. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Seçimi için İzlenecek Yol (Balcazar ve ark., 2006)

Probiyotik mikroorganizmalar seçilirken izlenilen en yaygın yol, in vitro antagonizm testlerinin gerçekleştirilmesidir. Yapılan bu testte patojen mikrorganizmalar, katı besiyeri ortamında aday probiyotik mikroorganizma veya bunların hücre dışı ürünlerinine maruz bırakılmaktadır. Mikroorganizmaların kolonileşme kabiliyeti, potansiyel probiyotikler için ana seçim kriterlerinden bir diğeri olarak kabul edilir, yani, probiyotiklerin patojenlerin kolonizasyonunu azaltmak veya önlemek için bağırsak epitelyal hücrelerine etkin bir şekilde tutunması gerekmektedir. Potansiyel probiyotiklerin patojenik suşlara karşı rekabet

edebilme yetenekleri değerlendirilmeli, patojenite/toksisite testleri gerçekleştirilmelidir (Balcazar ve ark., 2006). Konak üzerinde probiyotiğin etkisi değerlendirilmeli, son olarak da ekonomik analizleri (maliyet/kar) yapılmalıdır (Şekil 2.4.) (Balcazar ve ark., 2006).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotikler su ya da diyet yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak, kısa ya da uzun vadede, ya tek başlarına ya da prebiyotikler-immünostimülantlar ile karışım halinde uygulanabilir. Probiyotiklerin veriliş yöntemleri (Sharifuzzaman ve Austin, 2017) aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

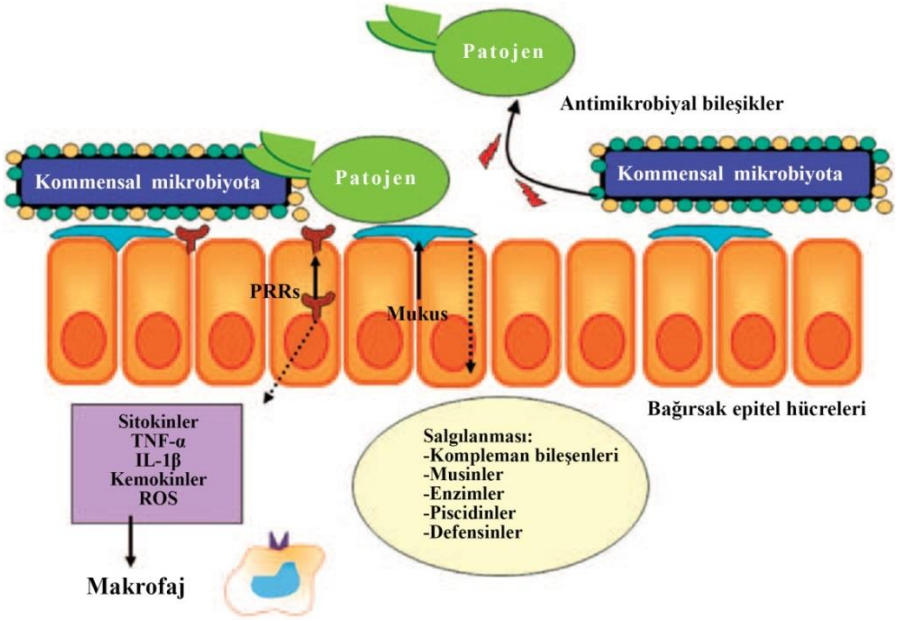
- •Bakteriyel süspansiyonun banyo yöntemiyle konakçıya uygulanması
- •Yetiştirciliğin yapıldığı kültür suyuna doğrudan eklenmesi
- •Probiyotik kültürünün diyetlere eklenmesi
- •Biyoenkapsülasyon yoluyla,canlı yemlerin artemia/rotifer zenginleştirilmesi

Uygun yöntemi seçerken, konağın gelişim evresi, yaşı, türü ve kültür ortamı önemli olmasına rağmen, probiyotiklerin diyet takviyesi olarak verilmesi kültür ortamına doğrudan uygulanmasına göre daha pratik ve etkili olduğu bildirilmiştir (Sharifuzzaman ve Austin, 2017; Balcazar ve ark., 2006).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları araştırıldığında çeşitli teoriler öne sürülmüş ve günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar fermantasyon sırasında ürettikleri laktik asit, bütrik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitler sayesinde bağırsak lümenindeki pH'ın düşmesine ve oluşan asidik pH sayesinde de bazı fırsatçı patojen bakterilerin gelişimi için elverişsiz ortam oluşturarak yaşamalarına engel olmaktadır (Tinh ve ark., 2007).

Probiyotikler, bağırsak yüzeyinde epitel hücrelere yapışabilmek için patojen bakterilerle rekabete girmektedirler (Salminen ve ark., 1998). Bağırsakta hidrojen

peroksit gibi antimikrobiyal bileşikler salgılayarak patojenlerin üremesini engellemektedirler (Dahiya ve Speck, 1968). Ayrıca bağırsaktaki mukus salgısının artışını sağlayarak bağırsağın bariyer fonksiyonunu artırır ve zararlı bakterilerin geçişini engellerler (Yan ve Polk, 2002). Probiyotikler hem bağırsak yüzeyinde antikor (IgA) salgısını (Kaila ve ark., 1992) hem de fagositik aktivite ile doğal öldürücü hücrelerin etkinliğini arttırırarak bağışıklık sistemine katkıda bulunurlar (Olivares ve ark., 2006; Can, 2011). Bununla birlikte fagositik hücrelerin, lenfosit ve antijen spesifik T hücrelerinin aktive olmasını sağlayarak immunostimulan etki gösterirler (Kaya, 2009).



Şekil 2.5. İntestinal sistemdeki kommensal bakterilerin patojene karşı koruma yolu (Perez ve ark., 2010)

Mukozal bağışıklık sistemi, bakteriyel antijenlerin tespitine aracılık eden ve immün reaksiyonları (sitokinler) düzenleyen sinyal kaskadlarını aktive eden Patern Tanıma Reseptörleri (PRR'ler) aracılığı ile patojenik ve kommensal bakteriler arasında ayrım yapar. Kommensal bakteriler (probiyotikler), inhibitör bileşikler

üreterek, besin ve adezyon yüzeyleri için rekabet ederek veya immün sistemi aktive ederek, patojenik bakteriler için uygun olmayan ortamı oluşturarak koruma sağlamaktadır (Şekil 2.5.) (Perez ve ark., 2010).

Bakteriyel antagonizm doğada yaygın görünen bir olaydır. Mikrobiyal etkileşimler, intestinal sistemde rekabet içersinde olan faydalı ve patojenik mikroorganizmalar arasındaki dengede önemli bir rol oynamaktadır (Balcazar ve ark., 2006). Antagonistik bileşikler, diğer mikroorganizmalara karşı toksik (bakterisidal) veya inhibe edici (bakteriyostatik) etkisi olan mikroorganizmalar (bakteriler) tarafından üretilen kimyasal maddeler olarak tanımlanır. Bağırsakta antibakteriyel bileşikler üreten bakterilerin, konakçıda veya kültür ortamında bulunan patojenik bakterilerin çoğalmasını önlediği ve hatta bunları elimine ettiği düşünülmektedir. Probiyotikler de diğer mikrobiyal popülasyonlarda bakterisidal veya bakteriyostatik etkilere sahip çok çeşitli kimyasal maddeler üretebilirler. Bu bileşikler arasında antibiyotikler, bakteriyosinler, sideroforlar, lizozimler, proteazlar, hidrojen peroksit, organik asitler, amonyak ve diasetil bulunur (Verschuere ve ark., 2000). Bu maddelerin varlığının, fırsatçı patojenlere karşı bariyer fonksiyonuna yardımcı olduğu düşünülmektedir. Agar difüzyon yöntemleri veya benzeri yöntemler *in vitro* koşullar altında inhibitör maddelerin üretimini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Hem deniz hem de tatlı su türlerinin bağırsaklarından izole edilen faydalı izolatlar, çeşitli balık ve kabuklu türlerinin patojenlerine karşı antagonistik aktivite göstermiştir. Örneğin; Robertson ve ark., (2000), Atlantik somonunun bağırsağından izole ettikleri *Carnobacterium* sp. suşunun, probiyotik özelliğini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirdikleri *in vitro* çalışmalar sonucunda *Aeromonas hydrophila, A. salmonicida, Flavobacterium psychrophilum, Photobacterium damselae* subsp. *piscicida, Streptococcus milleri, Vibrio anguillarum* ve *V. ordalii* patojenlerine karşı kullanılan suşun antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Das ve ark., (2014), yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* AN11'in Gram negatif bakteriler *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas aeruginosa, Edwardsiella tarda, Vibrio parahaemolyticus Flavobacterium*

columnare ile Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus'*a karşı antagonistik etkilerini incelemişlerdir. Hücresel bileşenin dört farklı fraksiyonu (tüm hücre ürünü, ısı ile öldürülmüş *B.subtilis* tüm hücre ürünü, ekstraselüler ürün, dış membran proteini) test edilmiştir ve ekstraselüler ürün hariç üç fraksiyon yönteminin, *Aeromonas hydrophila* dışındaki tüm patojenlerin büyümesini azaltmada etkili olduğu ortaya konulmuştur. Dış membran protein fraksiyonunun tüm patojenlere karşı daha fazla inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır.

Rekabet etkisi, yerleşik bir mikrofloranın aynı yer için rakip bakteriler ile mücadelesini içeren ve bu anlamda bağırsak yüzeyindeki kolonizasyonu önleyen veya azaltan bir olgudur. Probiyotikler ayrıca besin maddeleri için de rekabet edebilir. Örneğin; demir, mikroorganizmaların hayati fizyolojik ve metabolik süreçlerini yürütmek için gereklidir. Demir genellikle virülansın belirlenmesinde veya bakteriyel etkileşimlerde önemli bir faktör olarak kabul edilir (Balcazar ve ark., 2006). Doğada bol miktarda bulunmasına rağmen, oksijen ve nötr pH'ın varlığında Fe^{2+} 'den Fe^{3+} 'a hızlı bir şekilde oksidasyona uğrayarak, mikroorganizmalar tarafından alınamayan çözünmez demir oksihidroksit oluşur (Saha ve ark., 2013). Sideroforlar, demir bağlayıcı maddeler, bu sınırlı besinin elde edilmesini sağlayan ve çeşitli patojenler için virülans mekanizması olan hücre dışı maddelerdir. Bakteriler demir ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla siderefor kullanırlar. Sidereforlar bakteri dışında karmaşık halde bulunan demir elementinin çözünmesini sağlayarak, aktif taşıma sistemi ile hücre içine alınırlar (Erdem, 2013). Gram ve ark, (1999) demir açısından zengin ve sınırlı demir koşulları altında gelişen *P. fluorescens* AH2'nin balık patojeni olan *Vibrio anguillarum'*a karşı antagonistik etkisini inceledikleri çalışmada*;* sınırlı demir şartlarında gelişen kültür supernatantının, *Vibrio anguillarum*'un gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

2.4. Balıklarda Gastrointestinal Sistem Mikrobiyatası

Gastrointestinal (GI) sistem, hem beslenme açısından hem de fizyolojik ve patolojik açıdan öneme sahip karmaşık ve dinamik bir mikrobiyal ekosistemden

oluşmaktadır. Mikrobiyal gruplar arasında bakterilerin (aerobik, fakültatif anaerobik ve zorunlu aneraobik formlar), balığın GI sisteminde en fazla kolonize olan grup olduğu bildirilmiştir (Llewellyn ve ark., 2014). Bağırsak mikrobiyatası konak metabolizması, bağışıklık ve sağlık üzerinde önemli bir rol oynadığından mikrobiyata yapısının ve komposizyonun araştırılması oldukça önemlidir (Pérez ve ark., 2010; Ni ve ark., 2014).

GI mikrobiyota, sindirim, besinlerin kullanımı, amino asitlerin, enzimlerin, kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA's), vitaminlerin ve minerallerin üretimi de dahil olmak üzere beslenmeyle ilişkili birçok işleve sahiptir (Nayak, 2000). Ray ve ark., (2012) GI mikrobiyotanın, amilaz, selülaz, lipaz, proteaz, kitinaz ve fitaz dahil olmak üzere sindirim sürecine yardımcı olan çeşitli enzimler üretebildiğini bildirmişlerdir. Enzim üretimine katkıda bulunan familyalar arasında ise *Bacillus, Enterobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Flavobacterium, Photobacterium, Pseudomonas, Vibrio, Microbacterium, Micrococcus, Staphylococcus* ve maya türleri bulunmaktadır. Mukherjee ve Ghosh (2014), Hint sazanı (*Catla catla*)' nın bağırsaklarından izole ettikleri *Bacillus subtilis, Bacillus methylotrophicus* ve *Enterobacter hormaechei* türlerinin amilaz, proteaz, lipaz, selülaz, fitaz ve ksilanaz üretimi ile enzimatik katkılarını ortaya koymuştur. *Cetobacterium* cinsine ait üyeler balık türlerinin bağırsak mikrobiyotalarında bol miktarda bulunur (Larsen ve ark., 2014; Etyemez ve Balcazar, 2015). Yapılan çalışmalar bu cinse ait türlerin (*Cetobacterium somerae*) B12 vitamini sentezi ile peptitlerin ve karbonhidratların fermentasyonunda önemli rol oynadıklarını göstermiştir (Tsuchiya ve ark., 2008; Finegold ve ark., 2003).

Herbivor ve omnivor balıkların mikrobiyotaları, karbonhidratları kısa zincirli yağ asitleri gibi daha basit bileşiklere dönüştürmek için fermantasyonu kullanırlar. Üretilen SCFA'lar, konak tarafından hızla emilerek, enerji üretimi ve biyosentez için kullanılırlar. Fermantasyon ürünleri olarak SCFA'nın üretildiği polimer parçalayıcıların *Clostridia* bakteri grubu üyeleri olduğu bildirilmiştir (Clements ve ark., 2007).

GI sistemdeki mikrobiyal komposizyonun oluşumu ve doğal yapısı bir takım iç ve dış faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Balıkların gelişim evresi (Sugita ve ark., 1985), bağırsak yapısı (Sera ve ark., 1974; Sugita ve ark., 1985), çevre ortamı (Sugita ve ark., 1985), su sıcaklığı (Lesel ve Peringer, 1981; Sugita ve ark., 1989), yetiştirme koşulları (Ringø ve ark., 2006) mikroorganizmaların ilk kolonizasyonunu ve bunu takiben yerleşme sürecini etkileyen faktörlerdir. Ayrıca, stres faktörleri GI mikrobiyotayı önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Lesel ve Peringer, 1981). Yem ve beslenme koşulları, balıkların GI mikrobiyota bileşimini önemli ölçüde etkileyen diğer bir faktördür (Ringø ve ark., 2006; Martin-Antonio ve ark., 2007). Özellikle larval evrede, bağırsak florasının beslemeye bağlı olarak hızla değiştiği ortaya konmuştur (Brunvold ve ark., 2007; Reid ve ark., 2009).

Balığın bağırsak mikrobiyotası komposizyonu farklı çevresel koşullar ve diyet farklılıkları nedeniyle değişebilmektedir. Örneğin; Deniz balıklarının bağırsak mikrobiyotalarında dominant grubu *Aeromonas, Alcaligenes, Alteromonas, Carnobacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas* ve *Vibrio* cinsleri oluşturmaktadır. Tatlı su balıklarının bağırsak mikrobiyotalarında ise dominant grupları Enterobacteriaceae familyasının temsilcileri *Acinetobacter, Aeromonas, Flavobacterium, Lactococcus* ve *Pseudomonas* cinsleri ile zorunlu anaerobik bakteriler olan *Bacteroides, Clostridium* ve *Fusobacterium* cinsleri oluşturmaktadır (Perez ve ark., 2010; Austin, 2006).

Nayak (2010), balıklarda bağırsak içeriğinin 10^7 ile 10^{11} bakteri g^{-1} olduğunu bildirmiştir. Yeni nesil DNA sekanslama yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalar balığın GI sisteminde kolonize olan bakteri gruplarının *Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* olduğunu belirlemiştir. Bu gruplar içersinde *Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes* ve *Fusobacteria* baskın filumlardır.

Del'Duca ve ark., (2015) tilapya yavrularının GI mikrobiyotasını, sedimentte bulunan türlerden ziyade su kolonunda bulunan türlerin temsil ettiğini belirlemişlerdir. Bu durum, bağırsak sisteminde kolonize olan mikrobiyotanın su

kolonundan alındığını ve elverişli koşulların devam ettiği sürece bağırsağa yerleştiğini göstermektedir.

Molinari ve ark., (2003), yarı entansif sistemde yetiştirilen tilapyalardaki mikroflorayı incelemiş ve mikroflorayı oluşturan türlerin; *Aeromonas hydrophila, A. veronii, Burkholderia cepacia, Chromobacterium violaceum, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Flavimonas oryzihabitans* ve *Plesiomonas shigelloides* olduğunu ortaya koymuştur.

Tatlı su toprak havuzlarında yetiştirilen tilapyaların bağırsak mikrobiyatasını, ağırlıklı olarak; *Aeromonas hydrophila, Shewanella putrefaciens, Corynebacterium urealyticum, Escherichia coli* ve *Vibrio cholera* bakteri türleri temsil ederken (Al-Harbi ve Uddin, 2003, 2004), tuzlu suda yetişen Nil tilapyalarının bağırsak mikrobiyotasında ise *Vibrio* spp. türünün baskın olduğu belirlenmiştir (Al-Harbi ve Uddin, 2005).

Al-Harbi ve Uddin (2004), tilapya bağırsağındaki bakteriyel kompozisyonunun mevsimlere bağlı dalgalanma gösterdiklerini, en baskın bakteri türlerinin bile toplam sayılarının önemli ölçüde değişim gösterdiğini belirlemişlerdir.

Mikrobiyotanın belirlenmesi ve fonksiyonlarının tanımlanması, konak-mikroorganizma ilişkisinin açığa çıkarılması, su ürünleri yetiştiriciliğinde balık sağlığı açısından bakterilerin rollerini daha iyi anlayabilmemiz için önemlidir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi, araştırmacıların mikrobiyota içindeki karmaşık mikroorganizma topluluklarını minimum maliyetle derinlemesine inceleme olanağı sağlamıştır.

2.5. Balıklarda Bağışıklık Sistemi

Balıkların bağışıklık sistemi, bazı farklılıklara rağmen, daha yüksek omurgalıların bağışıklık sistemine fizyolojik olarak benzemektedir. Balıklar daha yüksek omurgalıların aksine, yaşamın erken dönem embriyonik evrelerinde serbest yaşayan canlılardır ve enfeksiyonlara karşı hayatta kalmaları için doğal bağışıklık

sistemine ihtiyaç duyarlar (Rombout ve ark., 2005). Doğal, yani spesifik olmayan bağışıklık, balıklarda temel bir savunma mekanizmasıdır.

Balıklarda doğal bağışıklık sistemi, enfeksiyonları önleme, yayılmalarını kontrol etme ve doku hasarını azaltma gibi birçok işleve sahiptir. Doğal bağışıklık, hem humoral hem de lenfoid olmayan hücresel komponentleri tarafından oluşturulur. Humoral bağışıklık, lizozim, komplement, C-reaktif protein, transferin, lektin ve hemolizin gibi komponentler içerirken (Yano, 1996), hücresel bağışıklıkta ise mukus, deri yüzeyini kaplayan epitel hücreler ve solungaçlar gibi fiziksel bariyerler ile monosit/makrofaj, granülosit ve non-spesifik sitotoksik hücreler rol oynar (Aoki ve ark., 2006).

Doğal bağışıklık sisteminin ilk bariyerleri deri ve mukustur ve balıkların savunma sisteminde oldukça önemli bir rol oynamaktadırlar. Mukus balıklarda goblet hücreleri tarafından salgılanır ve doğal bağışıklıkta rol oynayan immunoglobulin, komplement, C-reaktif protein (CRP), lektin, lizozim, proteolitik enzimler, alkalin fosfataz ve esteraz, hemolizin ve antimikrobiyal peptitler içerir (Yano, 1996)

Balıklarda bağışıklıkta rol oynayan en önemli temel lenfoid organlar; böbrek, timus ve dalaktır. Teleostlarda böbrek morfolojik yönden farklılık göstermekle birlikte içeriğinde temel olarak kan hücreleri, endotel hücreler ve salgı hücreleri bulunmaktadır (Candan ve Karataş, 2010). Kemikli balıklarda böbrekteki hematopoetik doku boyunca memelilerde gözlenmeyen melanomakrofaj merkezleri bulunur. Yapılan araştırmalarda, bu merkezlerin endojen (lipofuksin, melanin, hemosiderin pigmentleri, seroid) ve ekzojen (metaller, biyolojik aktif moleküller) pek çok materyalin yıkımlanması, detoksifikasyonu ve yenilenmesinde görev aldıkları bildirilmiştir (Dönmez, 2016). Dalak, büyük ve yaşlı kan hücrelerini temizleyen, antijenleri azaltan ve antikor üretimi yapan bağışıklıkta rol oynayan önemli lenfoid organdır. Dalağın beyaz pulpasında lökosit hücreler üretilirken, kırmızı pulpasında ise eritrosit ve trombosit hücrelerin üretimi gerçekleşmektedir. Bununla birlikte temel olarak kan hücreleri, makrofajlar melanomakrofajlar,

endotelyal hücreler ve retikular hücrelerden oluşmuştur (Candan ve Karataş, 2010). Balıkların bağışıklık sisteminde karaciğerin fazla bir rolü bulunmamaktadır. Ancak, retiküloendotelyal sisteme ait bir organ olarak yabancı partikülleri yakalayıcı bir görevi olduğu bilinmektedir (Ocak, 2006). Yapılan çalışmalarda bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) de karaciğer hücreleri tarafından yok edildiği bildirilmiştir (Kaya, 2009).

Bağırsak ve sindirim sistemi aside dayanıklı birçok mikroorganizmanın engellenmesinde rol oynar. Bağırsaklarda salgılanan lizozim, immunoglobulinler, özellikle IgA gibi bazı antibakteriyaller ve enzimler bakterilerin tutunmasını engeller. Patojen mikroorganizmalar yoğun bağırsak mukusu ve makrofajlar tarafından bağırsakta parçalanmaktadır. Ön bağırsakta zararlı mikro moleküller absorbe olduğu için bu esnada patojen organizmalar da yıkıma uğramaktadır. Bununla birlikte bazı antijenler ve mikroorganizmaların zararlı toksinleri bağırsaklardaki absorbsiyon esnasında dolaşım sistemine geçebilmektedir. Bağırsaklardan geçen zararlı makro moleküller ise dalak ve böbreklerde süzülerek parçalanmaktadır (Kaya, 2009).

Balıklarda kazanılmış bağışıklık sistemi çeşitli mekanizmalarla düzenlenmiştir (McHeyzer-Williams ve McHeyzer-Williams, 2005; Sallusto ve Lanzaveckhia, 2009). Adaptif immün yanıt genellikle enfeksiyondan günler sonra başlar ve immün yanıta yol açan peptidlerin spesifik protein motiflerini tanıyabilir (Dixon ve Stet 2001). Adaptif immün yanıtın ana efektör hücreleri olan lenfositler, özellikle B hücreleri ve T hücreleridir. B hücreleri aktive edildiğinde, antikorları salgılayan plazma hücrelerine farklılaşabilirler. Aktive olmuş T hücreleri ya yardımcı T hücrelerine ya da sitotoksik T hücrelerine farklılaşır. Yardımcı T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar gibi kazanılmış immün yanıtın diğer hücrelerini aktive edebilirken, sitotoksik T hücreleri ise, enfekte olmuş hücreleri öldürebilirler (Abbas ve ark., 2007).

2.5.1. Balıklarda Bağışıklıkta Rol Oynayan Bazı Sitokinler ve Hsp70 Proteini

İmmünomodülatör olarak bilinen sitokinler balıklar üzerinde daha az çalışılmıştır. Teleostlarda önemli sayıda sitokin fonksiyonel olarak aktiftir, ancak memelilere kıyasla çok az verinin olduğu bildirilmiştir (Secombes, 1996).

Sitokinler, immün yanıtın doğasını düzenleyen proteinlerdir ve sitotoksik T hücrelerinin oluşumu, antikorların üretilmesi, doğal bağışıklığın uyarılması gibi immün yanıtın çeşitli aşamalarında yer alırlar. Daha yüksek omurgalılarda, bağışıklık uyarımına yanıt olarak salgılanan çeşitli sitokinler, bağışıklık cevabının başlatılmasına katkıda bulunan, çoklu sinyal yollarıyla bağışıklık ile ilgili genlerin ekspresyonunu indükler ve ilgili reseptörlere bağlandıklarında immün yanıtları modüle edebilirler (Wang ve ark., 2011). Sitokinler; makrofajlar, lenfositler, granülositler, dentritik hücreler, mast hücreler ve epitelyal hücreler tarafından üretilirler (Savan ve Sakai, 2006). Makrofajlar IL-1, IL-6, IL-12, TNFα ve IL-8 ve MCP-1 gibi kemokinleri salgılayabilirler (Svanborg ve ark., 1999).

Makrofajlar tarafından üretilen interlökin-1β, kemikli balıklar, kıkırdaklı balıklar, kuş, amfibi ve memeliler dahil olmak üzere farklı hayvan gruplarında karakterize edilmiştir (Secombes ve ark., 2001). Enfeksiyona yanıt olarak inflamasyonun önemli bir aracıdır ve yapılan bir çalışmada alabalıklarda hipotalamik-hipofiz-interrenal aks fonksiyonunu doğrudan etkilediği ve kortizol salgılanmasını uyardığı bildirilmiştir (Holland ve ark., 2002). IL-1β, en erken eksprese edilen pro-inflamatuar sitokinlerden biridir ve organizmaların enfeksiyona derhal yanıt verebilmelerini sağlar. IL-1β, balıklarda karakterize edilen ilk interlökin olmuştur ve gökkuşağı alabalığı (Zou ve ark., 1999), sazan (Fujiki ve ark., 2002), levrek (Scapigliati ve ark., 2001), mezgit (Corripio-Miyar ve ark., 2007), tilapya (Lee ve ark., 2006) gibi birçok balık türünde tanımlanmıştır. IL-1β geninin, lenfosit aktivasyonunun, lökositlerin göçünün, fagositozun ve bakterisit aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Lu ve ark., 2008).

TNF-α (tümör nekroz faktörü alfa), hücre proliferasyonu, farklılaşması, nekrozu, apoptozu ve diğer sitokinlerin indüksiyonu dahil olmak üzere çeşitli

konak yanıtlarında önemli rol oynayan bir pro-inflamatuar sitokindir (Rahman ve McFadden, 2006). TNF-α, apoptozu indüklemek, enfekte hücreleri öldürmek, hücre içi patojen replikasyonunu inhibe etmek ve çeşitli konak yanıtında rol oynayan genleri regüle ederek güçlü anti-mikrobiyal tepkilere aracılık eder. TNF-α, pisi balığı (Hirona ve ark., 2000), gökkuşağı alabalığı (Laing ve ark., 2001; Zou ve ark., 2002), deniz levreği (Garcia- Castillo ve ark., 2002), sazan (Saeij ve ark., 2003), yayın balığı (Zou ve ark., 2003), tilapya (Praveen ve ark., 2006), kalkan gibi bazı balık türlerinde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Ordas ve ark., 2007; Grayfer ve ark., 2008). Ayrıca, TNF benzeri protein aktivitesinin apoptosisi indüklediği, nötrofil göçünü ve makrofaj solunumsal patlama aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Qin ve ark., 2001). Yapılan çalışmalarda, TNF-α ve TNF–β'nın makrofajların önemli aktivatörleri olduğu bildirilmiştir. Gökkuşağı alabalığı, kalkan, çipura (*Sparus aurata*), japon balığı (*Carassius auratus*) gibi balık türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, TNF'nin makrofajların aktivasyonuna neden olduğunu, fagositoza ve nitrik oksit üretimine yol açtığı gösterilmiştir (Yin ve ark., 1997; Mulero ve Meseguer, 1998; Tafalla ve ark., 2001).

Balıklarda bildirilen diğer sitokinler ve düzenleyici moleküller arasında interlökinler (IL-6, IL-8, IL 10, IL12), Tümör Büyüme Faktörü (TGF- β) ve interferon sayılabilir. Sitokinlerin tüm hayvan gruplarında benzer roller gösterdiği bildirilmiştir (Daniels ve Secombes, 1999; Zou ve ark., 2003). TGF-β, lenfositler, dendritik hücreler, NK hücreleri, makrofajlar ve granülositlerin proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonunu düzenleyen bir sitokindir (Li ve Flavell, 2008; Li ve ark., 2006). Memeli bağışıklık sisteminde, TGF-β1 iyi bilinen bir baskılayıcı sitokindir ve temel rolü immün toleransı korumak ve otoimmuniteyi baskılamaktır (Saxena ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2006). TGF-β1'in güçlü immün baskılayıcı etkilerini Th1 ve Th2 hücre proliferasyonunu baskılayarak sağlar. Diğer taraftan, TGF-β ayrıca Th17 hücrelerinin oluşumunu indükleyerek immün yanıtları da artırır (Li ve ark., 2008; Li ve ark., 2006; Wan ve Flavell, 2007) . Bu nedenle, TGFβ'nin bağışıklıkta pozitif veya negatif düzenleyici rolleri, memelilerde yaygın olarak

kabul edilmektedir (Saxena ve ark., 2008; Li ve ark., 2006; Wan ve Flavell, 2007). Teleostlarda, TGF-β'nin fonksiyonel rolüne ilişkin kapsamlı bir araştırma yapılmamasına rağmen, yapılan bazı çalışmalar TGF-β1'in, memelilerde olduğu gibi, aktive olmuş lökositlerin etkilerini ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur. Örneğin, TGF-β1'in, Japon balıklarında ve sazanlarda TNF-α'nın neden olduğu makrofaj aktivasyonunu önemli ölçüde engellediği bildilmiştir (Haddad ve ark., 2008; Kadowaki ve ark., 2009).

HSP70, ısı şoku, UV, radyasyon ve kimyasal maruziyet gibi çevresel streslere yanıt olarak eksprese edilen, bakterilerden memelilere kadar birçok organizmada bulunan proteinlerdir. HSP70 moleküler bir şaperon olup, gelişmekte olan polipeptidlere ve katlanmamış proteinlere geçici olarak bağlanarak, proteinlerin yanlış katlanmasını önlediği bildirilmiştir (Kayhan ve Atasayar, 2010). Hayvan hücrelerinde in vitro ve in vivo olarak gerçekleştirilen birçok çalışma, HSP70'in biyolojik rollerini açığa çıkarmak için yapılmıştır. HSP70'in şaperon fonksiyonlarının hayvan hücrelerindeki stres toleransı ile yakından ilişkili olduğunu ve HSP70'in aşırı ekspresyonunun hücresel strese karşı anti-apoptotik aktiviteyi artırdığını göstermiştir (Mosser ve ark., 2000). Hsp70 geni, gökkuşağı alabalığı ve zebra balığı gibi farklı balık türlerinde tanımlanmıştır (Yamashita ve ark., 2010).

2.6. Probiyotik Bakteri Uygulamalarının Tilapyalar Üzerine Etkileri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Telli ve ark., (2014), iki farklı stoklama yoğunluğunda (18.75 balık m^{-3}; 62.50 balık m^{-3}) gerçekleştirdikleri besleme denemelerinde *Bacillus subtilis* ilave edilen diyet ile (5×10^6 CFU/g yem) beslenen Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*)'sının büyüme performansı, hematoloji ve spesifik olmayan bağışıklığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Probiyotik takviyeli diyetle beslenen tilapya bireyleri ile kontrol diyeti ile beslenenler arasında büyüme performansı, kortizol ve glukoz düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak farklı

stoklama yoğunluğunda yetiştirilen balıklar arasında büyüme performansı açısından farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan çalışmada, *B. subtilis* diyet uygulamasının, tilapyalarda bazı hematolojik parametreler ve spesifik olmayan bağışıklık üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Probiyotik uygulamasının, yüksek stoklama yoğunluğuna maruz kalan tilapyaların ortalama hemoglobin korpüsküler içeriğini, lizozim seviyesini ve fagosit aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, probiyotik uygulamasının, yüksek stoklama yoğunluklarından kaynaklanan strese maruz kalmış balıkların bağışıklık yanıtı geliştirmede etkili bir alternatif olabileceğini göstermiştir.

Zhou ve ark., (2010) yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* B10 (T1), *Bacillus coagulans* B16 (T2), *Rhodopseudomonas palustris* G06 (T3) türü probiyotikleri her iki güne bir suya ilave (1×10^7 cfu/ml) ederek 40 günlük besleme denemesi gerçekleştirerek, probiyotiklerin tilapyalarda büyüme performansı ve immün cevabı üzerine etkilerini incelemişlerdir. T2 ve T3 gruplarında diğer gruplara kıyasla daha yüksek ağırlık kazancı ve spesifik büyüme oranı belirlenmiştir. En yüksek total serum proteini oranı T2 grubunda tespit edilmiştir. Ancak albümin konsantrasyonu ve albümin globülin oranı probiyotik uygulanan gruplarda değişim göstermemiştir. Probiyotik ilaveli T2 ve T3 gruplarında immün cevapda artış (MPO aktivitesi, süperoksit dismütaz, katalaz, solunumsal patlama aktivitesi) olabildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak *Bacillus coagulans* B16 (T2), *Rhodopseudomonas palustris* G06 (T3) türü probiyotiklerin suya ilavesinin, Tilapya'larda büyüme performansını ve immün sistemi geliştirebileceği bildirilmiştir.

Uygulanan probiyotiklerin etkinliğinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılan probiyotiklerin türü, dozu, süresi, uygulamanın türü, balığın yaşı ve büyüklüğü gibi faktörler temel etkenler arasındadır (Ridha ve Azad., 2016). Gatesoupe (1999), su ürünleri yetiştiriciliğine yönelik en verimli probiyotiklerin karasal hayvanlarınkinden farklı olabileceğini ve özellikle su ürünleri yetiştiriciliği için ticari probiyotiklerin geliştirilmesinin önerildiğini belirtmiştir. Ayrıca balığın

kendi doğal florasından izole edilen bağırsak bakterilerinin bağırsakta daha fazla kalıcılığının olacağını bu nedenle de, ticari bakterilerden daha etkili olacakları bildirilmiştir (Gatesoupe, 1999).

Ridha ve Azad (2016), balığın kendi bağırsak florasından izole ettikleri *bacillus* türü (*B. subtilis*) ile iki farklı ticari probiyotik ürününün (COM1: *L.acidophilus*; COM2: *Lactobacillus sporogenes, Lactobacillus acidophilus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis*), maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve sindirim enzimleri (amilaz, proteaz, lipaz ve fitaz)) jüvenil (28.3 g) ve yetişkin (93.4 g) tilapya bireylerinde büyüme ve hastalığa karşı direnç üzerine etkilerini incelemiştir. İlk besleme denemesinde (105 gün), jüvenil ve yetişkin balıklar üzerinde *Bacillus subtilis* (TPI; 10^8 CFU/g), ticari bir probiyotik ürün (COM1; 10^8cfu/g) ve her ikisinin kombinasyonu (MIX1;1:1) test edilmiştir. İkinci besleme denemesinde (84 gün) ise sadece yetişkin balık büyüklüğü (101.8 g) ve kullanılan ticari probiyotik ürün (COM2) değiştirilmiştir. İlk deneme sonucunda jüvenil bireylerde en yüksek ağırlık kazancına, spesifik büyüme oranına ve en iyi yem çevrim oranına MIX1 grubundaki bireylerin sahip olduğu, yetişkin bireylerde ise gruplar arasında fark gözlenmediği, ikinci deneme sonunda ise en iyi büyüme değerlerin COM2 grubundaki bireylerde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *P.vulgaris* patojenine karşı dirençte *Bacillus subtilis* ve probiyotik karışımları ile beslenen gruplarda ticari probiyotik ürünleri ile beslenen gruplara oranla daha yüksek nispi hayatta kalma oranı tespit edilmiştir.

Del'Duca ve ark., (2013), yaptıkları araştırmada, tilapyaların (*Oreochromis niloticus*) ortam suyundan, sedimentten ve bağırsak dokusundan aday probiyotik bakteri izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu bakterilerin yine aynı yetiştiricilik sisteminden izole edilen patojenlere (*Aeromonas hydrofila, Enterococcus faecalis, Edwardsiella tarda, Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida*) karşı etkisini ortaya koymak amacıyla *in vitro* antagonizm testlerini gerçekleştirmişlerdir. Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) tekniği, tilapya bağırsaklarında potansiyel probiyotik ve varsayılan patojenik bakterileri saymak

için kullanılmıştır. En fazla sayıda patojenik bakteriyi inhibe eden iki izolat, dizileme yöntemiyle *Bacillus* sp. ve *Enterococcus* sp. olarak identifiye edilmiş ve *in vivo* testler için ticari yeme eklenmiştir (10^6 CFU g^{-1}). Yapılan denemede gruplar, Kontrol - ilave edilmiş bakteri bulunmayan balıklar, Bacil. - *Bacillus* sp., Enter. - *Enterococcus* sp. ve Bacil. + Enter. - *Bacillus* sp. ve *Enterococcus* sp. (1:1) olarak belirlenmiştir. Besleme denemesi sonunda (30 gün), alınan bağırsak örneklerinde *Bacillus* ve *Enterococcus*'un yanı sıra iki patojenik bakterinin (*Aeromonas* ve *Pseudomonas* sp.) olduğu FISH tekniği ile belirlenmiştir. Balıkların bağırsak mikrobiyotalarında *Enterococcus* sp. ve *Bacillus* sp. yüksek sayıda bulunmuştur. Bununla birlikte, *Bacillus* sp. bolluğunda bir artış gözlenmiştir. Bu durum potansiyel probiyotik bakterinin Tilapya'nın bağırsak florasında başarılı bir şekilde kolonize olduğunu göstermiştir. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında Bacil ile beslenen gupta *Aeromonas* ve *Pseudomonas* sp. sayısının önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, FISH tekniğinin potansiyel probiyotik bakterilerin dinamiklerini ve bunların patojenik bakterilerin kontrolündeki etkinliğini karakterize etmek için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde büyüme (ağırlık veya boy) oranı önemli bir faktördür çünkü üretim verimini yansıtmaktadır. Büyüme oranı, kültür koşulları (sıcaklık, pH, amonyak, çözünmüş oksijen ve stok yoğunluğu) ve genetik faktörler ile verilen yemin miktar ve kalitesinden etkilenmektedir (Oduleye, 1982).

Apun-Molina ve ark., (2009), yüksek stoklama yoğunluğunda (200 birey/m^3) ve optimum sıcaklıkta (19.9-24.82) (stres faktörü olarak) yetiştirilen Tilapya bireylerinde potansiyel probiyotik bakterilerin büyüme ve hayatta kalma üzerine etkilerini incelemişlerdir. Öncelikle Tilapya'ların bağırsak dokusu ve ortam suyundan olası *Bacillus* ve LAB'nin izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Probiyotiklerin seçimi için kriter olarak hemolitik aktivite, *Vibrio*'ya karşı inhibitör aktivite ve enzimatik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda üçü Bacilli ve dört tanesi LAB olmak üzere toplam yedi farklı suş belirlenmiştir. Deneme grupları oluşturulurken ilk grup kontrol grubu olmak üzere ikinci grup

LAB'leri yeme (5×10^4 CFU/g), üçüncü grup Bacillus türleri ise ortam suyuna (1×10^3 CFU/ml) ilave edilmiştir. Dördüncü grup ise ikinci ve üçüncü grubun karışımı olarak belirlenmiştir. Başlangıç ağırlıkları (0.14±0.07 g) olan Tilapya yavru bireylerinin 134 gün süren besleme denemesi sonunda, Kontrol (93.22) ve uygulama gruplarının (LAB; %90.83, Bacilli; %87 ve karışım; %87.17) hayatta kalma oranlarının deneme grupları arasında istatistiksel açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir. Spesifik büyüme oranlarının uygulama gruplarında (LAB; %3.51, Bacillus; %3.39 ve karışım; %3.47) kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu belirlenmiştir. Ağırlık kazancının ise kontrol grubu (9.73 g) ile bacilli grubunda (13.17 g) istatistiksel açıdan benzerlik gösterdiği ancak diğer uygulama gruplarından (LAB;15.68 g, Karışım; 14.82 g) daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Probiyotiklerin özellikle bakteriyel hastalıklar için biyolojik kontrol ajanları olarak kullanımı, su ürünleri yetiştiriciliğinde oldukça iyi bilinmektedir (Newaj-Fyzul ve ark., 2014). Probiyotikler, doğrudan rekabetçi mekanizmalar ve inhibitör maddelerin üretimi yoluyla veya dolaylı olarak konakçıların kendi bağışıklık sistemini modüle ederek patojenlere karşı antagonizm sağlayabilirler. Deneysel eprüvasyon çalışmaları da farklı diyetlerin etkinliğini patojenlere karşı koruma açısından değerlendirmek için iyi bir fırsat sağlamaktadır (Iwashita ve ark., 2015).

Shelby ve ark., (2006)'nın yaptıkları çalışmada, farklı ticari firmaların probiyotik ürünleri kullanılarak (Biomate SF-20; *Enterococcus faecium*, Bioplus 2B; *Bacillus subtilis* + *B.licheniformis*, Bactocell PA10 MD; *Pediococcus acidilactici*, Levucell SB 20; *Saccharomyces cerevisiae*) hazırlanan yemler ile Nil tilapyaları beslenmiş, probiyotik uygulamasının immun yanıt ve *Streptococcus iniae* patojenine karşı etkisi araştırılmıştır. Probiyotik ile beslemenin, büyüme, lizozim, toplam serum immunoglobulin, komplement ve *S.iniae* enfeksiyonunun neden olduğu mortalite üzerinde herhangi bir farklılık oluşturmadığı, bu ticari ürünlerin genç bireylerde yararlı etki sağlamadığı belirlenmiştir.

Iwashita ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada, Tilapya (*Oreochromis niloticus*) yavrularının yemlerine iki farklı dozda (5 g kg^{-1};10 g kg^{-1} *Bacillus subtilis* 1.5×10^9 CFU g^{-1}, *Saccharomyces. cerevisiae* 10^9 CFU g^{-1} ve *Aspergillus oryzae* 2×10^9 CFU g^{-1}) uygulanan probiyotik karışımı ile 4 haftalık besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. Deneme sonunda büyüme oranının gruplar arasında önemli oranda değişmediği ancak yem çevirim oranının 10 g kg^{-1} dozda probiyotikle beslenen grupta önemli oranda düştüğü belirlenmiştir. 5. haftadan sonra gerçekleştirilen 21 günlük *Aeromonas hydrophilia* ve *Streptococcus iniae* ile eprüvasyon denemesi sonrasında ise probiyotikle beslenen tilapyalarda mortalitenin azaldığı bildirilmiştir. En düşük mortalite oranının 10 g kg^{-1} dozda probiyotikle beslenen grupta *S. iniae* 'ye karşı olduğu belirlenmiştir.

Aly ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada, yeme ilave edilen üç farklı probiyotik uygulamasının (D1: 0.5×10^7 *Lactobacillus acidophilus* ve 0.5×10^7 *Bacillus subtilis*/g diyet; D2: 1×10^7 *Lactobacillus acidophilus* /g diyet; D3: 1×10^7 *Bacillus subtilis*/g diyet; D4: probiyotik ilave edilmeyen diyet) tilapyanın büyüme performansı ve farklı patojenlere karşı (*Aeromonas hydrophila, Pseudomonas fluorescens, Streptococcus iniae*) *in vivo* etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada, uygulamadan bir ve iki ay sonra *B. subtilis* ve *L. acidophilus* verilen balıklarda (D1) (%96; %93) hayatta kalma oranının kontrol (D4) (%86; %78.2) ile *L. acidophilus* (D2) (%90; %83) ve *B. subtilis* (D3) (%88; %78) verilen gruplara göre önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. *B. subtilis* ve *L. acidophilus* karışımı ilave edilen diyetle beslenen grupta *A. hydrophila, P. fluorescens* ve *S.iniae*'ye karşı nispi koruma değerinin (RLP), tek başına *B.subtilis* veya *L. acidophilus* verilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. 2. ayın sonunda elde edilen nispi koruma değerinin 1. ayın sonunda elde edilen değerden yüksek olduğu, kullanılan probiyotik türü ve besleme süresi ile artışın önem düzeyinin değiştiği belirlenmiştir. Besleme denemesinin hem birinci ayında hem de ikinci ayında probiyotik ile beslenen grupların ağırlık kazancının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Başlangıç ağırlıkları (5±1.3 g) olan

tilapya bireylerinin, deneme sonunda ağırlık kazançları D1, D2, D3 ve D4 gruplarında sırasıyla 32.36, 35.69, 34.65 ve 24.85 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile probiyotikli diyetlerle beslenen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yem çevirim oranlarının kontrol grubunda daha yüksek (1.82), probiyotik ile beslenen gruplarda (D1;1.69, D2-D3;1.71) daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Juvenil tilapya yemlerine farklı oranlarda (C:%0, T1:%0.02, T2:%0.04, T3:%0.06, T4:%0.08 ve T5:%0.1 AlCare®, 2×10^{10} CFU/g) ilave edilen *Bacillus licheniformis*'in büyüme performansı, intestinal morfoloji, immünolojik parametreler ve *Steptococcus iniae*'ye karşı direnci üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada besleme denemesi (10 hafta) sonrasında ağırlık kazancı ve spesifik büyüme oranının kontrol grubuna kıyasla önemli oranda arttığı, yem çevirim oranının değişmediği, probiyotik ilavesinin serum komplement C3 içeriğini kontrol grubuna göre artırdığı bildrilmiştir. *S. iniae* ile eprüvasyonu sonrası hayatta kalma oranının T2, T3, T4 ve T5 gruplarında önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Deneme grupları arasında villus uzunluğu ve anterior bağırsağın musküler tabaka kalınlığında anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, daha yüksek konsantrasyonlarda *B. licheniformis* (T2, T3, T4, T5) ile beslenen balıkların bağırsak villusu daha düzenli bir görünüm sergilemiş ve C ile T1 gruplarında olduğu gibi villus yapıları eksfoliasyon, kıvrılma eğilimi göstermemiştir. (Han ve ark., 2015).

Selim ve Reda (2015), yaptıkları çalışmada, Nil tilapya diyetlerine iki farklı dozda (G1: kontrol grubu; G2:1×10^4 CFU/g; G3: 1×10^6 CFU/g *Bacillus amyloliquefaciens* sporları) *Bacillus amyloliquefaciens* ilave etmiştir. Besleme periyodunun sonunda (60 gün), hem G2 hem de G3 grubu, kontrol grubuna kıyasla son vücut ağırlığı, ağırlık kazanımı, spesifik büyüme oranı, yem çevirim oranı ve protein etkinlik oranları bakımından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Diyete eklenen probiyotik seviyesindeki artış, özellikle bağırsağın proksimal kısmında, villusların yüksekliğini artırmıştır. G3 grubunda, bağırsağın proksimal

ve distal bölgelerinde, G2 ve G1 grubuna oranla daha fazla sayıda goblet hücreleri olduğu belirlenmiştir. G3 grubunda bağırsağın tüm bölgelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha fazla sayıda intraepitelyal lökosit (IEL) bulunurken, G2 grubunda ise bağırsakların sadece distal kısmında kontrolden anlamlı derecede daha yüksek IEL sayısı tespit edilmiştir. *Bacillus amyloliquefaciens*, glukoz seviyeleri üzerinde zararlı bir etki göstermemiştir ve eritrosit, lökosit sayılarını, hemoglobin içeriğini ve hematokriti artırmıştır.

Ferguson ve ark., (2010) yaptıkları çalışmada, tilapya diyetlerine 10^7 CFU/ g oranında ilave edilen *Pediococcus acidilactici* türü bakteri ile 32 günlük bir besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. Deneme sonunda büyüme performansında anlamlı bir değişim gözlenmemiş ancak probiyotik ile beslenen grupta (% 100) hayatta kalma oranı kontrol grubuna (% 88.33) kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Işık mikroskobu görüntüleri değerlendirildiğinde, bağırsak bütünlüğü ve lökosit düzeylerinin *P. acidilactici* ile beslenen grupta değişmediği ortaya konmuş ancak 14 günlük beslenmeden sonra probiyotikle beslenen grupta kan lökosit düzeyinin ve serum lizozim aktivitesi değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Probiyotik ile beslenen balıklarda, anterior ve posterior bağırsağın çevre uzunluğu oranının, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde değişim göstermediği belirlenmiştir. Basit bir epitel ve lamina propria'dan oluşan bağırsak mukozasının, hem kontrol hem de probiyotik ile beslenen grupta, bol miktarda dağınık lenfoid hücre ile birlikte asidofilik granülosit hücreleri içerdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda *P. acidilactici*'nin bağırsak mikrobiyatasına etkisini değerlendirmek için kültüre dayalı ve kültürden bağımsız analiz yöntemleri (DGGE) kullanılmıştır. Gruplar arasında toplam heterotrofik aerobik ve anaerobik bakteri popülasyonları arasında anlamlı bir fark bulunamazken, LAB seviyelerinin, probiyotik ile beslenen grupta (log 7.55 CFU/g) kontrol grubuna (log 3.84 CFU/g) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. DGGE analizleri probiyotik replikatların en yakın ilişkiye sahip olduğunu, başlangıç ve kontrol grupları profillerine göre farklı bir grup halinde kümelenmiş olduklarını göstermiştir. Yapılan SIMPER analizi (grup

tekrarları içersindeki benzerlik yüzdesi) sonucunda, mikrobiyal profillerin, probiyotik replikatlar arasında başlangıç ve kontrol gruplarının profillerine benzerlik göstermediği belirlenmiştir. ANOSIM analizi sonuçları (gruplar arasındaki benzerlik analizi) ise, probiyotik grubun tekrarlarının, başlangıç ve kontrol grupları tekrarlarına kıyasla, anlamlı derecede daha benzer olduğunu göstermiştir. Başlangıç ve kontrol grupları arasında tür zenginliği veya çeşitliliği açısından anlamlı bir farklılık olmadığı, bununla birlikte, probiyotik ile beslenen grupta tür zenginliği ve çeşitliliğinin, hem başlangıçta hem de kontrol gruplarında olduğundan daha düşük seviyede bulunduğu tespit edilmiştir.

Pirarat ve ark., (2011) insan orijinli, *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin tilapyada büyüme performansı, bağırsak mukozal immünite, humoral ve hücresel bağışıklık yanıtı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Yeme 10^{10} CFU/g oranda ilave edilen bakteri ile 30 gün boyunca besleme denemesi gerçekleştirilmiştir. Deneme sonunda büyüme performansı değerlendirildiğinde, probiyotikle beslenen grupta ağırlık artışı ve spesifik büyüme oranı kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş yem çevrim oranı ise azalış göstermiş, ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Probiyotik ile beslenen balıklarda, bağırsakların tüm kısımlarında özellikle proksimal ve distal kısımda villus uzunluğunun artış gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubunda intraepitelyal lenfosit sayısı proksimal segmentten distal segmente doğru artış gösterirken, probiyotik ile beslenen grupta intraepitelyal lenfosit sayısının tüm bağırsak segmentlerinde yüksek sayıda olduğu belirlenmiştir. Probiyotik ile beslenen grupta bağırsağın orta ve proksimal segmentlerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek intraepitelyal lenfosit sayısına sahip olduğu, asidofilik granülosit sayısının ise probiyotik ile beslenen gruba ait bağırsak dokularının proksimal ve distal segmentinde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna ait bağırsak dokusundaki mukus hücrelerinin sayısı probiyotik ilave edilen grup ile karşılaştırıldığında bağırsağın tüm segmentlerinde daha az sayıda olduğu, bağırsağın distal segmentinde probiyotik ile beslenen gruba ait bağırsak dokusundaki mukus hücrelerinin

sayısının kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Probiyotik ile beslenen gruba ait fagositik aktivite ve fagositoz indeksi değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış eğilimi göstermiş, ancak bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Probiyotik ile beslenen grupta ön böbrek lökositlerinin kemilüminesans aktivitesi ve serum komplement aktivitesi değerleri kontrol grubuna göre önemli oranda daha yüksek bulunmuştur. Probiyotik ile beslenen balığın serumunda *S. iniae*'yi öldürme etkinliğinin, kontrol grubuna göre daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.

Standen ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada, tilapya (*Oreochromis niloticus*) bireylerini *Lactobacillus reuteri, Bacillus subtilis, Enterococcus faecium* ve *Pediococcus acidilactici* (AquaStar® Growout) türlerini içeren probiyotik ilave edilmiş yemler ile beslemiş, ardından tilapyanın bağırsak florasını ve morfolojisini incelemişlerdir. Tilapya bireyleri (55.03 ± 0.44 g) kontrol diyeti ve probiyotik ilave edilmiş diyetle (kontrol diyetine eklenen AquaStar® Growout 5 g kg^{-1}) sekiz hafta süreyle beslenmiştir. Dördüncü ve sekizinci haftalarda gerçekleştirilen kültüre dayalı analiz yöntemleri sonucunda probiyotik ile beslenen balıkların sindirim sistemi ve mukozasında toplam mikroorganizma sayısı değişmezken, laktik asit bakterileri (LAB), enterokok ve *Bacillus* spp. sayılarının artış gösterdiği belirlenmiştir. Dördüncü haftada gerçekleştirilen, polimeraz zincir reaksiyonu denatüre gradyan jel elektroforezi (PCR-DGGE) yöntemi sonrası yapılan SIMPER analizi (grup tekrarları içersindeki benzerlik yüzdesi), probiyotik verilen grup tekrarları içersindeki benzerlik yüzdesinin kontrol grubu tekrarları içersindeki benzerlik yüzdesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sekizinci haftada gerçekleştirilen benzerlik analizi, (ANOSIM) gruplar arasındaki mikrobiyal kompozisyon farklılığının her bir grup içersindeki farklılıktan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Yüksek kapasiteli dizileme (High-throughput sequencing), probiyotik ile beslemenin sindirim sistemindeki operasyonel taksonomik birimlerin ve tür zenginliğinin sayısını önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Kontrol grubunda *Proteobacteria* ve *Cyanobacteria*'ya ait daha yüksek oranlarda okumalar

saptanırken, probiyotikle beslenen balıklarda *Firmicutes*'e ait yüksek okumalar saptanmıştır. *Bacillus, Cetobacterium* ve *Mycobacterium,* kontrol grubu balıklarının sindirim sisteminde baskın cinsler iken, probiyotikle beslenen balıklarda *Bacillus, Enterococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait bakterilerin baskın olduğu belirlenmiştir. Tilapya diyetlerine AquaStar® Growout ilavesi, intraepitelyal lökosit sayısının artmasına, daha yüksek emici yüzey alan indeksine ve bağırsakta daha yüksek mikrovillus yoğunluğuna yol açmıştır.

Liu ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, hibrid tilapyalarda iki farklı *Lactobacillus* türü (yüksek adesiv özellik gösteren *Lactobacillus brevis* JCM 1170 (HALB) ve daha düşük adesiv özellik gösteren *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 (LALB)) ile beslemenin, hayatta kalma, büyüme performansı, bağırsak florası, bağışıklık ile *Aeromonas hydrophila* NJ-1 patojenine karşı koruması üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. Tilapya bireyleri, beş hafta süreyle farklı oranlarda (0, 10^5, 10^7 ve 10^9 CFU/ g) *Lactobacillus* türlerini içeren diyetlerle beslenmiştir. Denemenin belirli günlerinde (0., 10., 20. ve 35. günlerinde) bazı sitokin genlerin mRNA düzeylerinin (TGF-β, IL-1β, TNF-α) ve stres toleransının (Hsp 70) belirlenmesi amacıyla bağırsak, böbrek ve dalak örnekleri alınmış, bunun yanı sıra, adesiv bağırsak bakteri topluluklarının çeşitliliği değerlendirilmiştir. Besleme denemesi sonrasında immersiyon yöntemi kullanılarak 14 günlük eprüvasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Büyüme verileri değerlendirildiğinde, ağırlık kazancı veya yem dönüşüm oranı açısından deneme grupları arasında önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. PCR-DGGE sonuçlarına göre tilapya bağırsağında dominant adesiv bakteri türünün *Alcaligenes* sp. olduğu belirlenmiştir ve herhangi bir deneme grubunda lactobacilli dominant bir bakteri olarak identifiye edilmemiştir. Tilapyaların bağırsağında adesiv bakteriyel komünitenin her iki suşdan da etkilendiği ve önemli değişim gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle yüksek adesiv özellik gösteren suş *Lactobacillus brevis* JCM 1170 ile beslenen grupta bu değişimin daha belirgin ve hızlı olduğu tespit edilmiştir. Her iki probiyotik bakteri türü ile beslenen gruplara ait bağırsak, dalak ve böbrek dokularında sitokin gen

ekspresyonlarının (upregülasyon veya downregülasyon) benzer değişiklikler gösterdiği, ancak bu genlerin tepki derecelerinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir. HALB'nin yüksek doz uygulamasının (10^9 CFU/g), *A. hydrophila'* ya karşı daha fazla koruma sağladığı belirlenmiştir.

He ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, yeme düşük dozda ($2,5 \times 10^5$ (Ta) ve $5,0 \times 10^5$ (Tb) CFU g^{-1}) eklenen *Bacillus subtilis* C-3102'in hibrid tilapyalarda (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂) büyüme, yem çevrimi, hayatta kalma oranları, sitokin gen ekspresyonu, adesiv bağırsak bakterileri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Besleme denemesi (56 gün) sonunda elde edilen verilere göre, probiyotik verilen balık bireylerinde büyüme performansı açısından önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Kültüre dayalı ve PCR-DGGE yöntemleri kullanılarak yapılan analizlerde, Tb grubu balıklarda 28. ve 56. günlerde, Ta grubu balıklarda ise sadece 56. günde bağırsak duvarında *B. subtilis* türü tespit edilmiştir. Ayrıca PCR-DGGE yöntemi farklı diyetlerle beslenen ancak aynı zamanda örneklenen balıkların bakteriyel topluluklarının, farklı zamanlarda örneklenen ancak aynı diyetle beslenen balıklara ait bakteriyel topluluklara göre daha benzer olduklarını ortaya koymuştur. Kontrol ve Ta grubu arasındaki benzerliğin, kontrol ve Tb grubu arasındaki benzerliğe oranla daha yakın olduğu belirlenmiştir. Bu durum, otokton bakteri topluluklarının dinamik olduğunu ve probiyotik etkilerinin uzun süreli ve doza bağlı olduğunu göstermiştir. İmmün ilişkili sitokin gen ekpresyonlarının (IL-1β, TNF-α ve TGF-β), *B. subtilis* ile beslenen tilapya bireylerinde önemli artışlar gösterdiği, stres tolerans göstergesi olan HSP70'in mRNA düzeyinin ise her iki probiyotik ile beslenen grupta, özellikle de yüksek dozda *B. subtilis* ilave edilen diyetle beslenen grupta daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Standen ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, *Pediococcus acidilactici*' nin Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*)'ları üzerindeki probiyotik etkisini, bağırsak sağlığı, probiyotik düzeyleri, büyüme performansı ve yem kullanımı açısından değerlendirmişlerdir. Balıklar (9.19±0.04 g) kontrol diyeti ve *P. acidilactici*

takviyeli diyetle (2.81×10^6 CFU/ g) altı hafta boyunca beslenmiştir. Deneme sonunda gruplar arasında büyüme, yem kullanımı, hepatosomatik indeks (HSI), visserosomatik indeks (VSI), kondüsyon faktörü ve hayatta kalma açısından anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bağırsaktaki toplam bakteri sayıları probiyotik ile beslemeden etkilenmemiştir, ancak kontrol diyeti ile beslenen balıklara kıyasla LAB sayıları probiyotik ile beslenen balıklarda önemli ölçüde artmıştır ve probiyotik ile beslenen balıklardan izole edilen LAB, 16S rRNA dizi analizi ile *P. acidilactici* olarak tanımlanmıştır. Denemenin üçüncü ve altıncı haftalarında yapılan analizlerde, TNF-α gen ekspresyonunun, kontrol grubuna oranla probiyotik ile beslenen grupta önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Işık mikroskobu gözlemleri sonucunda, beslemenin üçüncü haftasında gruplar arasında intraepitelyal lökosit (IEL) düzeyleri ve goblet hücre sayıları açısından fark olmadığı, altı haftalık beslenmeden sonra ise *P. acidilactici* ilave edilen diyet ile beslenen grupta IEL ve goblet hücresi sayısının arttığı bildirilmiştir. TEM analizi sonucunda ise mikrovillus uzunluklarının gruplar arasında değişmediği belirlenmiştir.

Villamil ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada, Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*) kültürü için probiyotik olarak *Lactobacillus acidophilus*'un kullanımını araştırmışlardır. *L. acidophilus*'un ekstraselüler ürünleri *in vitro* olarak *Aeromonas hydrophila* ve *Streptococcus agalactiae* gibi balık patojenlerine karşı yüksek antibakteriyel aktivite göstermiştir. Balıkların hayatta kalma oranları ve bağışıklık yanıtında yer alan bazı genlerin (IL-1β, transferrin) ekspresyonu değerlendirilmiştir. 15 gün boyunca 10^6 CFU/g dozda *L. acidophilus* ilave edilen diyet ile beslenen balıklarda besleme denemesi sonrasında, *A. hydrophila* ile intraperitonel olarak eprüvasyon testleri gerçekleştirilmiştir. 20 gün sonrasında kümülatif mortalite değerlerinin kontrol grubuna (%46.6) oranla probiyotik ile beslenen grupta (%80.1) önemli derecede arttığı belirlenmiştir. *L. acidophilus* diyet takviyesi, hem 24. saatte hem de 15. günden sonra bağışıklıkla ilgili gen ifadesinde önemli değişikliklere neden olmuştur. 15. günde böbrek (0.262 RI) ve dalakta

(0.378 RI), ancak 24. saatte sadece dalakta (0.448 RI) IL-1β ekspresyonunda önemli bir artış gözlenmiştir. Transferrin ekspresyonunun ise, kontrol balıklarına kıyasla *L. acidophilus* ile takviye edilmiş diyet ile beslenen tilapyada beslemenin 15. gününden (0.104 RI) sonra dalakta, 24. saatten sonra (0.032 RI) böbrekte önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir.

Sutthi ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, probiyotik ilave edilmiş suda yetiştirilen Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*)'larının büyüme performansları, hayatta kalma oranları ve biyokimyasal parametreleri araştırılmıştır. Ortam suyuna farklı oranlarda maya (*Saccharomyces cerevisiae*) (5.6×10^8 cfu/g) ve *Bacillus* spp. (*B. subtilis, B. megaterium ve B. licheniformis*) (1×10^6 cfu/g) eklenmiş ve 90 gün boyunca besleme denemesi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç ağırlıkları (5.8 ± 0.10 g) olan balıkların besleme denemesi sonunda, probiyotik ve maya uygulaması yapılan gruplarda, son canlı ağırlıklarının (FBW), ağırlık kazançlarının (WG) ve ortalama günlük büyüme oranlarının (ADG) kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Spesifik büyüme oranı, yem çevirim oranı ve hayatta kalma oranının ise gruplar arasında önemli bir farklılık oluşturmadığı bildirilmiştir. Plazma ALT (alanin aminotransferaz) ve AST (aspartat aminotransferaz) değerlerinin ise kontrol grubunda probiyotik ve maya uygulanan gruplara oranla önemli ölçüde yüksek olduğu, MDA (malondialdehit) seviyesinin ise gruplar arasında önemli bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Abarike ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, tilapya (*Oreochromis niloticus*) bireylerinde büyümeyi, bağışıklık yanıtını ve hastalık direncini geliştirmek için gerekli olan dozu belirlemek amacıyla BS (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* karışımı) olarak tanımlanan ticari bir probiyotik ürünü değerlendirmişlerdir. Ortalama ağırlıkları 53.01 ± 1.0 g olan tilapya bireyleri, 0 g kg^{-1} (CT), 3 g kg^{-1} (BS3), 5 g kg^{-1} (BS5) 7 g kg^{-1} (BS7) ve 10 g kg^{-1} BS (BS10) oranında takviye edilmiş bazal diyetle 4 hafta boyunca beslenmiştir. Besleme denemesinin sonunda, tüm probiyotik BS ile zenginleştirilmiş gruplarda final ağırlığı, spesifik büyüme oranı ve ağırlık kazancı artmış, yem çevirim oranı

düşmüş, en iyi büyümenin ise BS10 grubunda olduğu kaydedilmiştir. Yine aynı grupta, serum lizozim, proteaz, antiproteaz, süperoksit dismutaz aktivitesi, miyeloperoksidaz ve İmmünoglobulin M düzeyi anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Orta bağırsak ve böbrek dokularında immün ilişkili bazı genlerin (C-lizozim, ısı şoku proteini (HSP70), β-defensin, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) ve (SMAD3)) ekspresyonun arttığı bildirilmiştir. En yüksek gen ekspresyon seviyesinin BS10 grubunda olduğu tespit edilmiştir. *Streptococcus agalactiae* ile eprüvasyonu sonrasında, sırasıyla KT, BS3, BS5, BS7, BS10 grupları ile beslenen balıklarda kümülatif mortalite değerleri % 80, % 47.5, % 42.8, % 30 ve % 20 olarak belirlenmiştir.

Galagarza ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis*'in NZ86 (NRRL B-50136) ve O14VRQ (NRRL B-67221) iki farklı suşunun spor formlarını 10^7 CFU/g oranında yeme ilave ederek, Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*) 'larında doğal immünitenin çeşitli parametreleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, 51 günlük beslenme denemesi gerçekleştirilmiştir. Tilapyanın her iki suş ilave edilen diyet ile beslenmesi, deneme boyunca değişen seviyelerde plazma lizozim konsantrasyonunda önemli artışlara neden olmuştur. Besleme denemesinin 14. ve 51. günlerinde yapılan analizlerde alternatif kompleman aktivitesinin (AH50), sadece NZ86 suşu ilave edilen diyetle beslenen grupta önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir. Bu durumun aksine, 28. günde O14VRQ suşu ilave edilen diyetle beslenen grupa ait balıkların periferik kanındaki nötrofil yüzdesinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Denemenin sonunda, fagositik aktivitenin ve solunumsal patlama aktivitesinin arttığı belirlenmiş, ancak gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Her iki probiyotik suş ile beslenenen grupların bağırsak dokularında proinflamatuar sitokinlerin (IL 1-β VE TNF-α) gen ekspresyonlarının arttığı, ancak sadece O14VRQ suşu ile beslenen gruptaki mRNA katlı değişim seviyesinin kontrolden önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir.

Liu ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada, sucul ortamdan izole edilen *Bacillus subtilis* HAINUP40'ın probiyotik özellikleri ile tilapya (*Oreochromis niloticus*) bireylerinin diyetlerine ilave edilmesinin, büyüme performansı, intestinal sistemde probiyotiğin geri kazanımı, sindirim enzim aktiviteleri, doğal bağışıklık ve hastalık direncine karşı etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırılan probiyotik özellikler, simüle edilmiş gastrointestinal stres, otoagregasyon yetenekleri, hücre yüzeyi hidrofobikliği ve hücre dışı enzim üretim toleransını içermiştir. *B. subtilis* hücre sayısının 4. saatten sonra, pH 2.0, 3.0, 4.0'de simüle edilmiş mide sıvısında ve pH 6.8'de simüle edilmiş intestinal sıvısında çok az değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. *B.subtilis* HAINUP40, 24 saat inkübasyon süresinden sonra, güçlü otoagregasyon özelliği göstermiştir (% 34.6-%87.0). Ksilende (% 28.8) ve kloroformda (% 41.3) belirgin bir hücre yüzeyi hidrofobikliği sergilemiş ve hücre dışı proteaz ve amilaz enzimi ürettiği bildirilmiştir. Tilapyaların (ortalama 95 ± 8 g), 8 hafta boyunca 10^8 CFU/g oranında *B. subtilis* HAINUP40 içeren diyetle beslenmesi, balıklarda son vücut ağırlığı, ağırlık artışı (PWG), spesifik büyüme oranı (SGR), toplam antioksidan kapasitesi (T-AOC) ve serum süperoksit dismutaz (SOD) değerlerini arttırdığı, yem çevirim oranını (FCR) ise düşürdüğü belirlenmiştir. Probiyotik ile beslenen grupta 4. ve 8. hafta sonrasında sindirim sistemindeki proteaz ve amilaz aktivitesinin arttığı, 2. haftadan sonra ise solunumsal patlama aktivitesi ile serum lizozim aktivitesinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir. *Streptococcus agalactiae* ile eprüvasyonu sonrasında, *B. subtilis* HAINUP40 içeren diyetle beslenen grupta (% 40) kümülatif mortalite oranının kontrol grubuna (% 85) oranla düştüğü belirlenmiştir.

Addo ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada, juvenil Nil tilapya (*Oreochromis niloticus)*'larının probiyotik ilave edilen diyetler ile beslenmesinin, *Streptococcus iniae* enfeksiyonuna karşı koruma, büyüme ve immün parametreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Balıklar (ortalama ağırlık 16.5 ± 0.2 g), *Bacillus subtilis* (SB3086, SB3295, SB3615 ve AP193) suşlarının tek başına ve kombinasyonunu (SB3086+SB3615) ile yaklaşık 4×10^7 CFU/ g yem dozunda

formüle edilmiş beş farklı diyetle 21 gün boyunca beslenmiştir. Besleme çalışmasından sonra, probiyotik diyetle beslenen gruplar arasında büyüme performansı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Serum bakterisidal aktivitesi değerleri bakımından SB3295 ile beslenen grup hariç, diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Lizozim aktivitesi değerinin de, probiyotik ile beslenen gruplar ile kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklı olduğu belirlenmiştir. Besleme denemesinden sonra, balıklar intraperitoneal enjeksiyon yoluyla *Streptoccocus iniae* ile enfekte edilmiştir. Eprüvasyon denemesinin sonuçları, probiyotik ile beslenen gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olduğunu ortaya koymuştur. Genel olarak, en düşük ölüm oranı % 44.0±7.2 ile SB3615 suşu ile beslenen balıklarda görülmüştür. En yüksek mortaliteyi gösteren grup ise kontrol grubu olmuştur (% 77.3±7.0). SB3086 ve SB3615 suşlarının kombinasyonu ile beslenme, tek başına probiyotik ilave edilen gruplar ile karşılaştırıldığında mortaliteyi azaltmada anlamlı bir farklılık yaratmamıştır.

Elsabagh ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, monoseks Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*)'sının ticari bir probiyotik olan Sanolife PRO-F ile beslenmesinin su kalitesi, büyüme performansı, kan profilleri ve bağırsak morfometrisi üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada, tilapya bireyleri (20±1.26 g) rastgele olarak üç gruba ayrılan üç tekerrür havuza dağıtılmış, Sanolife PRO-F'nin 0 (B0), 0.1 (B1) ve 0.2 (B2) g/kg diyet üç farklı dozuyla 10 hafta boyunca besleme denemesi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, probiyotik ilave edilen diyetler ile beslenen tilapya bireylerinde kontrol grubuna göre canlı ağırlık kazancının, spesifik büyüme oranının arttığı, yem dönüşüm oranının düştüğü ve kan profillerinde belirgin bir gelişme olduğu kaydedilmiştir. Tüm bağırsak uzunlukları, anteriyor ve posteriyor intestinal villus uzunluklarının daha uzun ve anteriyor goblet hücre sayılarının ise probiyotikle beslenen tilapyalarda daha fazla sayıda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, B1 ve B2 diyetleri ile beslenen tilapya bireyleri arasında büyüme ve bağırsak morfolojisi yönünden bir farklılık olmadığı

da tespit edilmiştir. Sudaki amonyak konsantrasyonun B1 diyetiyle beslenen grupta daha düşük olduğu, elektrik iletkenliği, tuzluluk ve toplam çözünmüş katı madde miktarının ise B2 diyetiyle beslenen grupda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Havuz suyunun pH seviyesinin de her iki diyet ile beslenen grupta (B1 ve B2) daha yüksek bulunduğu kaydedilmiştir. Havuz suyunun pH seviyesinin ise her iki diyet ile beslenen gruplardaki havuzlarda arttığı kaydedilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Denemede Kullanılan Balıklar, Uygulama Yeri ve Koşulları

Araştırmada kullanılan Nil tilapya *(Oreochromis niloticus)*'ları Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dr. Nazmi TEKELİOĞLU Tatlı Su Araştırma İstasyonundan temin edilip, yine aynı birimde yer alan sera sistemi içersindeki dairesel fiberglas tanklara yerleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Çalışmada, büyüme denemesi için ortalama ağırlıkları 52.78±0.31 g olan 375 balık ve büyüme denemesi sonrasında gerçekleştirilen eprüvasyon denemesi için ise 150 adet tilapya kullanılmıştır. Balıkların enfeksiyon geçirmemiş ve daha önce herhangi bir medikament uygulaması yapılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Balıklar iki hafta süreyle deneme ortamına adapte edilmeye çalışılmıştır. Yapılan bakteri ve parazit muayenesinde herhangi bir enfeksiyon varlığına rastlanmamıştır. Büyüme ve eprüvasyon denemeleri, Ağustos-Kasım 2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca 400 l hacimli 15 adet fiberglas tank kullanılmıştır. Havalandırma 400W gücünde hava motoruna (blower) bağlı her bir tanka yerleştirilen hava taşları ile sağlanmış, deneme boyunca çözünmüş oksijen seviyesi, 5.5-6.5 ppm olarak ölçülmüştür. Su sıcaklığının sabit tutulması amacıyla deneme sonuna doğru 300 W'lık termostatlı ısıtıcılar kullanılmış, deneme boyunca su sıcaklığı 25-27°C aralığında tutulmuştur. Deneme doğal gün döngüsünde gerçekleştirilmiş olup balıkların yoğun gün ışığından korunmaları amacıyla seranın üzeri %50'lik gölgeleme filesi ile örtülmüştür. Tankların üzeri balıkların sıçramasına engel olmak amacı ile 2 cm göz açıklığına sahip ağlarla örtülmüştür. Tabandaki balık dışkıları haftada iki kez sifonlama yöntemi ile ortamdan uzaklaştırılıp, tanktaki toplam su miktarının %20' si (80 l/gün) sürekli su girişi sağlanarak saatte 3.3 litre su değişimi sağlanmıştır. Denemeye başlamadan önce tanklar sodyum hipoklorit kullanılarak dezenfekte edilmiştir. Araştırmada yeraltı su kaynağı kullanılmıştır. Deneme

süresince tanklardaki suyun ortalama pH'sı 7.2-7.4 aralığında, toplam amonyak<0.25 mg/l, nitrit<0.5 mg/l seviyelerinin altında ölçülmüştür.



Şekil 3.1. Denemelerin Yürütüldüğü Sera Ünitesi

3.1.2. Denemede Kullanılan Potansiyel Probiyotik Bakteriler ile Patojen Bakteri

Nil tilapyalarının bağırsak mukusundan izole edilen ve en iyi probiyotik özellik gösteren (*in vitro* antagonizm testleri ve adezyon kabiliyeti) iki *Bacillus*

suşu (*Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis*) çalışma için potansiyel probiyotik olarak belirlenmiştir (Etyemez ve Balcazar 2016). Patojen bakteri olarak kullanılan *Streptococcus iniae* Dan1 suşu ise Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir.

3.1.3. Denemede Kullanılan Ticari Yem

Denemede Çamlı Yem firmasının 4 mm ekstrüder Tilapya Yemi (% 40 Ham Protein; % 8 Ham Yağ; % 5 Ham Selüloz; % 10 Ham Kül) kullanılmıştır.

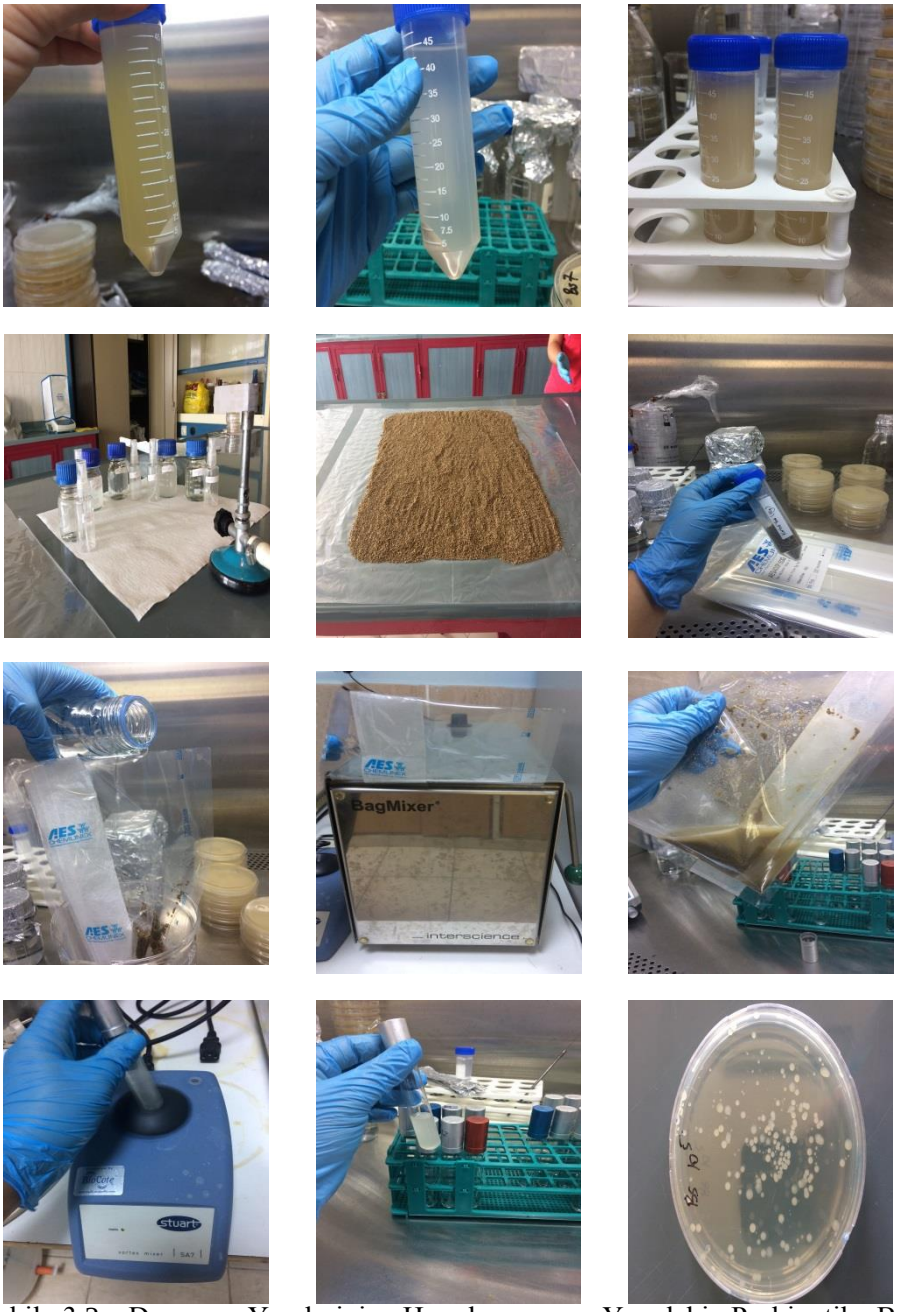
3.2. Metod

3.2.1. *Bacillus* sporlarının ve Probiyotikli Yemlerin Hazırlanışı

Bacillus suşları spor formlarının elde edilmesi amacıyla, Triptic Soy Broth (TSB)'a alınarak gece boyunca 30 °C'de inkübe edilmiştir. Hücre süspansiyonu, steril eküvyon çubuk kullanılarak spor hazırlama agarı (pepton 3.3 g / l, beef ekstrak 1.0 g / l, NaCl 5.0 g / l, K_2HPO_4 2.0 g / l, KC1 1.0 g / l, $MgS0_4.7H_2O$ 0.25 g / l, $MnSO_4$ 0.01 g / l, laktoz 5 g / l, agar 15 g / l) üzerine yayılmış, 5-7 gün boyunca 28 °C'de inkübe edilmiştir. Sporları toplamak için, besiyerine 5 ml steril distile su ilave edilmiş ve sporlar steril öze kullanılarak su içinde süspanse edilmiştir. Daha sonra vejetatif hücreleri öldürmek için spor süspansiyonu 15 dakika boyunca 85 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından iki kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Spor süspansiyonunun konsantrasyonu, PBS içinde 10 kat seri dilüsyon yapılarak ve Triptic Soy Agar (TSA) üzerine yayılarak belirlenmiştir (Ran ve ark., 2012).

Ticari olarak kullanılmakta olan tilapya besi yemi (4 mm, Çamlı Yem), yem öğütme makinasında uygun boyutlara getirildikten sonra elekten geçirilerek tozlarından arındırılmıştır. Elde edilen yemler Çukurova Üniversitesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirilerek tezgah üzerine kaplanan naylon materyal üzerine serilmiş ve sonrasında 100 ml spor süspansiyonu, steril edilmiş sprey başlık kullanılarak püskürtme yöntemi ile yeme ilave edilmiştir. Yemdeki son bakteri

konsantrasyonunu 10^6 CFU/g dozda ayarlayabilmek için, 10^7 CFU/ml olarak ayarlanan bakteri süspansiyonu 1000 g yeme 100 ml olacak şekilde 20 ml sıvı yağ ilavesi ile 10^8 CFU/g dozda ayarlayabilmek için ise 10^9 CFU/ml olarak ayarlanan bakteri süspansiyonu 1000 g yeme 100 ml olacak şekilde 20 ml sıvı yağ ilavesi ile karıştırılmıştır. Kontrol yemleri ise 1000 g yeme 100 ml steril distile su ve 20 ml sıvı yağ ilave edilerek hazırlanmıştır (Thy ve ark., 2017). Stok spor solüsyon konsantrasyonları deneme boyunca TSA üzerinde yayma plak yöntemiyle rutin olarak kontrol edilmiş, konsantrasyonunun korunabilmesi için 3 haftada bir tekrar hazırlanmıştır (Şekil 3.2.). Probiyotik solüsyonu uygulanan yemler 12 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra ağzı kilitli saklama poşetleri içerisine tartımları yapılarak yerleştirilmiş ve sonrasında poşetler etiketlendirilerek kilitli plastik kaplar içerisinde +4 °C' de muhafaza edilmiştir. Stok spor solüsyonları da yine aynı şekilde +4 °C' de buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Deneme Yemlerinin Hazırlanışı ve Yemdeki Probiyotik Bakteri Konsantrasyonlarının Kontrolü

3.2.2. Deneme Dizaynı Organizasyonu

Deneme planı büyüme parametrelerinin ve eprüvasyonun belirlenmesi amacıyla iki ayrı şekilde kurgulanmıştır. Her iki deneme planı da 5 grup ve her grup için 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme Dizaynı Organizasyonu

Deneme Grupları	Balık Sayısı/Grup	Tekerrür Sayısı	Toplam Balık Sayısı	Deneme Süresi
Besleme Denemesi				
KONTROL	25	3	75	Büyüme Denemesi;
BM6	25	3	75	60 gün sürmüştür.
BM8	25	3	75	20 günde bir boy
BS6	25	3	75	ağırlık ölçümleri
BS8	25	3	75	gerçekleştirlmiştir
Eprüvasyon Denemesi				
KONTROL	10	3	30	Eprüvasyon Denemesi;
BM6	10	3	30	60. günün sonunda
BM8	10	3	30	*Streptococcus iniae*
BS6	10	3	30	uygulaması
BS8	10	3	30	gerçekleştirilmiştir.

Büyüme parametrelerinin belirlenmesi amacıyla besleme denemesi için, her grupta 25 balık, toplamda 375 balık; eprüvasyon denemesi için ise her bir grupta 10 balık, toplamda 150 balık kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Deneme grupları; Kontrol (probiyotik ilave edimeyen yem ile besleme), BM6 (1×10^6 CFU/g *Bacillus mojavensis*), BM8 (1×10^8 CFU/g *Bacillus mojavensis*), BS6 (1×10^6 CFU/g *Bacillus subtilis*), BS8 (1×10^8 CFU/g *Bacillus subtilis*) olarak oluşturulmuştur. Deneme başlayıncaya kadar deneysel ortama adaptasyon amacıyla 2 hafta süreyle doyuncaya kadar ticari tilapya yemi ile günde iki kez beslenmiştir. Adaptasyon sonrasında boy ve ağırlıkları eşit olmak üzere tesadüfî olarak deneme tanklarının her birine 25 adet balık stoklanmıştır. Araştırma boyunca deneme gruplarındaki balıklara günde iki kez sabah (09:00) akşam (16:00) olmak üzere *ad libitum*

metotla besleme uygulaması yapılmıştır. Besleme denemeleri sırasında yapılan tartım ve balıklara eprüvasyon uygulamalarında hem balıkların zarar görmelerinin engellenmesi hem de çalışma kolaylığı sağlaması açısından anestezik madde olarak 150mg/L dozda Tricaine methanesulphonate (MS222) kullanılmıştır.

3.2.3. Probiyotik Bakterilerin *in vivo* koşullarda *Streptococcus iniae* patojenine karşı koruyucu etkisinin incelenmesi; Balıkların *Streptococcus iniae* ile Eprüvasyonu

Elde edilen iki potansiyel probiyotik suşun tilapya balıklarında *Streptococcus iniae*'ye karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek için deneysel ortama adapte edilmiş tilapyalar, besleme denemesinin sonunda (60. gün) *Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiştir. Probiyotik etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla eprüvasyon uygulamasında *Streptococcus iniae* kültürleri Luria Agar besi yerinde 22 ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Her deneme grubundan 30'ar adet balık alınarak aynı özelliklere sahip tanklara yerleştirilmiştir ve önceden belirlenen LD50 oranındaki bakteri (7×10^3 cfu/ml) (Sarıhan, 2005) tüm gruplara i.p. enjeksiyonla 0.1 ml miktarda verilmiştir. Balıklar 21 gün süreyle gözlemlenerek ölen balıklar kaydedilmiştir. Ölümler olduğunda, balıklar bakteriyolojik yönden kontrol edilmiştir. (Austin ve Austin., 1989). Ölen balıklardan kanlı agara ekimler yapılarak ölümlerin hastalık oluşturan patojenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığı reizolasyon yapılarak belirlenmiştir. Probiyotiğin balıklarda sağladığı nispi hayatta kalma oranı (RPS) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

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

3.2.4. Probiyotik Bakterilerin Tilapyaların Büyüme Performası Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Büyüme Parametrelerinin Hesaplanması

Büyüme parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

- **Oransal Büyüme Oranı (OBO,%)=** (Son ağırlık – Başlangıç ağırlığı) / Başlangıç Ağırlığı × 100 (Saether ve Jobling, 1999).
- **Spesifik Büyüme Oranı (SBO, % gün^{-1})** = [(ln Son Ağırlık– ln Başlangıç Ağırlığı) / Gün Sayısı]×100 (Company ve ark., 1999).

3.2.4.2. Yem Değerlendirme Parametrelerinin Hesaplanması

Yem değerlendirme parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

- **Yem çevirim oranı (YÇO)**= Tüketilen yem miktarı (g) / Canlı ağırlık kazancı (g) (Santinha ve ark., 1999).
- **Günlük Yem Tüketim Oranı (GYA, %)** = 100× Tüketilen yem miktarı (g) / [(Tanktaki toplam başlangıç canlı ağırlığı+ Tanktaki son toplam canlı ağırlık) / 2 × gün sayısı] (Ruyet ve ark., 2004).

3.2.4.3. Kondüsyon Faktörü

Kondüsyon faktörünün hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

- **Kondüsyon Faktörü (KF)=** 100× [Balık ağırlığı (g) /balık boyu^3 (cm)] (Fulton, 1902).

3.2.4.4. Hepatosomatik İndeksin Hesaplanması

Hepatosomatik İndeksin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

- **Hepatosomatik İndeks (HSİ)**=100× [Karaciğer ağırlığı (g)/Canlı ağırlık(g)] (Grisdale-Helland ve ark., 2011).

3.2.4.5. Viserosomatik İndeksin Hesaplanması

Visserosomatik indeksin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

- **Viserosomatik İndeks (VSİ)**=100× [İç organların ağırlığı (g)/Canlı ağırlık(g)] (Grisdale-Helland ve ark., 2011).

3.2.4.6. Yaşama Oranının Hesaplanması

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

- **Yaşama Oranı (YO,%)**= (Ns/Nb)×100

3.2.5. Probiyotik Bakterilerin Balıkların Bağışıklık Sistemi Üzerine olan Etkilerinin Gen Ekspresyonu ile Belirlenmesi

Her bir potansiyel probiyotik ile beslenen deneme grubundan 6 balık ile kontrol grubundan 6 balık, 60 günlük besleme denemesinin sonunda aynı anda 150 mg/L MS-222 ile bayıltılmış, bağırsak doku örnekleri steril ependorf tüplere alınarak sıvı nitrojen ile dondurulmuştur. Laboratuvara getirilen doku örnekleri RNA izolasyonu yapılana kadar -80 ^{o}C'de bekletilmiştir.

3.2.5.1. Total RNA İzolasyonu

Buz içerisine yerleştirilmiş olan steril ependorf tüplerinin içerisine alınan 100 mg doku örnekleri steril mikropistil yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Dokulardan, total RNA ekstraksiyonu için Nucleozol kullanılmıştır. Ependorf tüpünde bulunan küçük doku parçalarının üzerine, 1 ml NucleoZOL (Macherey-Nagel marka) eklenmiş ve vortekslenerek homojenizasyonu sağlanmıştır. Üzerine

400µl dietilpirokarbonatlı su (DEPC water, Thermo-Fisher marka) eklenmiştir. Ependorf tüpler, 15 saniye hızlı bir biçimde çalkalanmış ardından 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Sonrasında +4°C'de 12.000 g hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda RNA'nın bulunduğu renksiz üst berrak kısım yeni bir tüpe transfer edilmiştir (süpernatant hacminin %75'i). RNA'yı çöktürmek amacıyla üzerine 1 ml izopropanol ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra 12000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj aşamasından sonra ependorfun alt tarafında peletlerin presipite olduğu görülmüş ve beyaz renkte pelet olarak RNA elde edilmiştir (Şekil 3.3.). Sonrasında üst kısmı uzaklaştırılarak elde edilen RNA 1 ml % 75'lik etanol solüsyonu ile yıkanmıştır. 5 dakika süresince $+4^0$C'de 8000 g hızda santrifüj işlemi sonrasında oluşan süpernatant, RNA peletine zarar vermeyecek hassasiyette alınıp atılmıştır. Ependorflar kapakları açık vaziyette buz üzerine alınmış ve 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Peletin üzerine, peletin büyüklüğüne göre DEPC içeren sudan 20-40 µl eklenip karışımın homojenizasyonunu sağlamak için 5 dakika boyunca vorteks yapılmış ve solüsyon -80°C'lik dondurucuda, cDNA sentezi aşamasına kadar saklanmıştır. İzole edilen RNA' ların saflık ve yoğunluk düzeyleri, alınan 1,5 µl' lik örneklerin spektrofotometrik olarak (260/230 ve 260/280 nm dalga boylarında) Nanodrop ND-1000 cihazında yapılan ölçümler ile belirlenmiştir.



Şekil 3.3. RNA Izolasyon Aşamaları

3.2.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen uygun saflıktaki RNA örnekleri High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems CN: 4368814) kullanılarak komplementer DNA'ya dönüştürülmüştür. İçerisinde 4 µl 10X RT random primer, 4 µl 10X RT buffer, 1,6 µl dNTP mix (100 mM), 8.4 µl Nuclease-free H_2O ve 2 µl MultiScribe Ters Transkriptaz olacak şekilde 2X RT master mix (20 µl reaksiyon) solüsyonu buz üzerinde hazırlanmıştır. Sonrasında 0,2 ml'lik PCR tüplerine 10 µl 2X RT master mix üzerine 10 µl RNA örneği pipetaj yapılarak eklenmiştir. cDNA sentezi için uygulanan tüm sıcaklık döngü kalıpları (önce 25°C'de 10 dakika ardından 37°C'de 2 saat son olarak 85°C'de 5 dakika) Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. cDNA Sentezi Aşamaları

3.2.5.3. RT-PCR Prosedürü

Çalışmanın bu aşaması, 7500 Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems) ve PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CN: A25742) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. -20ºC'de saklanan cDNA sentezi yapılan örnekler çalışmadan önce buz üzerine alınarak bir süre bekletilmiştir. Çalışmada Act-β geni kontrol (housekeeping) gen olarak kullanılmıştır. Çalışılacak hedef ve kontrol genler için ayrı çalışma karışımı hazırlanmıştır. SYBR Green Master Mix, Primer Forward, Primer Reverse, Nuclease-free H_2O ve cDNA bir örnek için Çizelge 3.3.'de verilen miktarlarda hazırlanan karışım, reaksiyon başına 21 µl olacak

şekilde 96 kuyucuklu PCR tablaları içerisine alınmıştır. Üzerine 4 µl cDNA ürünü eklendikten sonra özel bir adeziv film (Applied Biosystems MicroAmp Optical Adhesive Film, CN: 4360954) ile kapatılıp tabla RT-PCR cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Ekspresyon aşamasında kullanılan hedef ve kontrol genlerine ait bilgiler ise Çizelge 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.5. RT-PCR Hazırlık Aşaması

Çizelge 3.2. Hedef Genlerin Tespitinde Kullanılan Primerler

Gen	GenBank Erişim No	Forward primer	Reverse primer	Baz çifti (bç)	REF. makale
Act-β	XM_003443127.4	CCACACAGTGCCCATCTACGA	CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA	111	Qiang Jun ve ark, 2015
HSP70	FJ207463.1	CATCGCCTACGGTCTGGACAA	TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT	107	Qiang Jun ve ark, 2015
IL-1β	XM_019365844.1	CCTACACCCATCGCTGAGAC	GGGTAGCGGACAGACATGAG	224	Zheng ve ark, 2017
IL-10	KP645179.1	TTACCTGGACACGGTTCTGC	GTGACTTAAAGCAGCGCGAG	200	Zheng ve ark, 2017
TNF-α	NM_001279533.1	CAGGATCTGGCGCTACTCAG	TAGCTGGTTGGTTTCCGTCC	184	Zheng ve ark, 2017
TGF- β	NM_001311325.1	TGCGGCACCCAATCACACAAC	GTTAGCATAGTAACCCGTTGGC	105	C.Qin ve ark,2014

7500 Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems) ile örnekler; 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye 40 döngü ve 60°C'de 1 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.3. Ekspresyonda Kullanılan Reaksiyon Karışımın Hazırlanması

Reaksiyon Karışımı	**Hacim (µl)**
SYBR Green Master Mix	12.5
Primer *Forward* (10 µM)	1.25
Primer *Reverse* (10 µM)	1.25
Nuclease-free H_2O	6
Kalıp cDNA	4

Gerçek zamanlı PCR çalışmalarında floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısı (eşik döngüsü), CT (cycle treshold) değeri ile ifade edilmektedir. ΔCT değeri, çalışılan bir örneğin, araştırılan geni ile kontrol (Housekeeping) geninin CT değerleri arasındaki farktır. ΔΔCT değeri ise çalışılan örneğin ΔCT değeri ile kontrol örneğin ΔCT değeri arasındaki farkı ifade eder. RT-PCR'ın her döngüsünde DNA miktarı eksponansiyel artış gösterdiği için, ΔΔCT farkı değerlendirilirken $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle hesaplanmaktadır ve araştırılan örneğin gen ekspresyonunun, kontrol örneğine kıyasla kaç kat değiştiğini ifade etmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001).

Ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak semi-kantitatif olarak hesaplanmıştır. Gerçek zamanlı PCR sırasında her örneğin amplifikasyonunun eksponansiyel faza geçtiği an 'eşik siklus' (treshold cycle, Ct) değeri olarak alınmış ve formüldeki yerine konularak hesaplamalar yapılmıştır. Probiyotik ile beslenen balıkların bağırsak dokusuna ait örneklerden, her gen için iki tekrar (dublicate) olacak şekilde çalışılmıştır.

- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct\ hedef - \Delta Ct\ kontrol)}$
- $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct\ hedef - Ct\ referans) - (Ct\ kontrol - Ct\ referans)]}$

3.2.6. Probiyotik Bakterilerin Tilapyaların Bağırsak Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi: Histolojik Değerlendirme

3.2.6.1. Histolojik Takip, Boyama ve İnceleme

3.2.6.1.1. Işık Mikroskobu Yöntemleri

Besleme denemesinin sonunda her bir potansiyel probiyotik ile beslenen deneme grubu ile kontrol grubundan 6 adet balığın (2 adet balık/tank) bağırsakları alınarak histolojik değerlendirme için ayrılmıştır. Işık mikroskobu değerlendirmesi için; bağırsağın anteriyor segmentleri ayrılıp, PBS ile yıkanmış ardından doku örnekleri % 10 Neutral Buffered Formalin içerisine alınarak 24 saat boyunca bekletilmiş ve tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tespit solüsyonu içeriği Çizelge 3.4.' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Formalin	100 ml
Saf su	900 ml
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH_2PO_4. H_2O)	4,0 g
Disodyum hidrojen fosfat anhidrat (Na_2HPO_4)	6,5 gr

%10'luk Nötral Buffered Formalin solüsyonunda tespit edilen doku örnekleri fiksatifin uzaklaştırılması için dokular saf su ile yıkanmıştır. Arkasından rutin doku takibi işlemi ototeknikon cihazı (Leica TP 1020) içerisinde sırasıyla Alkol, Ksilol ve Parafin serilerinden geçirilerek yapılmıştır. Doku takibinde kullanılan kimyasallar ve uygulama süreleri Çizelge 3.5.' de verilmiştir. Doku takibi işleminden sonra doku örnekleri ayrı ayrı olarak parafin bloklara gömülmüştür (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Doku takibi ve Boyama işlemleri

Çizelge 3.5. Işık Mikroskobu Doku Takip Protokolü

Koşul	**Seriler**	**Süre**
Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik Etil Alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik Etil Alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik Etil Alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf Alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf Alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf Alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf Alkol + Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Parafin bloklardan mikrotom cihazı (Thermo Scientific, Shandon Finesse 325) kullanılarak 5µ kalınlığında kesitler alınmıştır. Lama aktarılan doku kesitlerine, morfometrik ölçümlerin yapılabilmesi için Hematoxylen-Eosin (H&E) ve Masson's-Trichrome (M-T) histolojik boyaları uygulanmıştır (Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.). Hazırlanan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirilmiştir

Çizelge 3.6. Hematoxylen-Eosin Boyama Yöntemi

Ksilol batırıp çıkarma	
Ksilol batırıp çıkarma	
Ksilol batırıp çıkarma	
Ksilol	1 saat
Ksilol +Alkol	1 dakika
Saf Alkol	1 dakika
%95 Alkol	1 dakika
%80 Alkol	1 dakika
%70 Alkol	1 dakika
Akar suda yıkama	5 dakika
Distile suya batırıp çıkarma	
Hematoxylen	5 dakika
Akar suda yıkama	5 dakika
Asit+Alkol batırıp çıkarma	
Akar suda yıkama	5 dakika
Amonyaklı su	1 dakika
Akar suda yıkama	5 dakika
%50 Alkol batırıp çıkarma	
Eozin	4 dakika
%50 Alkol	1 dakika
%70 Alkol	1 dakika
%80 Alkol	1 dakika
%95 Alkol batırıp çıkarma	1 dakika
Saf Alkol	1 dakika
Ksilol +Alkol	1 dakika
Ksilol batırıp çıkarma	
Ksilol batırıp çıkarma	
Ksilol batırıp çıkarma	

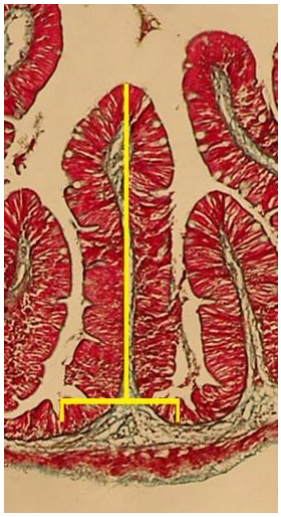
Çizelge 3.7. Masson's–Trichrome Boyama Yöntemi

Ksilol	5 dakika
Ksilol	5 dakika
Saf Alkol	3 dakika
%95 Alkol	3 dakika
%80 Alkol	3 dakika
%70 Alkol	3 dakika
Akar suda yıkama	1 dakika
56°C Etüvde Bouin solüsyonunda bekletme	1 saat
Akar suda yıkama	5 dakika
Weighert's Iron Hemotoksilen solüsyonu	10 dakika
Akar suda yıkama	5 dakika
Distile suya batırıp çıkarma	
Asit fuksin bekletme	10 dakika
Distile suya batırıp çıkarma	
Fosfomolibdic-Fosfotungistik asit solüsyonu	10 dakika
Aniline Blue solüsyonu	10 dakika
Distile suya batırıp çıkarma	
%1'lik asetik asit solüsyonu	2 dakika
Distile suya batırıp çıkarma	
%95 Alkol batırıp çıkarma	
Saf Alkol batırıp çıkarma	
Ksilol	5 dakika
Ksilol	5 dakika

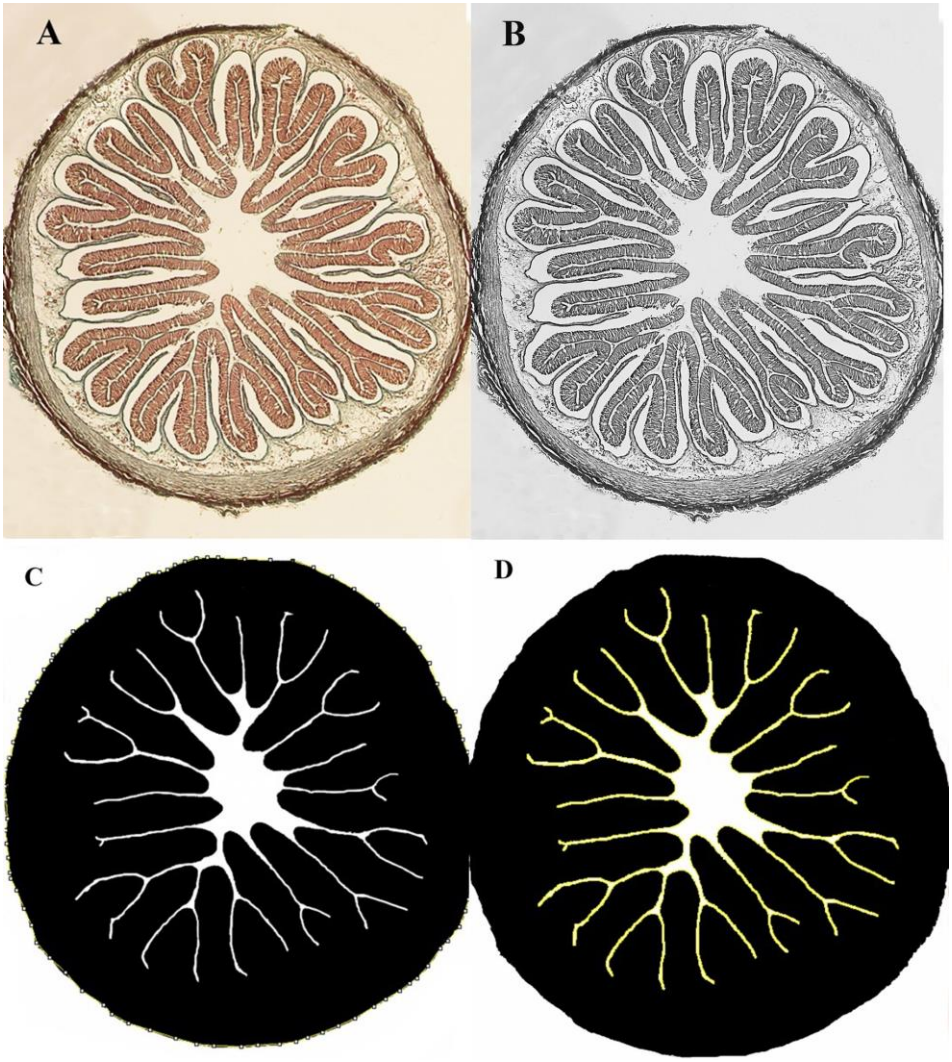
Yapılan boya işleminden sonra preparatlar Olympus CX41 mikroskobuyla incelenerek fotoğraflanmıştır. Image J v1.46r (National Institute of Health, USA) programı kullanılarak ölçümleri yapılmıştır. Boyanan preparatlarda her bir bağırsak örneği için her tekerrür örneğinden alınan üç adet doku kesitinde (6×3= 18 bağırsak doku kesiti) villus yüksekliğini belirlemek için 10 villus

değerlendirilmiştir (her bir bağırsak örneği için 30 ölçüm yapılmış, toplamda her bir deneme grubu başına 180 ölçüm yapılmıştır) (Hu ve ark., 2007). Villus yüksekliği, villusun uç kısmından villuskript birleşim yerine kadar ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 3.7.). Aynı villusda bulunan goblet hücreleri (villusun sağı ve solu) sayılmıştır. Sonuçlar ortalama goblet hücresi sayısı/birim epitel uzunluğu (100 µm) şeklinde hesaplanmıştır. Ayrıca, ışık mikroskobu görüntüleri bağırsak çevresi oranını (Perimetre oranı, PR) belirlemek için analiz edilmiştir. Bağırsak çevresi oranı bağırsak lümeninin iç çevresi (internal perimetre, IP) ile dış çevresinin (eksternal perimetre, EP) uzunluklarının oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Hu ve ark., 2007).

- **(Perimetre oranı, PR; Arbitrary unit)= (internal perimetre, IP)/ (eksternal perimetre, EP)**



Şekil 3.7. Villus Yüksekliğinin Ölçülmesinde Kullanılan Referans Noktaları



Şekil 3.8. Bağırsak Çevre Oranını Ölçmek İçin İzlenen Prosedür

Bağırsak çevre oranını ölçmek için izlenen prosedür Şekil 3.8.'de verilmiştir. Enine kesitlerin görüntüleri, Görüntü Image J v1.46r programına yüklenmiş (A), 8-bit 'e dönüştürülmüş (B) ve siyah beyaz bir görüntü elde etmek için threshold fonksiyonu uygulanmıştır (C). Ardından, elde edilen görüntüden, hem lümen hem de dış çevre ölçüsü (sarı) hesaba katılarak, ölçüm işlemi tamamlanmıştır (D) (Standen, 2015).

3.2.6.1.2. Elektron Mikroskobu Yöntemleri

Elektron mikroskobu değerlendirme için alınan bağırsak doku parçaları Millonig fosfat tamponu (Çizelge 3.8.) kullanılarak hazırlanmış, %5'lik glutaraldehit solüsyonu (Çizelge 3.9.) içerisinde 1 saat süre bekletildikten sonra dokular içerisinde bir miktar %5'lik glutaraldehit bulunan dibi dişçi mumu ile kaplanmış, petri kutularına alınmış ve jilet yardımıyla yaklaşık 1 mm^3 büyüklükte parçalara ayrılmıştır.

Çizelge 3.8. Millonig Fosfat Tamponunun Hazırlanışı

A- % 2,26'lık Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrate Çözeltisi (100 ml saf su içersinde 2,26 gr Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrate ($NaH_2PO_4.H_2O$) çözdürülerek hazırlanmıştır).
B- %2,52'lik Sodyum Hidroksit (100 ml saf su içerisinde 2,52 gr Sodyum Hidroksit (NaOH) çözdürülerek hazırlanmıştır).
A solüsyonundan 83 ml B solusyonundan 17 ml karıştırılmıştır. pH 7,4'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.9. %5'lik Glutaraldehit Solüsyonun Hazırlanışı

A- %25'lik Gluteraldehit Çözeltisi (Merck, CN: M820603.1000)
B- Millonig Fosfat Tamponu (pH 7,4)
A solusyonunda 20 ml ile B solusyonundan 80 ml karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Daha sonra doku parçaları tekrar 3 saat süreyle %5'lik glutaraldehit solusyonuna alınmıştır. Bu solusyonda toplam 4 saat süreyle tespit edilmiştir. Sonrasında dokular millonig fosfat tamponunda (Millonig, 1961) 10 dakika süre ile bekletilmiştir. Ardından dokular tekrar aynı tampon içersinde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün dokular Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit solüsyonu (Çizelge 3.10.) ile ikinci kez tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. %1'lik Osmiyum Tetraoksit Solüsyonun Hazırlanışı

A- Osmiyum Tetraoksit (Merck, CN: M124505.1000)
B- Millonig Fosfat Tamponu **(**pH 7,4**)**
C- % 5,4'lük Glukoz (Merck, CN: M108342.1000) çözeltisi (10ml saf su içerisinde 0,54 g Glukoz çözdürülerek elde edilmiştir.)
1g Osmium Tetraoksit 90 ml Millonig Fosfat Tamponu içerisinde çözdürülmüş ve üzerine 10 ml %5,4'lük glukoz çözeltisi eklenmiştir.

İkinci tespitten sonra dokular tekrar millonig fosfat tamponu ile iki defa 10'ar dakika süreyle yıkanmış ve derecesi giderek artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. Elektron Mikroskobu Doku Takip Protokolü

Solüsyon	Süre	Sıcaklık
% 50 Etil Alkol	15	+4°C
% 70 Etil Alkol	15	+4°C
% 86 Etil Alkol	15	+4°C
% 96 Etil Alkol	15	+4°C
% 100 Etil Alkol	10	+4°C
% 100 Etil Alkol	10	+4°C
% 100 Etil Alkol	10	Oda sıcaklığında
Propilen oksit	15	Oda sıcaklığında
Propilen oksit	15	Oda sıcaklığında

Dehidratasyondan sonra doku parçaları oda sıcaklığında propilen oksit'te 2 kez 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra propilen oksit ve gömme materyali rezinden oluşan karışım içerisinde bekletilmiştir.

Propilen oksit + gömme materyali rezin ile 30 dakika

Propilen oksit + gömme materyali rezin ile 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları, içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) (Çizelge 3.12.) bulunan tüplere alınmış ve bir gece süreyle oda sıcaklığında rotatorda karıştırılmıştır.

Çizelge 3.12. Gömme materyali içeriği

Araldit CY 212	**20 ml**
Sertleştirici HY 964	20 ml
Hızlandırıcı DY 064	0.6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömülmüş ve 60 ºC'lik etüvde 48 saat süreyle polimerize edilmiştir. Ardından bloklar soğumaya bırakılmıştır. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Reichert Ultracut S) ile 500 A^o kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplanmış ve %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solusyonları ile boyanmıştır. Boyama işleminde, kesitler uranil asetatta 5 dakika bekletilmiş ardından distile su ile yıkanmıştır. Sonrasında kurşun sitratta 5 dakika bekletilerek tekrardan distile su ile yıkanmış ve son olarak kurutma kâğıdı ile kurutulmuştur.

Boyanan kesitler Geçirimli Elektron Mikroskobu (JEOL® JEM1400) ile incelenmiş ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera ile fotoğraflanmıştır. Image J v1.46r (National Institute of Health, USA) programı kullanılarak bağırsak preparatlarında her örnekteki mikrovillus uzunluğunu belirlemek için en iyi odaklı 10 mikrovillus değerlendirilmiş ve ölçümleri yapılmıştır (Hu ve ark., 2007).. Mikrovilli yoğunluğunu belirlemek için ise, 10µm'lik bölgede, enterosit yüzeyinde bulunan mikrovilli sayısı sayılmıştır (Daniels ve ark., 2010).

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri yapılmış, önemlilik testlerine geçilmeden, varyansların homojenliği Levene testi ile kontrol edilmiştir. Deneme

sonunda elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile analiz edilmiştir. Gruplar arasında farklılık oluşması durumunda, ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testleri ile karşılaştırılmıştır. Ortalama değerler arasında oluşan farklılıklar 0,05 önem seviyesinde test edilmiş sonuçlar, ortalama ± standart sapma olacak şekilde verilmiştir. Araştırma sonunda elde edilen tüm veriler SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL) istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Büyüme Parametreleri

4.1.1.1. Canlı Ağırlık Olarak Büyüme

Başlangıç ağırlık ortalamaları 52.78 ± 0.31 g olan deneme balıklarının besleme denemesi süresince 20 günlük aralıklar ile yapılan ağırlık ölçümleri sonucunda elde edilen gruplar arasındaki canlı ağırlık ortalamaları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının ölçüm dönemlerine göre canlı ağırlık ortalamaları

	Deneme Grupları				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0.gün	52.64±0.25	52.87±0.19	52.83±0.14	52.85±0.67	52.76±0.26
20.gün	75.92±0.96^{a}	80.14±0.08^{b}	79.02±2.19^{b}	80.44±0.61^{b}	80.16±1.00^{b}
40.gün	110.71±2.14^{a}	115.26±3.45^{ab}	114.78±3.04^{ab}	114.69±2.87^{ab}	117.39±2.56^{b}
60.gün	**132.80±1.85^{a}**	**140.70±3.66^{b}**	**137.69±2.73^{ab}**	**140.35±2.76^{b}**	**140.83±2.90^{b}**

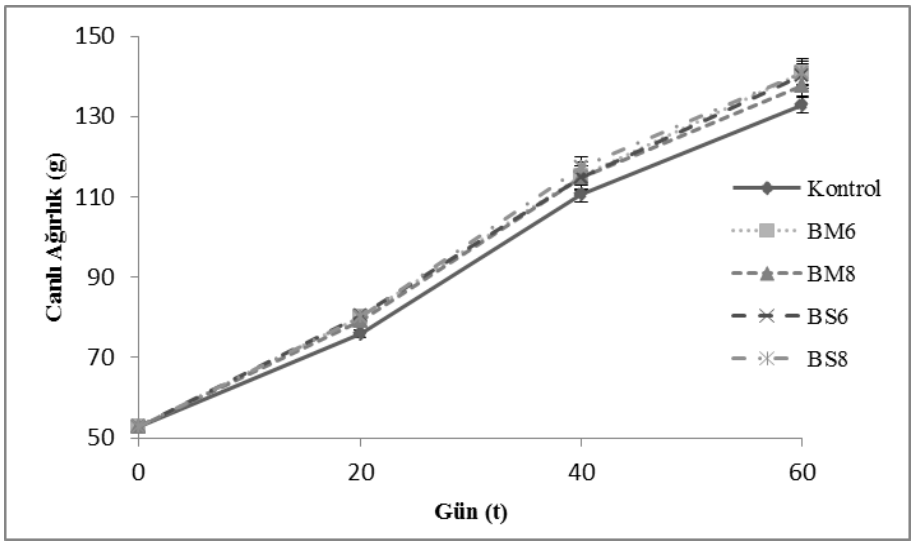
Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Balıklarda besleme çalışmasının 20. gününde yapılan ölçümlerde farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş grupların kazandıkları canlı ağırlıklar kendi aralarında istatistiksel açıdan benzerlik gösterirken ($p>0.05$), kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir. ($p<0.05$). Çalışmanın 40. gününde yapılan ölçümlerde, BM6 (115.26±3.45), BM8 (114.78±3.04) ve BS6 (114.69±2.87) grupları arasındaki istatistiksel farkın önemli olmadığı ($p>0.05$) ancak kontrol grubu (110.71±2.14) ile BS8 (117.39±2.56) grubu arasındaki canlı ağırlık ortalamalarının istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

Deneme balıklarının 60. gün sonundaki son ağırlıkları tüm gruplar arasında

istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p<0.05$). BS8 grubu 140.83±2.90 g en yüksek final ağırlığa sahip iken bu grubu sırasıyla BM6 grubu (140.70±3.66 g), BS6 grubu (140.35±2.76 g), BM8 grubu (137.69±2.73 g) ve kontrol grubu (132.80±1.85 g) takip etmiştir.

Besleme denemesi boyunca kontrol grubu ile farklı sayılarda probiyotik bakteriler ilave edilmiş grupların canlı ağırlık değişimlerini gösteren grafik ise Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlık olarak büyüme eğrisi

4.1.1.2. Oransal Büyüme Oranı

Deneme boyunca yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinde belirlenen Oransal Büyüme Oranı (OBO)(%) Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlıkça oransal büyüme (OBO)(%) değerleri

OBO(%)	**Deneme Grupları**				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0.-20.	44.62±1.87[a]	51.78±0.48[b]	49.60±3.59[ab]	53.32±1.12[b]	52.26±1.28[b]
20.-40.	44.71±1.07	44.99±5.25	45.60±1.34	41.97±5.88	47.81±1.71
40.-60.	19.97±1.29	22.09±2.21	19.98±1.85	22.40±2.76	19.99±2.97
0.-60.	**152.28±2.36[a]**	**166.14±6.09[b]**	**160.64±4.55[b]**	**165.54±2.10[b]**	**166.89±4.45[b]**

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

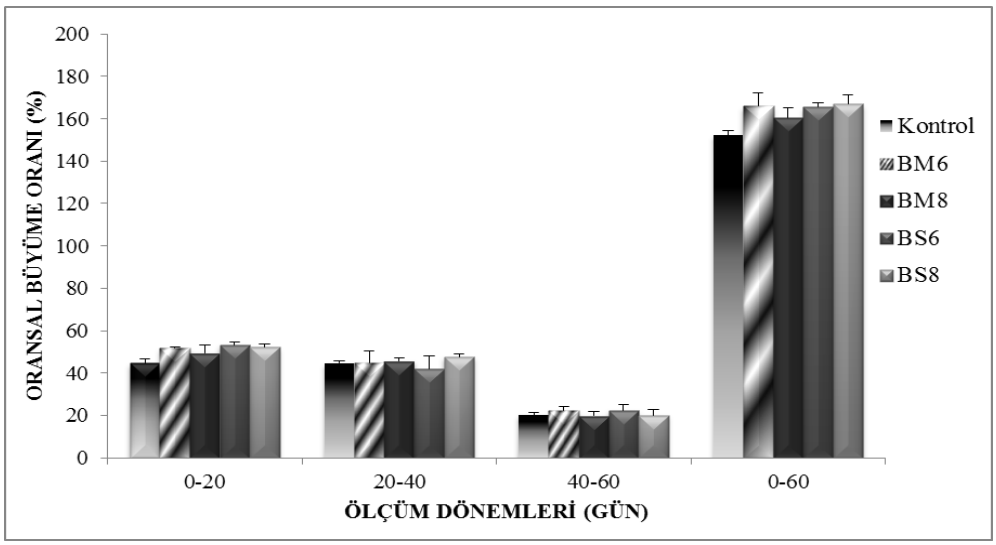
Hesaplanan verilere göre, ilk ölçüm döneminde (0.- 20. gün) en yüksek OBO değeri %53.32 ile BS6 grubunda belirlenirken, en düşük OBO değeri ise %44.62 ile kontrol grubunda belirlenmiştir. BM6, BM8 ve BS8 gruplarının OBO değerleri ise sırasıyla %51.78, %49.60 ve %52.26 olarak hesaplanmıştır. Probiyotik ile beslenen gruplardaki Oransal Büyüme Oranlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

İkinci ölçüm döneminde (20.-40. gün) OBO değerleri incelendiğinde, %47.81 ile BS8 grubu en yüksek, %41.97 ile BS6 grubu en düşük OBO değerine sahip olmuştur. Kontrol, BM6, BM8 gruplarının OBO değerleri sırasıyla %44.71, %44.99 ve %45.60 olarak hesaplanmıştır. Ancak, gruplar arasında OBO değerlerinin istatistiksel açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0.05$).

Üçüncü ölçüm döneminde (40.-60. gün) en yüksek OBO değeri %22.40 ile BS6 grubunda belirlenirken, en düşük OBO değeri %19.97 ile kontrol grubunda belirlenmiştir. BM6, BM8 ve BS8 gruplarının OBO değerleri ise sırasıyla %22.09, %19.88 ve %19.99 olarak hesaplanmıştır. İkinci ölçüm dönemine benzer olarak, gruplar arasında OBO değerlerinin istatistiksel açıdan farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0.05$).

Besleme denemesinin sonunda, kontrol grubu (%152.28) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir OBO sergilemiş, en yüksek OBO %166.89 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir.

Besleme denemesi boyunca kontrol grubu ile farklı sayılarda probiyotik bakteriler ilave edilmiş grupların canlı ağırlıkça oransal büyüme oranlarını gösteren grafik ise Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının canlı ağırlıkça oransal büyüme oranları

4.1.1.3. Spesifik Büyüme Oranı

Deneme boyunca yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinde belirlenen Spesifik Büyüme Oranı (SBO)(% gün^{-1}) Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların spesifik büyüme oranı (SBO)(% gün^{-1}) değerleri

SBO(% gün^{-1})	**Deneme Grupları**				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0.-20.	1.85±0.06^{a}	2.09±0.02^{b}	2.01±0.12^{ab}	2.14±0.04^{b}	2.10±0.04^{b}
20.-40.	1.85±0.04	1.86±0.18	1.88±0.05	1.75±0.21	1.95±0.04
40.-60.	0.91±0.01	1.00±0.09	0.91±0.08	1.01±0.11	0.91±0.12
0.-60.	**1.54±0.02^{a}**	**1.63±0.04^{b}**	**1.60±0.03^{b}**	**1.63±0.01^{b}**	**1.64±0.03^{b}**

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

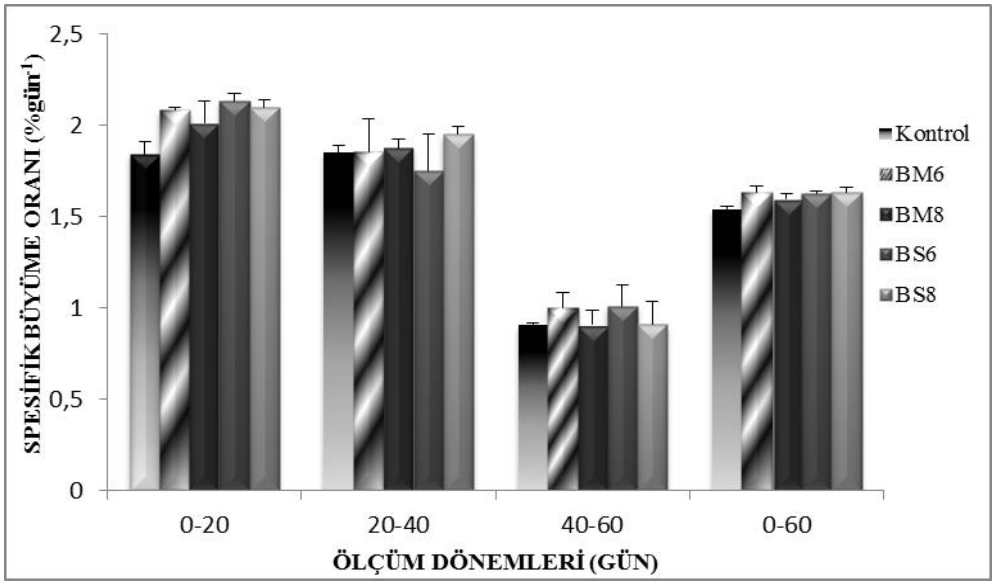
Alınan verilere göre, yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda ilk ölçüm döneminde (0.-20. gün) tüm deneme gruplarının SBO değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre en yüksek SBO değerleri BS8 (2.10±0.04) grubunda, en düşük SBO değeri kontrol (1.85±0.06) grubunda tespit edilmiştir. BM6, BM8 ve BS8 gruplarının SBO değerleri ise sırasıyla 2.09±0.02, 2.01±0.12 ve 2.10±0.04 olarak hesaplanmıştır.

İkinci ölçüm döneminde (20.-40. gün) en yüksek SBO değeri 1.95±0.04 ile BS8 grubunda, en düşük SBO değeri 1.75±0.21 BS6 grubunda belirlenmiştir. Ancak yapılan varyans analizi sonucunda deneme gruplarının SBO değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Üçüncü ölçüm döneminde (40.-60. gün) en yüksek SBO değeri 1.01±0.11 ile BS6 grubunda, en düşük SBO değeri 0.91±0.01 ile kontrol grubunda belirlenmiştir. Ancak yapılan varyans analizi sonucunda deneme gruplarının SBO değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Denemenin sonunda, kontrol grubu (1.54±0.02) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir SBO göstermiş, en yüksek SBO değeri 1.64±0.03 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir.

Besleme denemesi boyunca kontrol grubu ile farklı sayılarda probiyotik bakteriler ilave edilmiş grupların canlı ağırlıkça spesifik büyüme oranlarını gösteren grafik ise Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının canlı ağırlıkça spesifik büyüme oranları

4.1.1.4. Boyca Büyüme

Kontrol grubu ile farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının ölçüm dönemlerine göre total boy ortalamaları Çizelge 4.4.'de boyca büyüme eğrisi grafiği ise Şekil 4.4.'de verilmiştir.

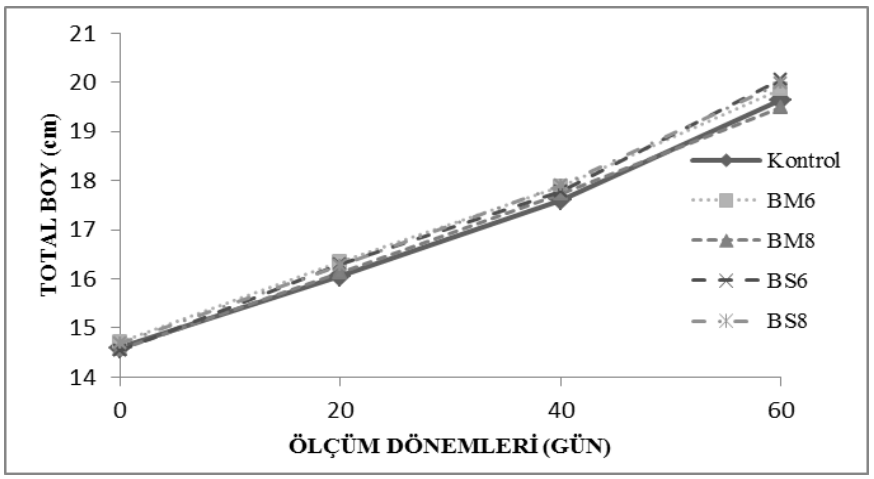
Çizelge 4.4. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının total boy ortalama (cm) değerleri

	Deneme Grupları				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0. gün	14.59±0.04	14.72±0.02	14.56±0.05	14.55±0.12	14.70±0.08
20. gün	16.09±0.05	16.34±0.10	16.13±0.19	16.30±0.16	16.28±0.09
40. gün	17.60±0.16	17.88±0.13	17.74±0.13	17.78±0.16	17.90±0.14
60. gün	**19.65±0.56**	**19.87±0.25**	**19.49±0.36**	**20.06±0.15**	**19.98±0.30**

Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Başlangıç boy ortalamaları 14.62±0.06 cm olan tilapya bireylerinde, 60. gün sonunda en iyi boyca büyüme 20.06±0.15 ile BS6 grubunda gerçekleşmiş, bu grubu BS8, BM6, kontrol ve BM8 grupları sırasıyla 19.98±0.30, 19.87±0.25,

19.65±0.56 ve 19.49±0.36 cm olarak takip etmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analizler sonucunda ölçüm dönemleri süresince tüm gruplar arasındaki farklılığın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.4. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının boyca büyüme eğrisi

4.1.2. Yem Değerlendirme Parametreleri

4.1.2.1. Yem Çevirim Oranı

Deneme boyunca yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Yem Çevirim Oranı (YÇO) Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya gruplarının yem çevirim oranları

YÇO	**Deneme Grupları**				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0.-20.	1.07±0.05^{b}	0.95±0.01^{a}	0.99±0.07^{ab}	0.91±0.02^{a}	0.93±0.03^{a}
20.-40.	0.99±0.04	0.97±0.16	0.93±0.05	1.00±0.13	0.87±0.03
40.-60.	1.37±0.24	1.24±0.08	1.29±0.08	1.24±0.16	1.28±0.21
0.-60.	**1.11±0.03^{b}**	**1.05±0.03^{a}**	**1.05±0.02^{a}**	**1.04±0.04^{a}**	**1.01±0.02^{a}**

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

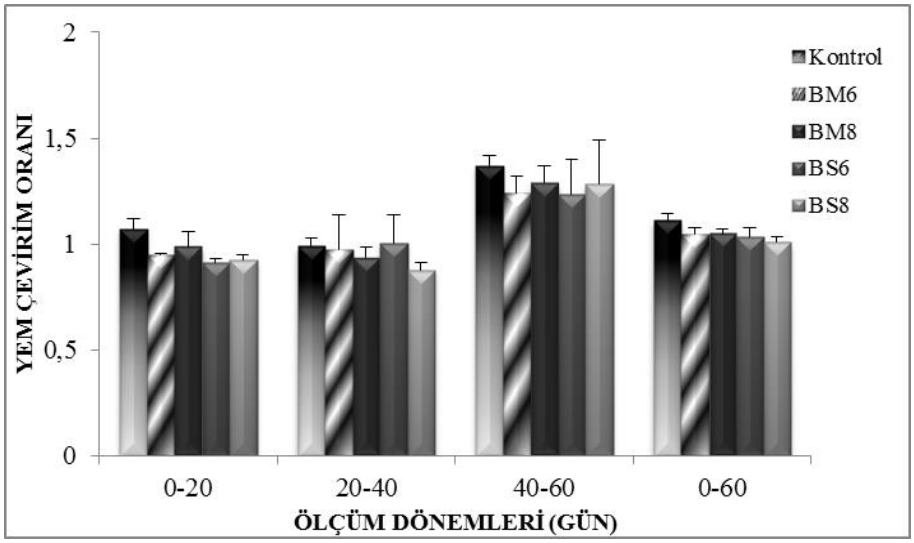
İlk ölçüm döneminde (0.-20. gün) en iyi YÇO, 0.91±0.02 ile BS6 grubunda gerçekleşmiş, kontrol grubu ise 1.07±0.05 ile en düşük YÇO değerine sahip grup olmuştur. BM6, BM8 ve BS8 gruplarının YÇO değerleri ise sırasıyla 0.95±0.01, 0.99±0.07 ve 0.93±0.03 olarak hesaplanmıştır. Probiyotik ile beslenen gruplardaki Yem Çevirim Oranlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

İkinci ölçüm döneminde (20.-40. gün) en iyi YÇO, 0.87±0.03 ile BS8 grubunda, BS6 grubu ise 1.00±0.13 ile en düşük YÇO değerine sahip grup olmuştur. BM6, BM8 ve kontrol gruplarının YÇO değerleri ise sırasıyla 0.97±0.16, 0.93±0.05 ve 0.99±0.04 olarak hesaplanmıştır. Ancak yapılan varyans analizi sonucunda deneme gruplarının YÇO değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Üçüncü ölçüm döneminde (40.-60. gün) en iyi YÇO, aynı değerlere sahip olan BS6 (1.24±0.16) ile BM6 (1.24±0.08) gruplarında, en düşük YÇO değeri ise 1.37±0.24 ile kontrol grubunda belirlenmiştir. BS8 ve BM8 gruplarının YÇO değerleri ise sırasıyla 1.28±0.21 ve 1.29±0.08 olarak hesaplanmıştır. Ancak yapılan varyans analizi sonucunda deneme gruplarının YÇO değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Denemenin sonunda, kontrol grubu (1.11±0.03) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha yüksek bir YÇO göstermiş, en iyi YÇO değeri 1.01±0.02 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir.

Besleme denemesi boyunca kontrol grubu ile farklı sayılarda probiyotik bakteriler ilave edilmiş grupların yem çevirim oranlarını gösteren grafik ise Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının yem çevirim oranları

4.1.2.2. Günlük Yem Alım Oranı

Deneme süresince yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Günlük Yem Alım Oranı (GYA) Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının günlük yem alım oranları

GYA	**Deneme Grupları**				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0.-20.	2.45±0.02	2.44±0.01	2.44±0.04	2.41±0.01	2.40±0.02
20.-40.	2.38±0.01	2.36±0.02	2.31±0.05	2.30±0.03	2.26±0.04
40.-60.	1.67 ± 0.13^{b}	1.54 ± 0.09^{ab}	1.46 ± 0.12^{a}	1.54 ± 0.09^{ab}	1.44 ± 0.11^{a}
0.-60.	$\mathbf{2.00\pm0.05^{b}}$	$\mathbf{1.98\pm0.02^{ab}}$	$\mathbf{1.94\pm0.04^{ab}}$	$\mathbf{1.95\pm0.06^{ab}}$	$\mathbf{1.91\pm0.05^{a}}$

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Bu verilere göre, ilk ölçüm döneminde (0.-20. gün) GYA en iyi olan grup %2.45±0.02 ile Kontrol grubu olmuştur. Kontrol grubunu sırasıyla BM6 (2.44±0.01), BM8 (2.44±0.04), BS6 (2.41±0.01) ve BS8 (2.40±0.02) grubu takip

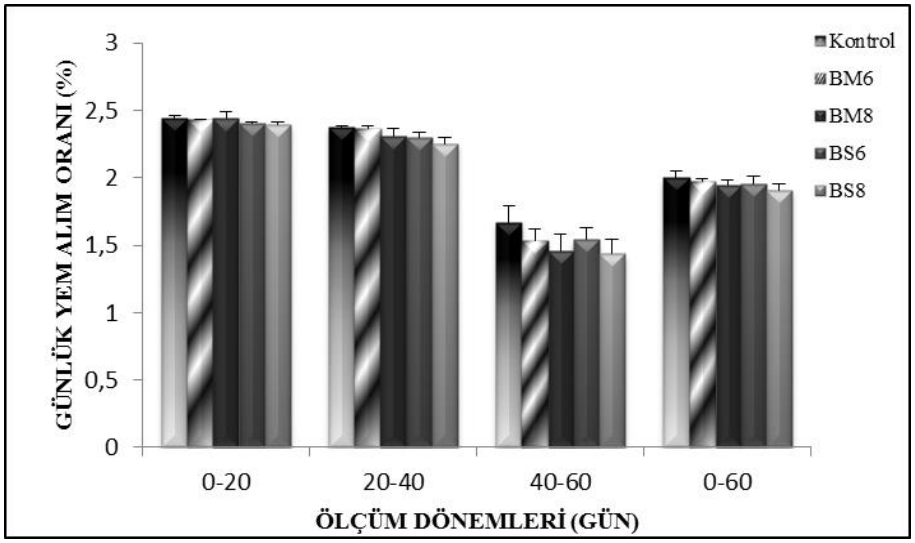
etmiştir. Ancak yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda tüm grupların GYA değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

İkinci ölçüm döneminde (20.-40. gün) GYA en iyi olan grup %2.38±0.01 ile Kontrol grubu olmuştur. Kontrol grubunu sırasıyla BM6 (2.36±0.02), BM8 (2.31±0.05), BS6 (2.30±0.03) ve BS8 (2.26±0.04) grubu takip etmiştir. Ancak yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda tüm grupların GYA değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Üçüncü ölçüm döneminde (40.-60. gün) GYA en iyi olan grup %1.67±0.13 ile Kontrol grubu olmuştur. BM6 ve BS6 gruplarının GYA değerleri arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmazken ($p>0.05$) değerleri 1.54±0.09 olarak hesaplanmış, BM8 ve BS8 gruplarının değerleri sırasıyla 1.46±0.12 ve 1.44±0.11 olarak hesaplanmıştır.

BM6, BM8 ve BS6 gruplarının deneme sonunda GYA değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmazken ($p>0.05$) değerleri sırasıyla 1.98±0.02, 1.94±0.04 ve 1.95±0.06 olarak hesaplanmıştır. Araştırma sonunda GYA en iyi olan grup 2.00±0.05 ile kontrol grubu iken en düşük GYA sahip grup ise 1.91±0.05 ile BS8 grubu olmuştur. Kontrol grubu ile BS8 grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Deneme süresince yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Günlük Yem Alım Oranı (GYA) grafiği ise Şekil 4.6.'da verilmiştir



Şekil 4.6. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının günlük yem alım oranları

4.1.3. Kondüsyon Faktörü

Deneme boyunca yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Kondüsyon faktörü (KF) değerleri Çizelge 4.7.'de, grafiği ise Şekil 4.7.'de verilmiştir.

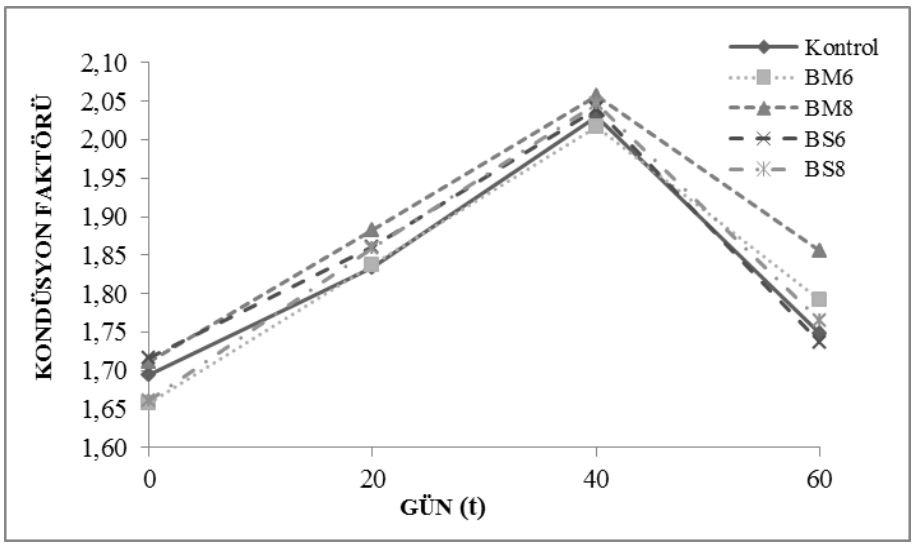
Çizelge 4.7. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının kondüsyon faktörü değerleri

KF	**Deneme Grupları**				
Dönemler	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
0	1.69±0.02	1.66±0.01	1.71±0.02	1.72±0.06	1.66±0.02
20	1.83±0.01	1.84±0.03	1.88±0.01	1.86±0.07	1.86±0.01
40	2.03±0.05	2.02±0.05	2.06±0.05	2.04±0.01	2.05±0.07
60	1.76±0.14	1.80±0.11	1.86±0.14	1.74±0.02	1.77±0.08

Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Deneme boyunca elde edilen boy ve ağırlık verilerine göre hesaplanan kondüsyon faktörü değerleri için yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre, ölçüm dönemlerinde gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur

($p>0.05$). Denemenin son ölçüm döneminde en yüksek kondüsyon değeri 1.86±0.14 ile BM8 grubunda, en düşük değer ise 1.74±0.02 ile BS6 grubunda elde edilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının kondüsyon faktörü değerleri

4.1.4. Hepatosomatik İndeks

Deneme sonunda yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Hepatosomatik İndeks (HSİ) değerleri Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının Hepatosomatik indeks değerleri

HSI	**Deneme Grupları**				
Deneme	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
Sonu	1.99 ± 0.36^{a}	3.45 ± 0.55^{c}	2.76 ± 0.47^{b}	3.13 ± 0.45^{bc}	3.55 ± 0.46^{c}

Aynı satırda yer alan harfler (a-c) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Deneme sonunda elde edilen karaciğer ve canlı ağırlık verilerine göre hesaplanan hepatosomatik indeks değerleri için yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre, gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Denemenin sonunda en yüksek hepatosomatik indeks değeri 3.55±0.46 ile BS8 grubunda, en düşük değer ise 1.99±0.36 ile Kontrol grubunda elde edilmiştir.

4.1.5. Viserosomatik İndeks

Deneme sonunda yapılan ölçümler sonucunda farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinde belirlenen Viserasomatik İndeks (VSİ) değerleri Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarının Viserosomatik indeks değerleri

VSİ	**Deneme Grupları**				
Deneme	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
Sonu	6.94±0.89^{a}	10.16±0.86^{bc}	9.66±0.80^{b}	9.72±0.95^{b}	11.20±0.56^{c}

Aynı satırda yer alan harfler (a-c) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Deneme sonunda gerçekleştirilen iç organlar ve canlı ağırlık verilerine göre hesaplanan viserosomatik indeks değerleri için yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre, gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Denemenin sonunda en yüksek viserosomatik indeks değeri 11.20±0.56 ile BS8 grubunda, en düşük değer ise 6.94±0.89 ile Kontrol grubunda elde edilmiştir.

4.1.6. Yaşama Oranı

Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya gruplarında deneme boyunca ölüm görülmemiş ve bütün gruplarda yaşama oranı %100 olmuştur.

4.1.7. Bağırsak Dokusundan Elde Edilen Histomorfometrik Bulgular

4.1.7.1. Villus Boyu, Perimetre Oranı Ölçümleri ve Goblet Hücre Sayıları

Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin anteriyor bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler Çizelge 4.10' de grafikleri ise Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler

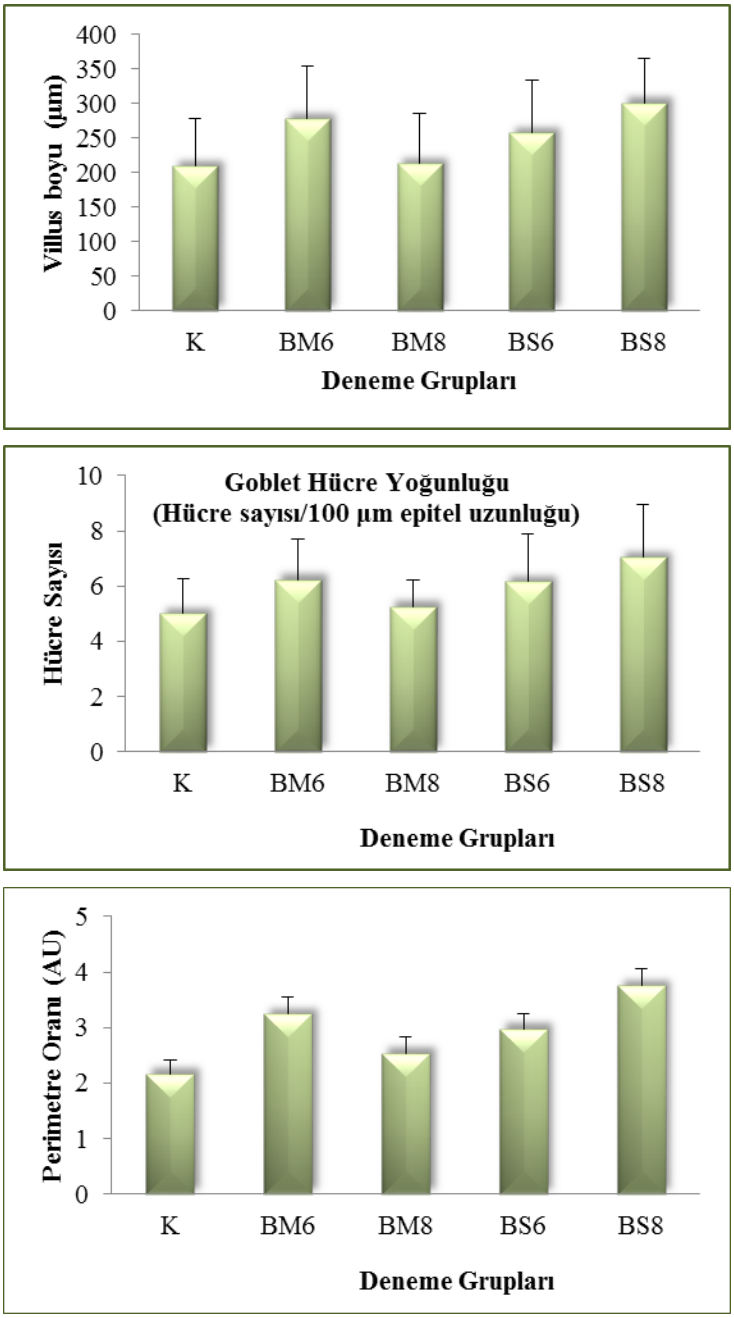
	Deneme Grupları				
	Kontrol	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
Villus Boyu (µm)	209.30±68.78^{a}	278.21±75.62^{b}	213.59±71.49^{a}	258.08±75.90^{b}	301.46±64.62^{b}
Goblet Hücre Sayısı/ 100 µm	4.99±1.25^{a}	6.24±1.46^{d}	5.26±0.94^{b}	6.16±1.75^{c}	7.03±1.90^{e}
Perimetre Oranı (AU)	2.17±0.25^{a}	3.25±0.31^{d}	2.54±0.28^{b}	2.98±0.27^{c}	3.75±0.32^{e}

Aynı satırda yer alan harfler (a-e) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Kontrol ve farklı sayılarda probiyotik ile beslenen gruplara ait bağırsak doku örneklerinin villus boyu karşılaştırıldığında kontrol grubuna kıyasla BM8 grubu dışında diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). BM8 grubunda kontrol grubuna kıyasla artış göstermekle birlikte, istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Farklı sayılarda *Bacillus subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen balıklarda artan doza bağlı olarak villus boyunun artış gösterdiği ancak iki doz arasındaki artış oranının istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p < 0.05$).

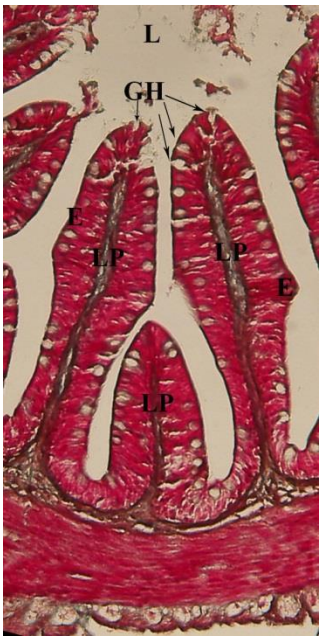
Değerlendirilen bağırsak dokularının birim epitel uzunluktaki goblet hücre sayısının, probiyotik ile beslenen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. En fazla sayıda goblet hücresi, BS8 grubu (7.03±1.90) balıkların bağırsak dokularında tespit edilmiştir.

Perimetre oranı değerlendirildiğinde, kontrol grubuna kıyasla farklı sayılarda probiyotik ile beslenen gruplara ait bağırsak doku örneklerinin PO değerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). *Bacillus subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen balıklarda artan doza bağlı olarak PO değerinin artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulgusuna ulaşılmıştır ($p < 0.05$). Ancak, *Bacillus mojavensis* ilave edilen diyetler ile beslenen balıklarda artan doza bağlı olarak PO değerinin azalış gösterdiği ve bu azalışın yine istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

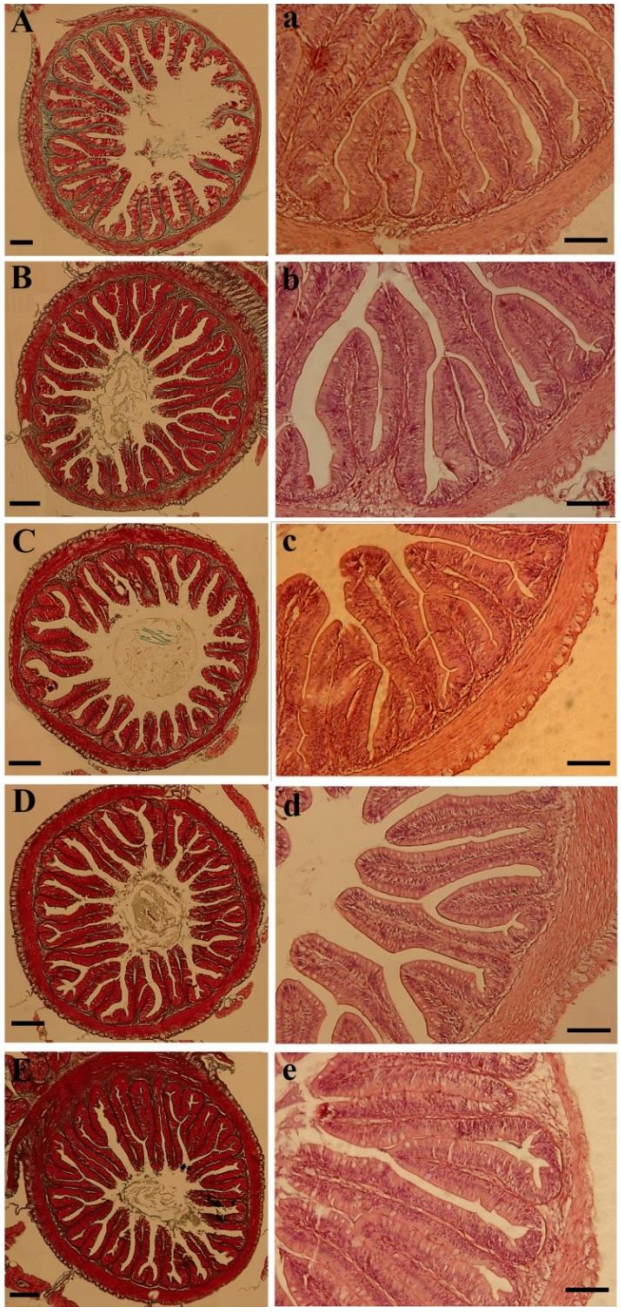


Şekil 4.8. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler

Masson's–Trichrome yöntemiyle boyanan kesitlerde goblet hücreleri gösterilmiştir (Şekil 4.9.). Goblet hücrelerinin villus boyunca epitel içinde lokalize oldukları gözlenmiştir. Kontrol ve probiyotik ile beslenen gruplara ait M-T ve H&E ile boyanmış barsak kesitleri ise Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Villus boyunca epitel içinde goblet hücrelerin görünümü E: Epitel, LP: Lamina propria, GH: Goblet Hücresi, L: Lümen



Şekil 4.10. M-T(A-E) ve H&E(a-e) ile boyanmış barsak kesitleri; A, a- Kontrol, B,b - BM6, C, c- BM8, D, d- BS6, E,e- BS8 Grubu. Bar: A-E: 120µ, a-e: 60µ

4.1.7.2. Mikrovilli Uzunluğu Ölçümleri ve Mikrovilli Yoğunluğu

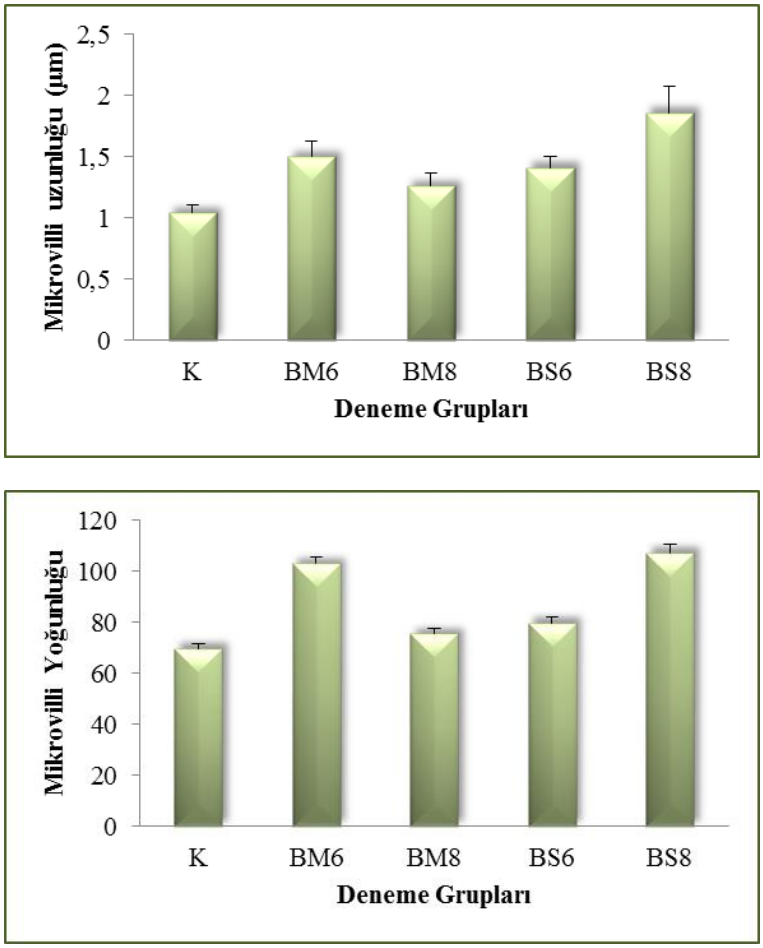
Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin anteriyor bağırsak dokusunda yapılan mikrovilli uzunluğu ölçümleri ve mikrovilli yoğunluğu Çizelge 4.11.' de grafikleri ise Şekil 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan mikrovilli uzunluğu ölçümleri ve mikrovilli yoğunluğu

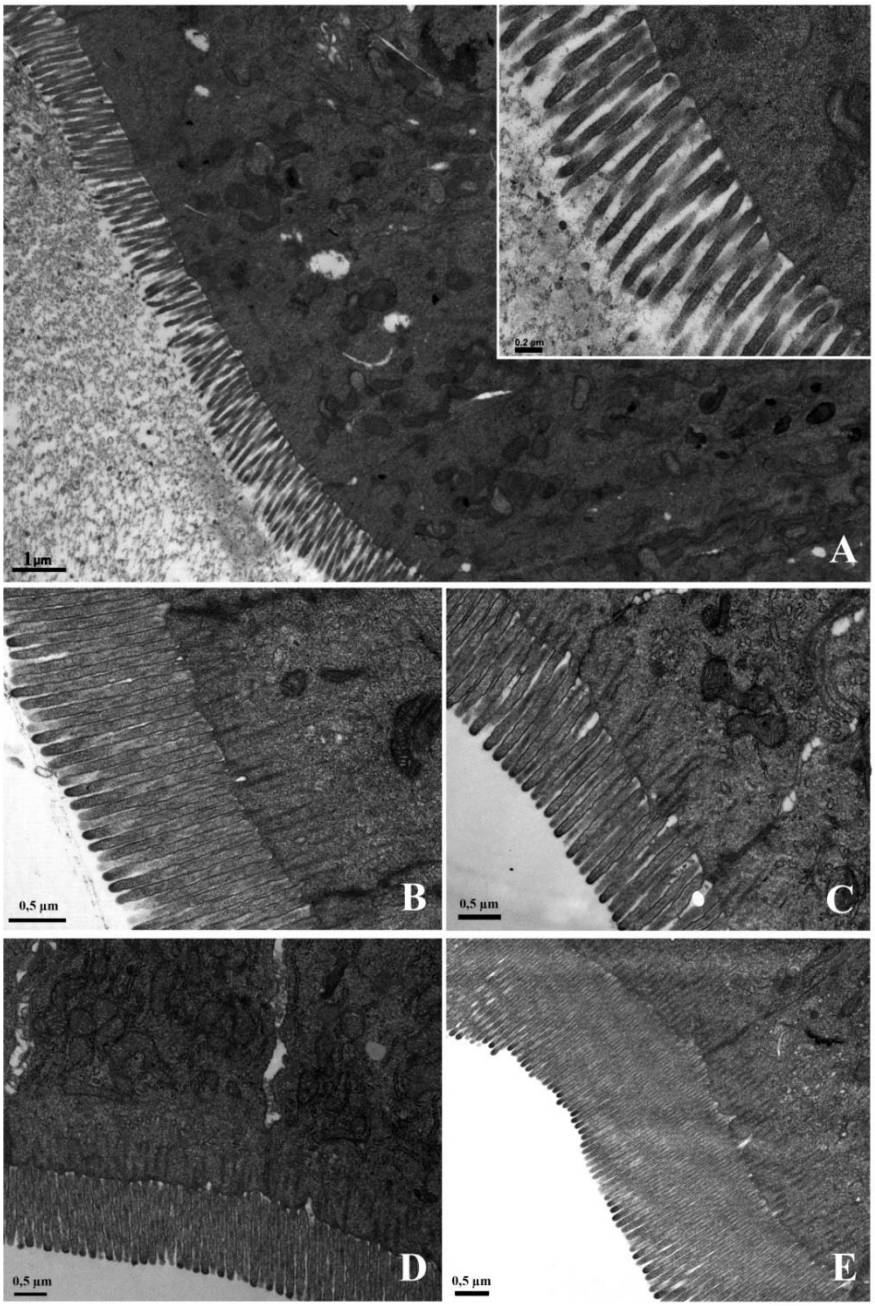
	Deneme Grupları				
	Kontrol	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
Mikrovilli Uzunluğu (µm)	1.04 ± 0.07^{a}	1.50 ± 0.13^{d}	1.26 ± 0.11^{b}	1.41 ± 0.09^{c}	1.86 ± 0.22^{e}
Mikrovilli Yoğunluğu	69.79 ± 1.69^{a}	103.11 ± 2.42^{d}	75.42 ± 2.27^{b}	79.89 ± 2.23^{c}	107.32 ± 3.15^{e}

Aynı satırda yer alan harfler (a-e) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

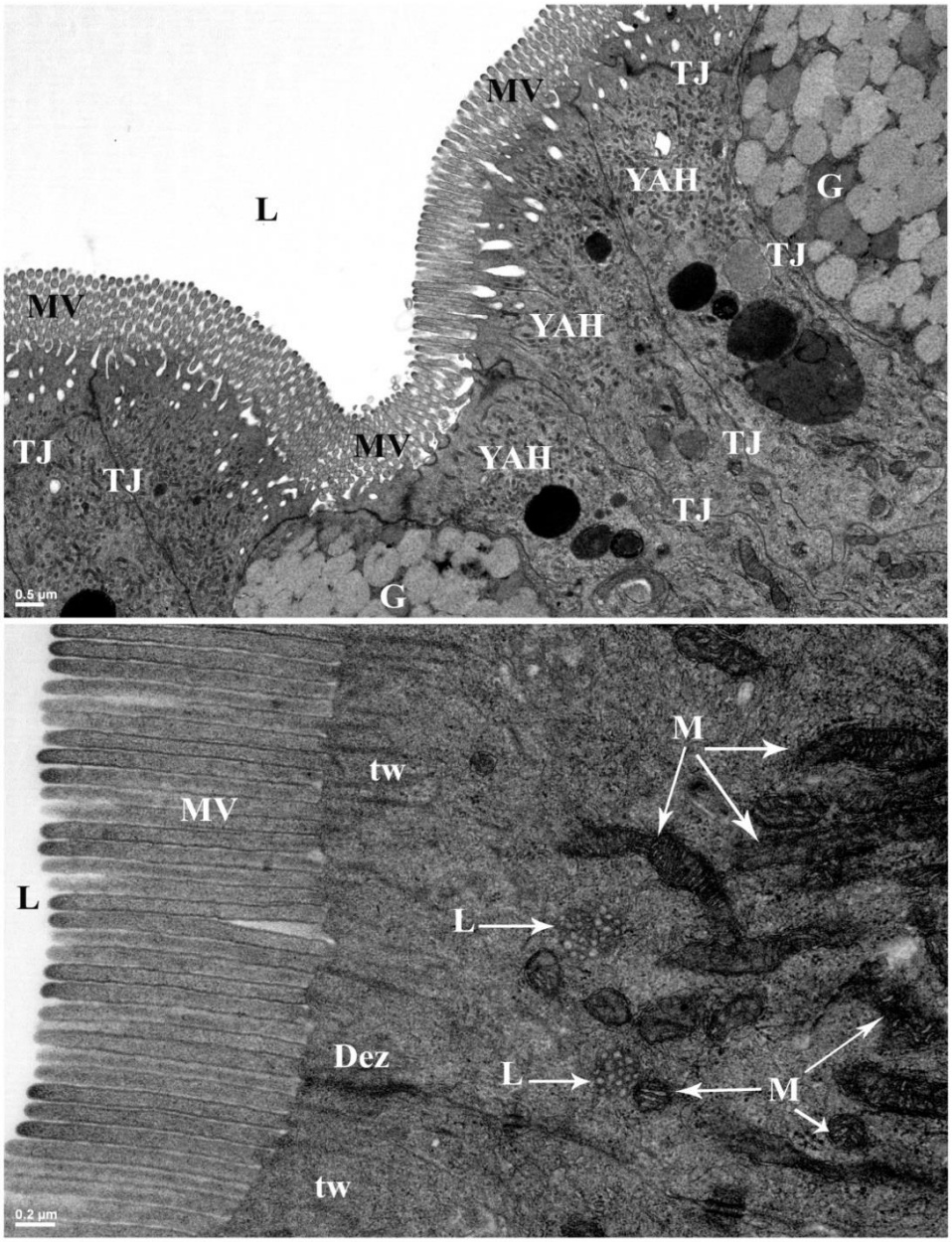
Mikrovilli uzunluğu ve yoğunluğu değerlendirildiğinde, farklı sayılarda probiyotik ile beslenen gruplara ait bağırsak doku örneklerinin MU ve MY değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). *Bacillus subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen balıklarda artan doza bağlı olarak bu değerinin artışının istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bunun aksine, *Bacillus mojavensis* ilave edilen diyetler ile beslenen balıklarda artan doza bağlı olarak bu değerlerin azalış gösterdiği ve bu azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Deneme gruplarına ait mikrovillus görünümleri yapılan elektron mikroskobik incelemeler sonucunda ortaya konmuştur (Şekil 4.12.). Geçirimli elektron mikroskobisinde bağırsak yüzey absorbsiyon hücreleri, goblet hücreleri ve hücre içi organeller Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler



Şekil 4.12. Geçirimli Elektron Mikroskobisinde Deneme Gruplarına ait Microvilli Görünümleri. A- Kontrol, B- BM6, C- BM8, D- BS6, E- BS8 Grubu.



Şekil 4.13. Geçirimli Elektron Mikroskobisinde Barsak Yüzey Absorbsiyon Hücreleri, Goblet hücreleri ve Hücre içi Organeller. YAH: Yüzey Absorbsiyon, MV: Mikrovilli, tw: Terminal Web, L: Lizozom, M: Mitokondri, L: Lümen, Dez: Desmosom, G: Goblet, TJ: Tight Junction

4.1.8. Bağırsak Dokularında HSP70 ve Sitokinlerin mRNA Katlı Değişim Seviyeleri

4.1.8.1. HSP70 Gen Ekspresyon Seviyeleri

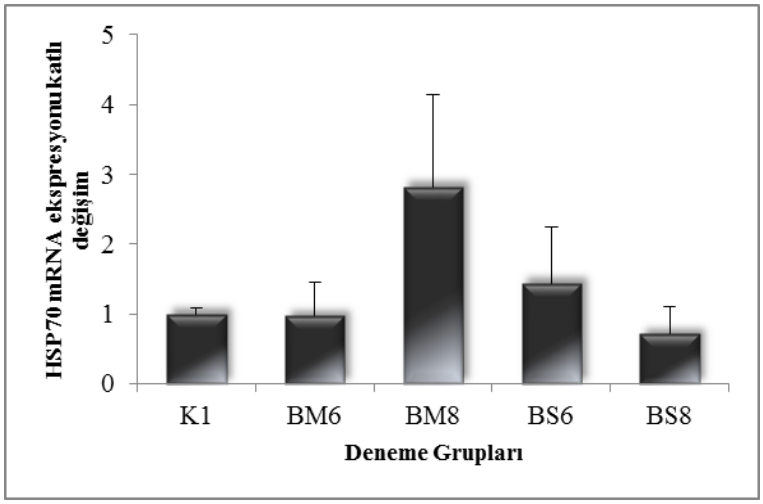
Besleme denemesinin sonunda alınan bağırsak dokularında HSP70 ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında HSP70 mRNA katlı değişim seviyeleri Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda HSP70 mRNA düzeylerinin katlı değişim seviyeleri

HSP70 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
Deneme Grupları	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
	1.00 ± 0.08^{a}	0.98 ± 0.49^{a}	2.82 ± 1.32^{b}	1.44 ± 0.81^{a}	0.71 ± 0.40^{a}

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

HSP70 gen ekspresyonu seviyelerine bakıldığında, BM8 grubunun bağırsak dokusunda kontrol grubuna oranla yaklaşık 2.8 ekspresyon kat artışı tespit edilmiş ve diğer grupların bağırsak dokularında tespit edilen seviyelerden önemli düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). *B. subtilis* aday probiyotik ile beslenen gruplarda doz artışıyla birlikte HSP70 ekspresyon seviyesinin azaldığı, *B.mojavensis* ile beslenen gruplarda doz artışıyla birlikte HSP70 ekspresyon seviyesinin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). BM8 grubu hariç, kontrol grubu ile farklı dozlarda probiyotik ilave edilen yemlerle beslenen diğer gruplarda HSP70 mRNA seviyesindeki katlı değişim istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.14. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda HSP70 mRNA katlı değişim seviyeleri

4.1.8.2. TGF-β Gen Ekspresyon Seviyeleri

Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında TGF-β mRNA katlı değişim seviyeleri Çizelge 4.13. ve Şekil 4.15.'de verilmiştir.

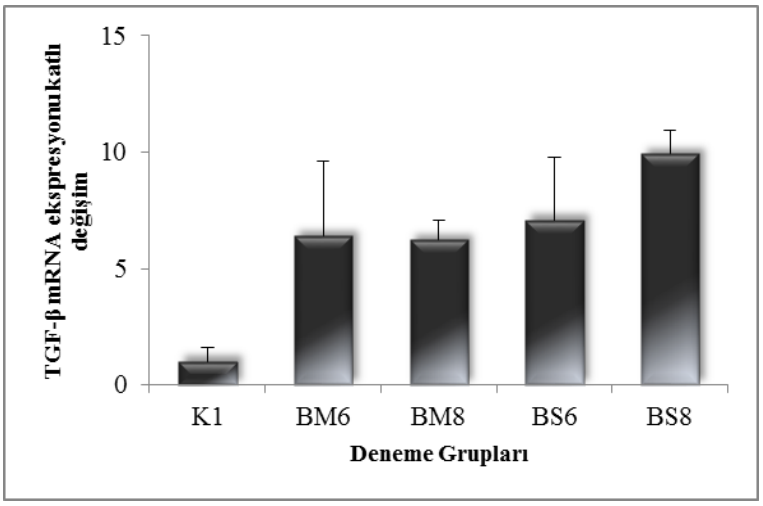
Çizelge 4.13. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TGF-β mRNA katlı değişim seviyeleri

TGF-β GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
Deneme Grupları	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
	1.00±0.59[a]	6.38±3.22[b]	6.23±0.82[b]	7.08±2.73[b]	9.93±1.00[b]

Aynı satırda yer alan harfler (a-b) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

TGF-β gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 grupların bağırsak dokularında yaklaşık 6.38, 6.23, 7.08, 9.93 katlı değişimlerle uyarıldığı

tespit edilmiştir. Probiyotik ile beslenen tüm gruplarda TGF-β gen ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre önemli seviyede artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Ancak, artan dozda probiyotik ilavesi her iki probiyotik grubunda ilgili gen ekspresyon seviyesi açısından önemli bir farklılık oluşturmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.15. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TGF-β mRNA katlı değişim seviyeleri

4.1.8.3. IL-10 Gen Ekspresyon Seviyeleri

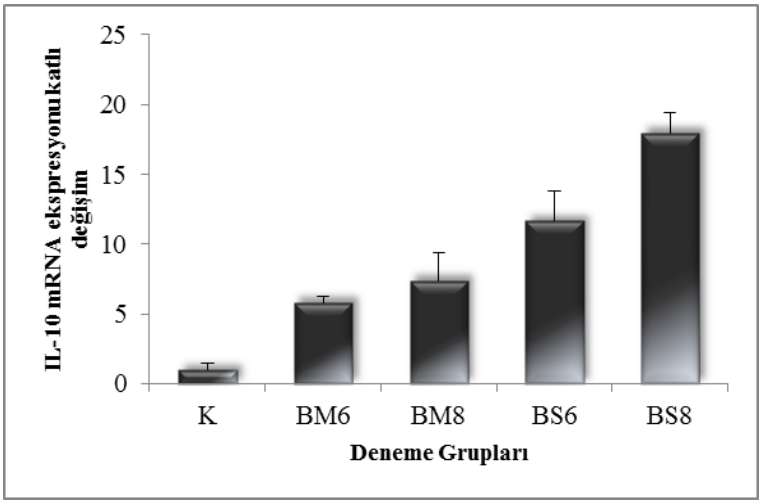
Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında IL-10 mRNA katlı değişim seviyeleri Çizelge 4.14. ve Şekil 4.16.'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-10 mRNA katlı değişim seviyeleri

IL-10 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
Deneme Grupları	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
	1.00 ± 0.43^{a}	5.82 ± 0.48^{b}	7.37 ± 1.99^{b}	11.68 ± 2.12^{c}	18.00 ± 1.41^{d}

Aynı satırda yer alan harfler (a-d) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

IL-10 gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 grupların bağırsak dokularında yaklaşık 5,82, 7.37, 11.68, 18 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. Farklı dozlarda *B.mojavensis* ilave edilen diyetlerle beslenen grupların bağırsak dokularında doza bağlı olarak IL-10 gen ekspresyonu seviyelerindeki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Ancak *B.subtilis* ilave edilen diyetlerle beslenen grupların bağırsak dokularında doza bağlı olarak IL-10 gen ekspresyonu seviyeleri bakımından önemli farklılık oluştuğu gözlenmiş ($p<0.05$), en yüksek mRNA katlı değişim seviyesi BS8 grubunda tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri türleri açısından değerlendirildiğinde ise, *B.subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen gruplarda diğer gruplara kıyasla bağırsak dokuda IL-10 gen ekspresyon seviyelerinin daha fazla katlı artış gösterdiği bulgusuna ulaşılmıştır ($p<0.05$). Probiyotik ile beslenen tüm grupların bağırsak dokularında IL-10 gen ekspresyonun kontrol grubuna göre önemli seviyede artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4.16. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-10 mRNA katlı değişim seviyeleri

4.1.8.4. TNF-α Gen Ekspresyon Seviyeleri

Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında TNF-α mRNA katlı değişim seviyeleri Çizelge 4.15. ve Şekil 4.17'de verilmiştir.

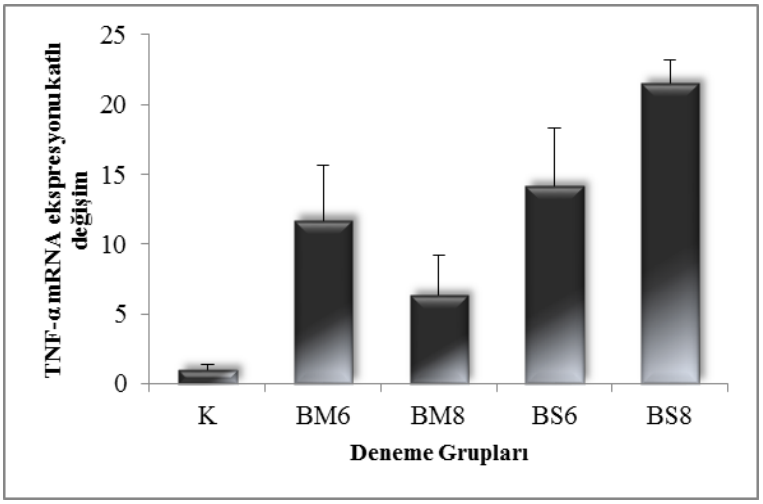
Çizelge 4.15. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TNF-α mRNA katlı değişim seviyeleri

TNF-α GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
Deneme Grupları	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
	1.00 ± 0.38^{a}	11.71 ± 3.94^{bc}	6.33 ± 2.83^{ab}	14.17 ± 4.19^{c}	21.50 ± 1.68^{d}

Aynı satırda yer alan harfler (a-d) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

TNF-α gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm grupların kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 gruplarının bağırsak dokularında yaklaşık 11.71, 6.33, 14.17 ve 21.5 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. Probiyotik ile beslenen tüm grupların bağırsak

dokularında TNF-α gen ekspresyonu kontrol grubuna göre önemli seviyede artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Farklı dozlarda *B.mojavensis* ilave edilen diyetlerle beslenen gruplarda doza bağlı olarak TNF-α gen ekspresyonu seviyelerindeki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$), ancak farklı dozlarda *B.subtilis* ilave edilen diyetlerle beslenen grupların bağırsak dokularında doza bağlı olarak TNF-α gen ekspresyonu seviyelerindeki değişimin anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre en yüksek TNF-α mRNA katlı değişim seviyesi BS8 grubunda tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri türleri açısından değerlendirildiğinde ise, *B.subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen grupların bağırsak dokularında diğer gruplara kıyasla TNF-α gen ekspresyon seviyelerinin daha fazla katlı artış gösterdiği bulgusuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.17. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda TNF-α mRNA katlı değişim seviyeleri

4.1.8.5. IL-1β Gen Ekspresyon Seviyeleri

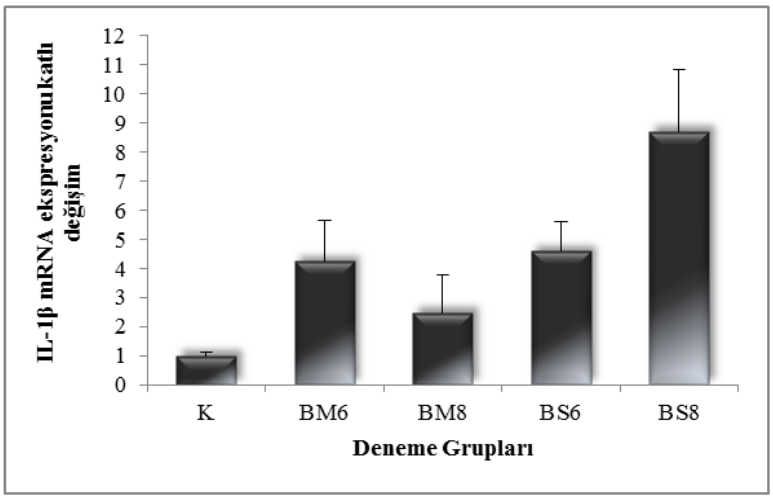
Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında IL-1β mRNA katlı değişim seviyeleri Çizelge 4.16. ve Şekil 4.18.'de verilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı dozlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-1β mRNA katlı değişim seviyeleri

IL-1β GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
Deneme Grupları	**Kontrol**	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
	1.00 ± 0.10^{a}	4.24 ± 1.42^{b}	2.47 ± 1.32^{ab}	4.59 ± 1.03^{b}	8.71 ± 2.12^{c}

Aynı satırda yer alan harfler (a-c) istatistiksel olarak farklılıkları ifade etmektedir.
Değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir.

IL-1β gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, probiyotik ile beslenen tüm gruplarda kontrol grubuna göre sırasıyla BM6, BM8, BS6 ve BS8 grupların bağırsak dokularında yaklaşık 4.24, 2.47, 4.59, 8.71 katlı değişimlerle uyarıldığı tespit edilmiştir. Farklı dozlarda *B.mojavensis* ilave edilen diyetlerle beslenen grupların bağırsak dokularında doza bağlı olarak IL-1β gen ekspresyonu seviyelerindeki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Ancak *B.subtilis* ilave edilen diyetlerle beslenen grupların bağırsak dokularında artan doz oranına bağlı olarak IL-1β gen ekspresyonu seviyeleri bakımından önemli farklılık oluştuğu bulgusuna ulaşılmış ($p<0.05$), en yüksek mRNA katlı değişim seviyesi BS8 grubunun bağırsak dokusunda tespit edilmiştir. Probiyotik bakteri türleri açısından değerlendirildiğinde ise, aynı dozlarda (10^6 CFU/g) *B.subtilis* ve *B.mojavensis* ilave edilen diyetler ile beslenen gruplardaki balıkların bağırsak dokularının IL-1β gen ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.18. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapyaların bağırsak dokusunda IL-1β mRNA katlı değişim seviyeleri

Probiyotik ile beslenen tüm grupların bağırsak dokularında IL-1β gen ekspresyonun kontrol grubuna göre önemli seviyede artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$).

4.1.9. Probiyotik Bakteriler ile Beslenen Tilapya'larda *Streptococcus iniae* Eprüvasyon Uygulaması Bulguları

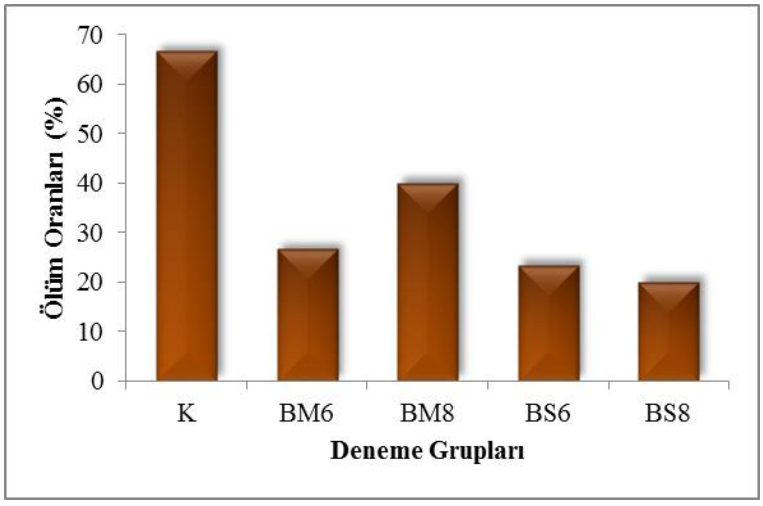
Elde edilen iki potansiyel probiyotik suşun, Tilapya balıklarında *Streptococcus iniae*'ye karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek amacıyla, deneysel ortama adapte edilmiş tilapya bireyleri besleme denemesinin sonunda (60. gün) 7×10^3 CFU/ml dozunda (LD50) *Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiştir. Eprüvasyon uygulaması sonrasında probiyotik uygulaması yapılan tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha az ölüm oranları tespit edilmiştir (Çizelge 4.17. ve Şekil 4.19.). En az ölüm oranı ise 10^8 CFU/g *B.subtilis* ilave edilen diyetler ile beslenen (BS8) (%20) gruplardaki balıklarda gözlenmiştir.

Çizelge 4.17. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen ölüm oranları (%)

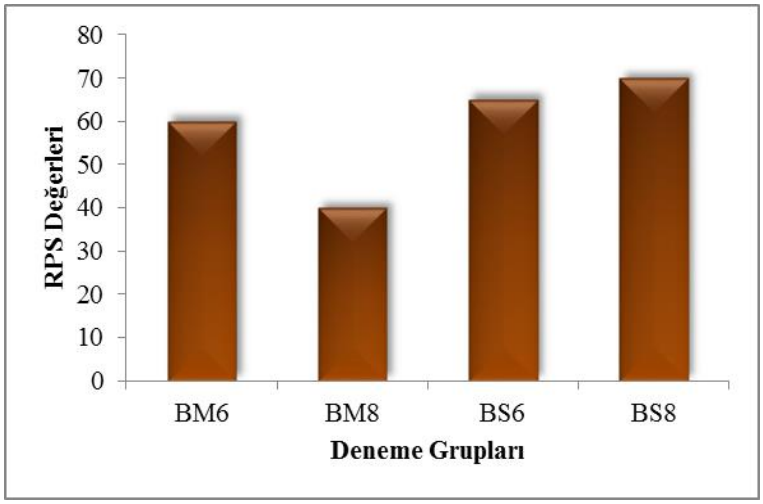
	Deneme Grupları				
	Kontrol	**BM6**	**BM8**	**BS6**	**BS8**
Toplam Balık Sayısı	30	30	30	30	30
Ölen Balık Sayısı	20	8	12	7	6
Mortalite (%)	66,67	26,67	40	23,33	20

Streptococcus iniae patojen bakterisi ile eprüvasyon uygulaması sonrasında balıklardaki RPS (Nispi Yaşama Oranı Yüzdesi) değerleri incelendiğinde, BM6, BM8, BS6 ve BS8 grubundaki balıklarda RPS değerleri sırasıyla %60, %40, %65 ve %70 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.20.).

*B.subtilis'*in 10^8 CFU/g doz uygulaması Tilapya bireylerini *Streptococcus iniae* patojen bakterisine karşı diğer probiyotik uygulaması yapılan gruplara göre daha etkin bir koruma sağlamıştır.



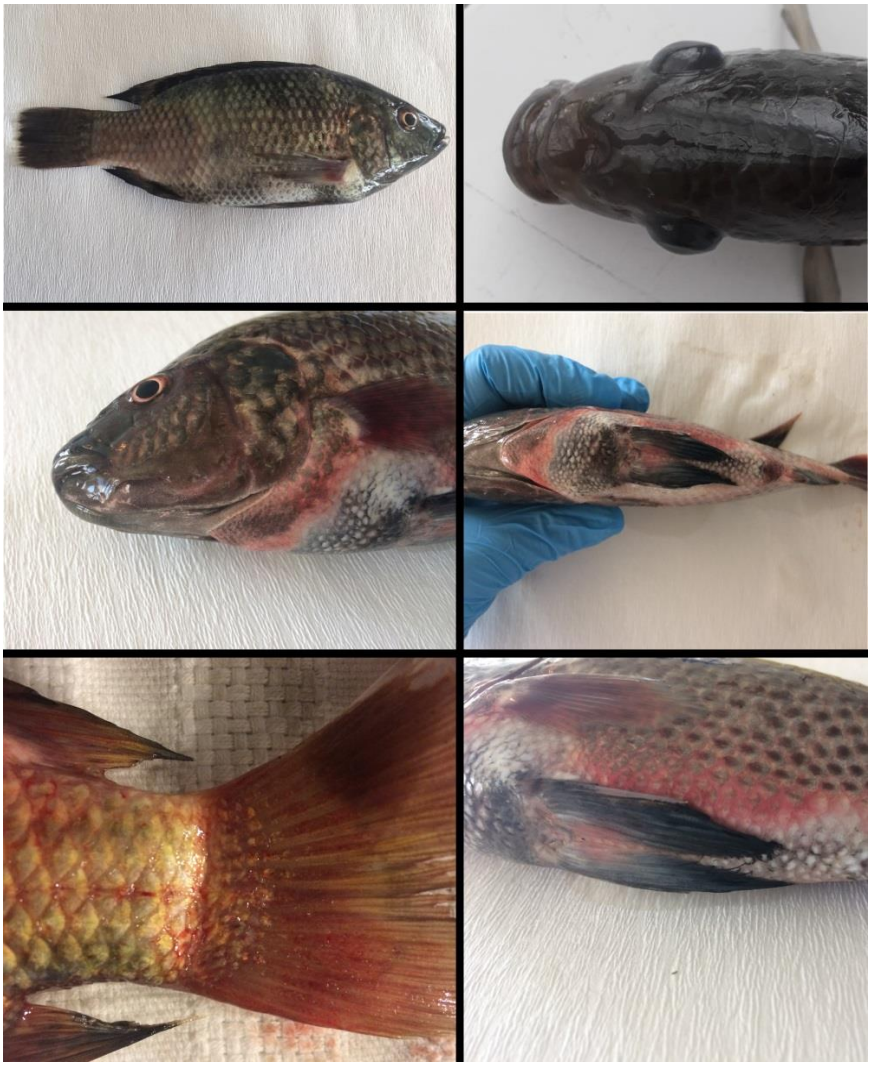
Şekil 4.19. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen ölüm oranları (%)



Şekil 4.20. Farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda 7×10^3 CFU/ml dozunda *Streptococcus iniae* ile eprüvasyonu sonrasında görülen nispi yaşama oranı yüzdeleri (RPS)

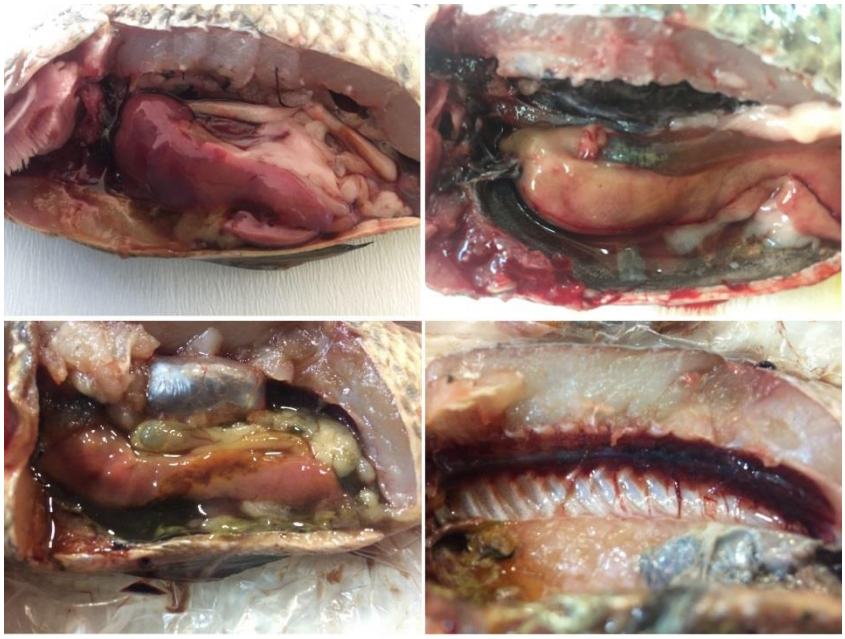
4.1.9.1. Enfekte Balıkların Klinik ve Otopsi Bulguları

Enfekte balıklarda renk koyulaşması, ekzoftalmus, vücut yüzeyinde ve yüzgeçlerde hiperemik alanlar, anüste prolapsus, abdominal şişkinlik belirlenmiş, tank köşelerinde hareketsiz durma, iştahsızlık ve ani sıçrama hareketleri gibi klinik bulgular gözlemlenmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Enfeksiyon sonrası Tilapya bireylerinde gözlemlenen klinik bulgular

Eprüvasyon sonrası enfekte balık bireylerinde yapılan otopside, iç organlardan karaciğer ve arka böbrekte büyüme, karaciğerin normale göre renginin daha açık ve kanamalı olduğu, vücut boşluğunda asites gibi bulgulara rastlanılmıştır (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Enfeksiyon sonrası Tilapya bireylerinde gözlemlenen internal bulgular

4.2. Tartışma

4.2.1. Büyüme Parametreleri, Yem Değerlendirme Oranları ve Somatik İndeksler

Probiyotik ilave edilen edilen diyetler ile besleme, probiyotiklerin sindirim enzimleri (amilazlar, proteazlar ve lipazlar, vs.) üretme ve besin (vitaminler, yağ asitleri ve amino asitler) sağlama yetenekleri sayesinde, alınan besinlerin sindirimini ve emilimini arttırmaktadır. Bu durum, sucul canlıların büyüme performansının artmasına neden olabilmektedir (Ray ve ark., 2012; Irianto ve Austin, 2002). *Bacillus* ekzoenzimleri, çeşitli karbonhidrat, lipid ve proteinleri metabolize etmekte çok etkilidir (Liu ve ark., 2009). Sindirim sistemindeki yüksek enzim aktiviteleri, konağın sindirim kapasitesini ve büyüme performansını arttırmaktadır. Farklı balık türleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarda, diyetlere ilave edilen *Bacillus*'un, ekzoenzim üretme kabiliyeti nedeniyle, sindirim aktivitelerinin gelişmiş olduğunu, büyüme performansının canlı ağırlığı ve yem

verimliliğinin artmasıyla birlikte gelişim gösterdiğini ortaya koymuştur (Honsheng, 2010; Arıg ve ark., 2013; Purwandari ve Chen, 2013 Liu ve ark., 2017). Örneğin, Liu ve ark., (2012) *B. subtilis*'in ekzoenzim aktivitesinin, *Epinephelus coioides*'in canlı ağırlığı ve yem verimliliğini önemli ölçüde artırdığını, De ve ark., (2015) *Bacillus* sp. ilave edilen diyet ile beslemenin *Lates calcarifer'*in canlı ağırlığını önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında, Tilapya'nın, daha önce kendi doğal bağırsak florasından izole edilen *Bacillus subtilis* ve *Bacillus mojavensis* aday probiyotik bakterilerin spor formları ile farklı dozlarda beslenmesinin, Tilapya bireylerinin yem değerlendirme oranı, büyüme performansı üzerine etkileri; canlı ağırlık olarak büyüme, oransal büyüme, spesifik büyüme, boyca büyüme, yem çevirim oranı, günlük yem alımı, kondüsyon faktörü, hepatosomatik indeks ve viserosomatik indeks değerleri gibi parametreler incelenerek değerlendirilmiştir.

Probiyotik bakterilerin büyüme parametreleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla Tilapya bireyleri, kontrol yemi (probiyotik ilave edilmeyen) ve bu yeme 1×10^6 CFU/g (BM6; BS6) ile 1×10^8 CFU/g (BM8; BS8) (*Bacillus mojavensis* ve *Bacillus subtilis* içeren) oranlarında probiyotik ilave edilerek hazırlanan deneme yemleriyle 60 gün süreyle beslenmiştir. Başlangıç canlı ağırlık ortalamaları 52.78±0.31 g olan tilapya bireyleri deneme sonunda en iyi büyümeyi BS8 (140.83±2.90 g) grubunda göstermiştir. Bu grubu sırasıyla BM6 grubu (140.70±3.66 g), BS6 grubu (140.35±2.76 g), BM8 grubu (137.69±2.73 g) ve kontrol grubu (132.80±1.85 g) takip etmiştir. Çalışmamızda, farklı dozlarda *B.mojavensis* ilave edilen diyetlerle beslenen gruplarda doz artışına bağlı olarak canlı ağırlık ortalamaları açısından azalış olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Makled ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada tilapya diyetlerine üç farklı konsantrasyonda (% 0.0, 0.05 ve 1.0) *Psychrobacter namhaensis* SO89 probiyotik ilave ederek, 50 günlük besleme denemesi gerçekleştirmiştir. En iyi büyümenin ve yem çevirim oranının % 0.05 probiyotik ilave edilen grupta olduğu, diyette bakteriyel konsantrasyonun % 1'lik artışının, Nil tilapyasının büyüme performansı

üzerinde önemli bir düşüşe neden olduğunu, buna ek olarak, probiyotiklerin balık yemlerine optimum seviyeyi aşan konsantrasyonlarda ilave edildiğinde, uygunsuz kolonizasyonları nedeniyle kendi aralarında rekabet edebileceği ileri sürülmüştür. Çalışmamızda, oransal büyüme oranları incelendiğinde, kontrol grubu (%152.28) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir OBO sergilemiş, en yüksek OBO %166.89 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir. Spesifik Büyüme oranları incelendiğinde yine aynı şekilde, kontrol grubu (1.54±0.02) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir SBO göstermiş, en yüksek SBO değeri 1.64±0.03 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir.

Yem değerlendirme parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yem çevirim oranı ve günlük yem alım oranları hesaplanmıştır. Yem çevirim oranları incelendiğinde, deneme sonunda kontrol grubu (1.11±0.03) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha yüksek bir YÇO göstermiş, en iyi YÇO değeri 1.01±0.02 ile BS8 grubunda olduğu belirlenmiştir. Günlük yem alım oranları incelendiğinde ise, besleme denemesi sonunda GYA en iyi olan grup 2.00±0.05 ile kontrol grubu iken, en düşük GYA sahip grup ise 1.91±0.05 ile BS8 grubu olmuştur. Kontrol grubu ile BS8 grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Kondüsyon faktörü incelendiğinde, besleme denemesinin sonunda, en yüksek kondüsyon değeri 1.86±0.14 ile BM8 grubunda, en düşük değer ise 1.74±0.02 ile BS6 grubunda elde edilmiştir. Ancak, tüm gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Hepatosomatik indeks değeri incelendiğinde, denemenin sonunda en yüksek HSİ değeri 3.55±0.46 ile BS8 grubunda, en düşük değer ise 1.99±0.36 ile kontrol grubunda elde edilmiştir. Tüm gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Viserosomatik indeks değeri incelendiğinde ise denemenin sonunda yine aynı şekilde en yüksek VSİ değeri 11.20±0.56 ile BS8 grubunda, en düşük değer ise 6.94±0.89 ile kontrol grubunda elde edilmiştir.

Araştırma bulgularımıza paralel olarak tilapya üzerinde yapılan farklı çalışmalarda da benzer sonuçlar olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2017; Elsabagh ve ark., 2018; Abarike ve ark., 2018; Sutthi ve ark., 2018). Liu ve ark., (2017), ortalama başlangıç ağırlıkları 95±8 g olan tilapya bireylerinin yemlerine 10^8 CFU/g oranında *B.subtilis* HAINUP40 ilave ederek, 8 haftalık bir besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. Besleme denemesinin sonunda, probiyotik ile beslenen grupta canlı ağırlığın, spesifik büyüme oranının kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını, yem çevirim oranının ise önemli ölçüde düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Elsabagh ve ark., (2017) ortalama başlangıç ağırlıkları 20±1.26 g olan tilapya fingerling yemlerine 0 (B0), 0.1 (B1) ve 0.2 (B2) g / kg diyet oranlarında ticari bir probiyotik ürün olan Sanolife PRO-F ilave edilerek yapılan 10 haftalık besleme denemesi sonrasında, probiyotik ilave edilen diyetler ile beslenen tilapya bireylerinde canlı ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı ve yem çevirim oranı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmediğini, kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında probiyotik ile beslenen bireylerde canlı ağırlık kazancının ve spesifik büyüme oranının arttığını, yem çevirim oranının ise belirgin bir düşüş gösterdiğini, kondüsyon faktörü değerinin ise gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Abarike ve ark., (2018) tilapya (*Oreochromis niloticus*) bireylerinde büyümeyi geliştirmek için gerekli olan dozu belirlemek amacıyla BS (*B. subtilis* ve *B. licheniformis* karışımı) olarak tanımlanan probiyotik ürünü değerlendirmişlerdir. Ortalama ağırlıkları 53.01 ± 1.0 g olan balıklar, 0 g kg^{-1} (CT), 3 g kg^{-1} (BS3), 5 g kg^{-1} (BS5) 7 g kg^{-1} (BS7) ve 10 g kg^{-1} BS (BS10) farklı oranlarda ilave edilmiş bazal diyetle 4 hafta boyunca beslenmiştir. Besleme çalışmasının sonunda, tüm probiyotik ile zenginleştirilmiş gruplarda final ağırlığının, spesifik büyüme oranının ve ağırlık kazancının arttığı, yem çevirim oranın ise düştüğü belirlenmiştir. VSİ ve HSİ değerleri probiyotik ile beslenen gruplarda kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuş, en iyi büyümenin BS10 grubunda olduğu tespit edilmiştir. Sutthi ve ark., (2018) tilapyaların kültüre alındıkları suya farklı oranlarda maya (*Saccharomyces*

cerevisiae) (5.6×10^8 cfu/g) ve *Bacillus* spp. (*B. subtilis, B. megaterium ve B. licheniformis*) (1×10^6 cfu/g) eklemiş ve 90 gün boyunca besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç ağırlıkları 5.8 ± 0.10 g olan balıkların besleme denemesi sonunda, probiyotik ve maya uygulaması yapılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla son canlı ağırlığının, ağırlık kazançlarının ve ortalama günlük büyüme oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak, spesifik büyüme oranı ile yem çevirim oranının gruplar arasında önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Çapkın ve Altınok, (2009) 60 gün süreyle yaptıkları besleme denemesinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine 10^8 CFU/g oranında *Enterobacter cloacae* ve *Bacillus mojavensis* karışımı ilave ederek, probiyotiğin etkisini kontrol yemiyle beslenen grup ile karşılaştırmışlardır. Besleme denemesi sonunda, probiyotik ilave edilen grupta (%5.25±0.99/gün) spesifik büyüme oranının kontrol grubuna (%4.05±0.18/gün) göre önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu durumun aksine, tilapya bireylerinde probiyotik uygulamalarının, büyüme performansı üzerinde etkisinin görülmediği çalışmalar da mevcuttur (Addo ve ark., 2006; Ferguson ve ark., 2010; Telli ve ark., 2014). Ferguson ve ark., (2010) tilapyarda probiyotik takviyesi olarak *Pediococcus acidilactici* türünü değerlendirmişlerdir. Yeme 10^7 CFU/ g oranında eklenen bakteri ile 32 günlük bir besleme denemesi yürütülmüştür. Deneme sonunda, probiyotik ile beslenen grup ile kontrol grubu arasında büyüme performansı açısından, anlamlı bir değişim olmadığı bildirilmiştir. Addo ve ark., (2017) ortalama ağırlıkları 16.5 ± 0.2 g olan jüvenil nil tilapyalarını, 4×10^7 CFU/ g yem dozunda *Bacillus subtilis* (SB3086, SB3295, SB3615 ve AP193) suşlarının tek başına ve kombinasyonu (SB3086+SB3615) ile formüle edilmiş beş farklı diyetle 21 gün boyunca beslemişlerdir. Besleme çalışmasının sonunda, probiyotik diyetle beslenen gruplarda kontrol grubuna göre büyüme performansı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Telli ve ark, (2014) nil tilapyası ile yaptıkları çalışmada, iki farklı stoklama yoğunluğunda (18.75 balık m^{-3}, 62.50 balık m^{-3}) *Bacillus subtilis*

takviyeli diyet uygulamasının (5×10^6 CFU g/yem) büyüme performansı üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Besleme denemesi (84 günlük) sonrasında, probiyotik takviyeli diyetle beslenen tilapya bireyleri ile kontrol grubu arasında büyüme performansı açısından anlamlı bir farklılık oluşmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulguların, önceki çalışmaların sonuçlarından farklı olmasının nedenlerinin bu denemede çalışılan balık büyüklüğünün ve kullanılan probiyotik bakteri türünün, dozunun, yetiştiricilik koşulları ile deneme süresinin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

4.2.2. Probiyotik ile Beslenen Tilapyaların Bağırsak Dokularında Histomorfometrik Değişimler

Gastrointestinal sistemin endojen mikrobiyotası aynı zamanda balığın gastrointestinal morfolojisi ve işlevini de etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyatasının korunması bağırsak epitel dokusunun gelişimine büyük katkı sağlayacaktır çünkü birçok balık patojeni bağırsak epitelinin bütünlüğünü bozabilir, sağlıklı bir GI mikrobiyal popülasyon ise mukozal hasarı azaltabilir, emilim alanını artırabilir ve patojenik hastalıkları önleyebilir (Merrifield ve ark, 2010). Villusun uzunluğundaki artış mevcut besinlerin daha fazla emilimi için yüzey alanının artması anlamına gelmektedir (Caspary, 1992). Yüksek mikrovilli yoğunluğu, enterositler arasındaki sıkı bağlantıların açığa çıkmasını azaltabilir ve bu durum potansiyel patojenlere karşı daha etkili bir bariyer sağlamaya yardımcı olabilir (Standen ve ark, 2015). Probiyotik bakteriler mideyi geçtikten sonra bağırsakta kolonize olurlar ve büyümeleri için şekeri kullanırlar. Bunun yanı sıra, kısa zincirli yağ asitlerinin üretilmesine katkıda bulunarak, villusun uzunluğunun artmasında önemli bir rol oynayabildiği bildirilmiştir (Pirarat ve ark., 2011). Kısa zincirli yağ asitleri, özellikle bütirik asit, bağırsak epitelyum hücreleri için ana enerji kaynağıdır ve hücre çoğalmasını etkileyebilen gastrointestinal peptidin veya büyüme faktörlerinin salınımını uyarmaktadır (Blottiere ve ark, 2007). Bağırsak mukoza hücrelerinin ana fonksiyonları ise mukozal yüzeyi korumaya, patojenik bakterileri ve parazitleri

yakalamaya, bağırsak yüzeyini kayganlaştırmaya yardımcı olan mukoza jeli üretmek ve salgılamaktır (Dharmani ve ark., 2008). Balıklarda mukoza ile ilişkilendirilmiş lenfoid doku memelilerden farklıdır çünkü Peyer plakları ve antijen taşıyan M hücreleri yoktur. Normalde lenfoid hücre, makrofajlar ve granülositlerden oluşmaktadır. İntraepitelyal lökosit (IEL), bağırsak lenfoid dokusunun bileşeni olarak, intraluminal yabancı antijenlere karşı mukozal savunma mekanizmalarında önemli rol oynamaktadır (Kiristioglu ve ark., 2002). Balıkların gastrointestinal sistemi, önemli birçok balık patojeni için giriş noktasıdır ve yüksek IEL'ler ve goblet hücresi seviyeleri, bağırsak patogenezine karşı direnç sağlayabilmektedir (Standen ve ark, 2013). Yaptığımız bu çalışmada tilapyalarda kullandığımız aday probiyotik bakterilerin, balıkların bağırsak morfolojisi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla ışık ve elektron mikroskopi yöntemleri kullanılarak, villus boyu, goblet sayısı, perimetre oranı, mikrovilli uzunluğu ve mikrovilli yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen tilapya bireylerinin anteriyor bağırsak dokusunda yapılan histomorfometrik ölçümler sonucunda, tüm bu parametrelerin probiyotik ile beslenen balıkların bağırsak dokularında kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttığı belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde, Selim ve Reda (2015) yeme iki farklı dozda (G1: kontrol grubu; G2:1×10^4 CFU/g; G3: 1×10^6 CFU/g *B. amyloliquefaciens* sporları) *B. amyloliquefaciens* ilavesinin, artan dozla birlikte Nil tilapyalarının bağırsak dokularında villus uzunluklarının ve goblet hücre sayılarının kontrol grubuna göre önemli miktarda artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Standen ve ark. (2013) *P. acidilactici* katkılı diyetle (2.81×10^6 CFU/g) altı hafta boyunca beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokularında goblet hücre sayılarının beslemenin altıncı haftasında kontrol grubuna göre arttığını ortaya koymuşlardır. Ancak yapılan bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak mikrovillus uzunluklarının gruplar arasında değişmediği belirlenmiştir. Pirarat ve ark, (2011) yeme 10^{10} CFU/g oranda ilave edilen *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin tilapyaların bağırsak dokularında özellikle proksimal ve distal segmentinde villus uzunluğunun

artış gösterdiğini, goblet hücre sayılarının ise bağırsağın distal segmentinde önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Standen ve ark. (2015) Tilapya diyetlerine 5 g kg^{-1} oranında probiyotik karışımı (*Lactobacillus reuteri, Bacillus subtilis, Enterococcus faecium* ve *Pediococcus acidilactici,* AquaStar® Growout) ilavesinin, balıkların bağırsak dokusunda perimetre oranını, birim epiteldeki goblet hücre sayısını, microvilli uzunluğu ve yoğunluğunu arttırdığını bildirmişlerdir. Standen ve ark. (2016) 3 g/kg oranında probiyotik karışımı (*Bacillus subtilis, Enterococcus faecium, Lactobacillus reuteri* ve *Pediococcus acidilactici* AquaStar® Growout) ilave edilen diyet ile beslenen tilapya bireylerinin bağırsak dokusunda perimetre oranının ve birim epiteldeki goblet hücre sayısının arttığını belirlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada, yeme bağırsak sağlığını iyileştirici ve bağırsağın daha iyi gelişimini sağlayan probiyotik ilavesinin sindirim sistemini geliştirerek daha iyi sindirim sağladığı ve büyüme performansındaki artışının gelişen histomorfolojik özelliklerle orantılı olduğu belirlenmiştir. Özellikle günlük yem alımları düşük olan BS8 grubundaki balıkların en yüksek canlı ağırlık artışına sahip olması histomorfolojik özelliklerinin gelişiminden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan araştırmaların çoğunda, uygun dozlarda kullanılan probiyotiklerin bağırsak morfolojisini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Bu araştırmada potansiyel probiyotik olarak *Basillus subtilis*'in 10^6 ve 10^8 CFU/g dozları ile *Bacillus mojavensis* 'in 10^6 CFU/g dozunun yem katkısı olarak kullanılmasının anteriyor bağırsak morfolojisi üzerine olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Probiyotik ile Beslemenin Tilapyaların Bağırsak Dokularında İmmün İlişkili Bazı Sitokin Genler ile HSP70 Üzerine Etkileri

Tilapyalarda probiyotik kullanımını konu alan birçok çalışma büyüme performansı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu göstermiştir. Ancak, balıkların sağlıklı olması ve patojenlere maruz kaldığında etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturabilmesi de önemlidir. Gastrointestinal sistem (GI) mukozal bariyer fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır. İstilacı patojenlere karşı bariyer görevi

görür, ayrıca kommensal ve mutualist mikropların yerleşmesine olanak sağlar (Foey ve Picchietti, 2014). Probiyotiklerin, bağırsak ilişkili lenfoid dokular (GALT) üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir. Bu faydalar; patojenleri tanıma ve bunlara yanıt verme kapasitesinin sürdürülebilmesi için pro-inflamatuar sitokinlerin (örn., TNFα, IL-1β) ekspresyonunun indüklenmesi ve mukozal toleransının korunması için de düzenleyici sitokinlerin (örn., TGFβ, IL-10) ekspresyonunun indüklemesidir (Standen ve ark., 2016). Bu sitokinler, patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) tanıyan toll benzeri reseptörler (TLR'ler) tarafından başlatılan kompleks moleküler yolakların son ürünleridir (Cerf-Bensussan ve Gaboriau-Routhiau, 2010). Bağırsak mukozası ile sürekli temas halinde olan bağırsak mikrobiyotası ve bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT), patojenik mikroorganizmalar ve kommensal mikroorganizmalar arasında ayrım yapmak ve toleransın mı yoksa bağışıklık yanıtının mı uyarılması gerektiğini belirlemek için mekanizmalar geliştirmek zorundadır (Perez ve ark., 2010). Teleost balıklarda GALT, memelilerdeki Peyer plakları gibi özel yapılar içermez, bunun yerine balıklarda bağırsak mukozası, epitelyal hücrelerde veya lamina propriaya dağılmış olarak lenfositleri, plazma hücreleri, granülositleri ve makrofajları içermektedir (Secombes ve Ellis 2012). Bu bağlamda, bağırsak epitel hücreler, lümende yer alan mikrobiyota ve bağırsak bağışıklık sisteminden aldığı bilgileri işlemektedir. Sonuç olarak, bağışıklığın aktivasyonu ve düzenleyici işlevi, karşılaştıkları bakteriler ve bağışıklıktan türetilen uyaranlara bağlıdır. İntestinal epitelyal hücreler, patern tanıma reseptörlerinin ekspresyonu yoluyla mikrobiyota komponentlerini algılayabilmektedir. Patern tanıma reseptörlerinin en iyi tanımlanan üyelerinden biri Toll-benzeri reseptör (TLR) familyasıdır. Omurgalılarda, bu reseptörler patojen sınıflar arasında ayrım yapabilir ve lipopolisakkaritler, peptidoglikan ve bakteriyel lipopeptidler de dahil olmak üzere geniş çeşitlilikte mikrobiyal ürünün saptanması için gerekli olan uygun immün tepkilerin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Secombes ve Ellis 2012). TLR'ler, bağışıklık tepkilerini başlatan veya güçlendiren immün ve inflamatuar hücreleri

toplayan ve düzenleyen moleküllerin ekspresyonunu arttıran sinyal kaskadlarını aktive ederek bağışıklık yanıtının oluşmasına yardımcı olan moleküllerdir. Bu moleküller lokal olarak diğer bağışıklık hücrelerini aktivasyon bölgesine yerleştirebilir veya sistemik bir bağışıklık yanıtına aracılık edebilirler. Önemli çözünür mediatörler arasında, inflamatuar sitokinler, tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin-1β (IL-1β), kemokinler ve süperoksit ve nitrik oksit de dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri ve anti-inflamatuar sitokinler (IL-10) bulunmaktadır (Secombes ve ark., 2001; Perez ve ark., 2010).

Sitokin genleri, bağışıklık hücreleri tarafından üretilen ve bağışıklık sistemi için sinyal moleküller olarak hareket eden, hücre büyümesi, farklılaşmasına ve konağın savunma mekanizmalarına katkıda bulunan polipeptit veya glikoprotein aracılarıdır. Proinflamatuar sitokinler (İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), immün sistemin düzenleyicileridir. Lenfositleri, makrofajları ve doğal katil hücreleri (NK) aktive ederek, fagositozun, solunumsal patlama aktivitesinin ve nitrit oksit üretiminin artmasını sağlarlar (Selim ve Reda 2015).

Proinflamatuar sitokinlerden IL-1β memelilerde olduğu gibi immün yanıtta temel rol oynamaktadır. Mikrobiyal invazyon ve doku hasarına cevap olarak salınımı artar. Bununla birlikte makrofajları, NK hücreleri ve lenfositleri aktive eden diğer sitokinlerin de salınımını indükleyerek immün cevabı arttırabilir (Panigrahi ve ark., 2007). Bir diğer proinflamatuar sitokin olan TNF-α, makrofajları ve nötrofilleri inflamasyon bölgesine gönderen, bir dizi sitokin salınımını başlatan akut faz proteindir. Bakteriyel kolonizasyona veya invazyona yanıt olarak konağın savunma mekanizmasına katkıda bulunur (Standen ve ark., 2013). Yapılan bu çalışmada tilapyalarda kullandığımız aday probiyotik bakterilerin immün sistem üzerindeki etkilerini ve immüniteden sorumlu bazı sitokin genlerin ekpresyonunu incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda probiyotik ile beslenen tüm grupların bağırsak dokularında IL-1β ve TNF-α gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre önemli seviyede artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmamıza benzer şekilde Pérez-Sánchez ve ark., (2011)

yeme 10^6 CFU/g oranda ilave edilen *Lactobacillus. plantarum* ile 36 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıkların böbrek dokularında IL-1β ve TNF-α gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre önemli oranda arttığını bildirmişlerdir. Pirarat ve ark., (2011), yeme 10^{10} CFU/g oranda ilave edilen *Lactobacillus rhamnosus* GG ile 30 gün boyunca beslenen tilapyanın böbrek dokularında IL-1β ve TNF-α gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Standen ve ark, (2013) yaptıkları çalışmada *P. acidilactici*'nin probiyotik etkisini ortaya koymak amacıyla, tilapya bireylerini, kontrol diyeti ve probiyotik takviyeli diyetle (2.81×10^6 CFU/g) altı hafta boyunca beslemişlerdir. Üçüncü ve altıncı haftalarda yapılan örneklemelerde tilapyanın bağırsak dokusunda TNF- α geninin mRNA seviyesinin, kontrol grubuna oranla probiyotik ile beslenen grupta önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Selim ve Reda, (2015) yaptıkları çalışmada, tilapya diyetlerine 1×10^4 ile 1×10^6 CFU/g iki farklı oranda *Bacillus amyloliquefaciens* spor formunu ilave ederek, 30 günlük besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. Besleme denemesi sonunda probiyotik ile beslenen tilapya bireylerinin böbrek dokusunda TNF-α ile IL-1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Galagarza ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, yeme 10^7 CFU/g oranında ilave edilen *B. subtilis*'in NZ86 (NRRL B-50136) ve O14VRQ (NRRL B-67221) iki farklı suşu ile 51 gün beslenen nil tilapyasının bağırsak dokularında proinflamatuar sitokinlerin (IL 1-β ve TNF-α) gen ekspresyonlarının arttığı, ancak sadece O14VRQ suşu ile beslenen gruptaki mRNA katlı değişim seviyesinin kontrolden önemli ölçüde farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda yapılan bu çalışmalarda da farklı ve benzer balık türü üzerinde, bazı probiyotik bakterilerin IL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimini etkin bir şekilde modüle edebildiğini gösterilmiştir (Pirarat ve ark., 2011; Pérez-Sánchez ve ark., 2011; Standen ve ark., 2013; Selim ve Reda, 2015; Galagarza ve ark., 2018).

TGF-β, dokunun yeniden şekillenmesi, yara onarımı, inflamatuar yanıtta ve hematopoezde rol oynayan önemli bir sitokindir (Lawrence 1996). Mukozal ve periferal dokularda, lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi bağışıklık

hücreleri üzerinde etki göstererek immünniteyi aktive eder (Letterio ve Roberts, 1998). Bununla birlikte IL-10, monositler tarafından üretilen proinflamatuar sitokinleri baskılayarak immün yanıtta önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda probiyotiklerin, TGF-β ve IL-10 gen ekspresyonun seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Standen ve ark., 2016; He ve ark., 2013; He ve ark., 2011). Standen ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada, 3 g/kg oranında ticari probiyotik karışımı (*Bacillus subtilis, Enterococcus faecium, Lactobacillus reuteri* ve *Pediococcus acidilactici*) ilave edilen diyet ile beslenen tilapya bireylerinin 6 haftalık besleme denemesi sonrası bağırsak dokusunda TGF-β ve IL-10 gen ifadesinin önemli derecede arttığı bildirmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda da probiyotik bakteri ilave edilen gruplarda TGF-β ve IL-10 antiinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür.

Isı şoku proteini HSP70 geni, çevrenin olumsuz değişimlerine karşı indüklenen proteinlerdir. HSP70'in, hücresel homeostaz, proteinlerin düzgün katlanması, protein yapılarının ve konağın patojenik strese karşı korunması gibi işlevleri vardır (He ve ark., 2013; Liu ve ark., 2013). Makled ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada, Tilapya diyetlerine 2.8×10^7 ile 5.6×10^7 CFU/g oranında *Psychrobacter namhaensis* SO89 probiyotik ilave ederek, 50 günlük besleme denemesi gerçekleştirmişlerdir. *P. namhaensis* SO89 probiyotik ilave edilen gruplarda, kontrol grubuna kıyasla karaciğer dokusunda HSP70 gen ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. He ve ark., (2013) *Bacillus subtilis* C-3102 ilave edilen diyet ile beslenen tilapya bireylerinde 56 günlük besleme denemesi sonrasında bağırsak dokusunda HSP70 gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda BM6, BS6 ve BS8 gruplarında HSP70 mRNA seviyesinde önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Ancak BM8 grubunun bağırsak dokusunda kontrol grubuna oranla HSP70'in yaklaşık 2.8 kat arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde He ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada, koi sazanı (*Cyprinus carpio*) bireylerini iki farklı diyet (kontrol diyeti ve 1 g/ kg Calsporin®, *Bacillus subtilis* C-3102) ile beş hafta boyunca beslemişlerdir. HSP70

gen ekspresyonunun örnekleme yapılan farklı günlerde bağırsak ve böbrek dokularında herhangi bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte probiyotik diyet uygulamalarının HSP70 gen ekspresyonunu arttırdığı yönünde yapılan bir başka çalışmada (Abarike ve ark., 2018), 0 g kg-1 (CT), 3 g kg-1 (BS3), 5 g kg-1 (BS5) 7 g kg-1 (BS7) ve 10 g kg-1 BS (BS10) oranında probiyotik karışımı (*B. subtilis* ve *B. licheniformis*) ilave edilmiş diyetle tilapya (*Oreochromis niloticus*) bireylerini 4 hafta boyunca beslemişlerdir. Bağırsak ve böbrek dokularında HSP70'in arttığını saptamışlardır. BS7 ve BS10 gruplarında HSP70 geninin ekspresyonunda ki belirgin artışın, ısı stresine karşı artan direnç olduğu ileri sürülmüştür. Bir başka çalışmada ise (Liu ve ark., 2013) iki *Lactobacillus* türü (*Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus acidophilus*) ile 10^5, 10^7, 10^9 CFU/g oranında beş hafta boyunca beslenen hibrid tilapyanın bağırsak dokularında HSP70'in besleme denemesinin 10. gününde önemli oranda arttığı, 20. gününde önemli derecede azaldığı ve 35. gününde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir değişim göstermediği bildirilmiştir. Bu durumun zamana bağlı bir etkinin yanı sıra doza da bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte yaptığımız çalışmada olduğu gibi, diğer yapılan çalışmalarda da probiyotiklerin HSP70 gen ekspresyonu üzerindeki farklı sonuçlarının, örnekleme dönemine, balık türlerine, büyüklüğüne, bakteri suşuna, dozuna, probiyotiğin veriliş yöntemine, eldesine, uygulama süresine ve kültür koşullarına bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir.

4.2.4. Probiyotik ile Beslemenin Tilapyalarda *Streptococcus iniae* Patojenine Karşı Etkisi

Probiyotikler, doğrudan rekabetçi mekanizmaları ve inhibe edici maddelerin üretimiyle veya dolaylı olarak konakçıların kendi immün sistemini modüle ederek patojenlere karşı antagonizm sağlayabilmektedirler. Potansiyel patojenler konağın sindirim sistemine girdikten sonra, faydalı mikroorganizmalar olan probiyotikler, patojen büyümesini veya aktivitelerini engelleyebilmek adına inhibe edici

moleküller üretirler ve adhezyon bölgeleri, besin veya enerji kaynakları için rekabet ederler (Sharifuzzaman ve Austin, 2017). Bakterisidal veya bakteriyostatik etkileri indüklediği bilinen bu maddeler, bakteriyosinler, lizozimler, hidrojen peroksit, proteazlar, karbondioksit ve sideroforları içerir. Bu maddelere ek olarak, organik asitlerin ve uçucu yağ asitlerinin (örneğin laktik, asetik, bütirik ve propiyonik asitler) üretimi bağırsak pH'sını değiştirebilir. Böylece, probiyotikler, fırsatçı patojenik mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyebilirler. Bununla birlikte, probiyotiklerin mukus ve epitel hücrelerine yapışması ve ayrıca gastrointestinal sistemde kolonize olabilmeleri, patojenlerin invazyonuna karşı ilk savunma hattı olarak kabul edilir (De Schryver ve ark., 2012). Farklı balık türleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarda, probiyotik kullanımının patojen bakterilere karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Brunt ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada, gökkuşağı alabalıklarını, yeme 2×10^8 hücre/g dozunda *Bacillus* JB-1 ve *Aeromonas sobria* GC2 ilave edilmiş diyet ile 2 hafta süreyle beslemişlerdir. Probiyotik uygulaması yapılan tilapya bireylerinde, *Aeromonas salmonicida, Lactococcus garvieae, Streptococcus iniae, Vibrio anguillarum, Vibrio ordalii* ve *Yersinia ruckeri* patojenlerine karşı oldukça yüksek bir koruma sağlandığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Çapkın ve Altınok (2009), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine 10^8 CFU/g oranında *Enterobacter cloacae* ve *Bacillus mojavensis* karışımı ilave ederek, balıkları 60 gün boyunca beslemişlerdir. 60. günün sonunda *Yersinia ruckeri* patojeni ile eprüvasyon uygulaması sonrasında hayatta kalma oranları kontrol grubunda % 35 iken, probiyotik ile beslenen grupta % 99 olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada, daha önceden tilapyaların bağırsak mukusundan izole ettiğimiz ve *in vitro* antagonism testleri sonucunda pozitif etkisini gördüğümüz iki *Bacillus* suşunun (*Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis*) tilapyalarda, *Streptococcus iniae*'ye karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek amacıyla besleme denemesinin ardından eprüvasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Eprüvasyon uygulaması sonrasında probiyotik ilave edilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre daha az ölüm oranları tespit edilmiş,

özellikle *B.subtilis'*in 10^8 CFU/g doz uygulamasının, tilapya bireyleri üzerinde *Streptococcus iniae* patojen bakterisine karşı diğer gruplara göre daha etkin bir koruma sağladığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmaya paralel olarak, Iwashita ve ark., (2015) tilapya yavrularının yemlerine iki farklı dozda (5g kg^{-1};10g kg^{-1} *B. subtilis* 1.5×10^9 CFU g^{-1}, *S. cerevisiae* 10^9 CFU g^{-1} ve *A. oryzae* 2×10^9 CFU g^{-1}) uygulanan probiyotik karışımı ile 4 haftalık besleme denemesi sonrasında gerçekleştirilen *Aeromonas hydrophilia* ve *Streptococcus iniae* ile eprüvasyon denemesi sonunda probiyotikle beslenen tilapyalarda mortalitenin azaldığını bildirmişlerdir. En düşük mortalite oranının (%65.33) ise 10g kg^{-1} dozda probiyotikle beslenen grupta *S. iniae'*ye karşı olduğu belirlenmiştir. Aly ve ark., (2008), yeme ilave edilen üç farklı probiyotik uygulamasının (D1: 0.5×10^7 *L. acidophilus* ve 0.5×10^7 *Bacillus subtilis*/g diyet; D2: 1×10^7 *L. acidophilus* /g diyet; D3: 1×10^7 *B. subtilis*/g diyet; D4: probiyotik ilave edilmeyen diyet) tilapyalarda farklı patojenlere karşı (*Aeromonas hydrophila, Pseudomonas fluorescens, Streptococcus iniae*) *in vivo* etkisini değerlendirmişlerdir. *B. subtilis* ve *Lactobacillus acidophilus* karışımı ile takviye edilen diyetle beslenen grupta *A. hydrophila, P. fluorescens* ve *S.iniae*'ye karşı nispi koruma değerinin (RLP), tek başına *B.subtilis* veya *L. acidophilus* verilen gruplara göre önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Han ve ark., (2015) juvenil tilapya yemlerine farklı oranlarda (C:%0, T1:%0.02, T2:%0.04, T3:%0.06, T4:%0.08 ve T5:%0.1 AlCare®, 2×10^{10} CFU/g) ilave edilen *Bacillus licheniformis'*in *Steptococcus iniae'*ye karşı direnci üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada 10 haftalık besleme denemesi sonrasında gerçekleştirilen *S. iniae* ile eprüvasyon testi sonucunda hayatta kalma oranının T2,T3,T4 ve T5 gruplarında önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tilapya'nın kendi doğal bağırsak florasından izole edilen *Bacillus subtilis* ve *Bacillus mojavensis* aday probiyotik bakterilerin spor formları ile farklı dozlarda beslenmesinin, büyüme parametreleri, yem değerlendirme oranları, somatik indeksler, bağırsak dokularında histomorfometrik değişimler, immün ilişkili bazı sitokin genler ile HSP70 geni ve *Streptococcus iniae* patojenine karşı etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada,

1. 60 günlük besleme denemesi sonunda canlı ağırlık değişimlerinin tüm gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ($p<0.05$), BS8 grubunun 140.83±2.90 g ile en yüksek final ağırlığına sahip grup olduğu, bu grubu sırasıyla BM6 (140.70±3.66 g), BS6 (140.35±2.76 g), BM8 (137.69±2.73 g) ve kontrol (132.80±1.85 g) gruplarının izlediği,
2. Kontrol grubunun diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha düşük bir SBO (1.54±0.02) ve OBO (%152.28) gösterdiği, en yüksek SBO (1.64±0.03) ve OBO (%166.89) değerlerinin BS8 grubunda olduğu,
3. YÇO değerinin 1.01±0.02 ile en iyi BS8 grubunda olduğu ve kontrol grubunun (1.11±0.03) diğer gruplara göre istatistiksel açıdan farklı ($p<0.05$) ve daha yüksek YÇO gösterdiği,
4. En yüksek kondüsyon faktörü değerinin 1.86±0.14 ile BM8 grubunda, en düşük KF değerinin ise 1.74±0.02 ile BS6 grubunda bulunduğu ve tüm gruplar arasındaki farklılığın istatiksel açıdan önemsiz olduğu,
5. En yüksek HSİ değerinin 3.55±0.46 ile BS8 grubunda, en düşük değerin ise 1.99±0.36 ile kontrol grubunda olduğu ve bununla birlikte tüm gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu,

6. Farklı oranlarda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen Tilapya bireylerinin anteriyor bağırsak dokusunun histomorfometrik ölçümleri sonucunda, villus boyu, goblet sayısı, perimetre oranı, mikrovilli uzunluğu ve mikrovilli yoğunluğu gibi parametrelerin probiyotik ile beslenen balıkların bağırsak dokularında kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttığı,
7. Probiyotik ile beslenen tüm grupların bağırsak dokularında immün ilişkili bazı sitokin genlerin (IL-1β ve TNF-α proinflamatuar sitokin gen ile TGF-β ve IL-10 antiinflamatuar sitokin gen) ekspresyonlarının kontrol grubuna göre önemli seviyede arttığı, BM6, BS6 ve BS8 gruplarında HSP70 mRNA seviyesinde önemli bir değişiklik bulunmadığı ancak BM8 grubunun bağırsak dokusunda kontrol grubuna oranla HSP70'in yaklaşık 2.8 kat arttığı,
8. *B.subtilis*'in 10^8 CFU/g doz uygulamasının tilapya bireyleri üzerinde *Streptococcus iniae* patojenine karşı diğer gruplara göre daha etkin bir koruma sağladığı belirlenmiştir.

Daha önce in vitro koşullar altında gerçekleştirdiğimiz antagonizm testleri kullandığımız her iki aday probiyotik bakteri türünün de *S.iniae* patojenine karşı inhibitör aktivite gösterdiğini, böylece patojenin gelişimini inhibe ederek, büyümesini baskıladığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte patojene karşı kolonizasyon bölgeri için rekabet etkisinin göstergesi olan adezyon kabiliyetinin, en yüksek *B. mojavensis* ve bunu takiben *B. subtilis* suşlarında olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da daha önce etkinliğini gördüğümüz iki aday probiyotik bakteri türünün in vivo koşullar altında probiyotik etkisi incelenmiştir.

Çalışmamız sonucunda deneme grupları arasında daha etkili olduğunu gördüğümüz aday probiyotik bakteri türünün *Bacillus subtilis*, doz uygulamasının ise bu tür için 10^8 CFU/g, *B. mojavensis* türü için ise 10^6 CFU/g olduğu görülmüştür. Daha sonra yapılacak çalışmalarda *B. mojavensis* için tilapyalar

üzerinde daha düşük doz uygulamalarının denenmesi önerilmektedir. Çalışmamızda kullanılan aday probiyotik bakterilerin gerek *S. iniae* patojenine karşı gerekse balığın gelişimi üzerinde etkili olduğu ancak probiyotiklerin, balık türlerine, büyüklüğüne, bakteri suşuna, dozuna, veriliş yöntemine göre de farklı sonuçlar verebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, probiyotiklerin balık sağlığını destekleyici, immün sistemi uyaracı etkilere sahip olması ve yemden yararlanmayı artırarak aynı zamanda büyümeyi teşvik edici nitelikte olması bu konuda yapılan birçok bilimsel çalışma ile ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra balık hastalıklarına karşı probiyotiklerin antibiyotik kullanımına alternatif olarak dünyada ve ülkemizde antibiyotik kullanımlarının sınırlandırılması açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe probiyotik kullanımı gelecek için umut vericidir.

Ancak yurt dışında konuyla ilgili yapılmış birçok araştırma olmasına karşın, ülkemizde bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu bağlamda, özellikle balığın kendi doğal florasından izole edilen bakterilerin yem katkı maddesi olarak belirlenmesi, bu bakterilerin çeşitli patojen bakterilere karşı koruma potansiyeli ile birlikte balıklarda bağışıklık sistemi ve büyüme parametreleri üzerine etkilerinin incelendiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abarike, E.D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., 2018. Effects of a Commercial Probiotic BS Containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on Growth, İmmune Response and Disease Resistance in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol., 82: 229-238

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., 2007. Cells and Tissues of the Adaptive Immune System. 6 th ed: Saunders.

Addo, S., Carrias, A. A., Williams, M. A., Liles, M. R., Terhune, J. S., Davis, D. A., 2017. Effects of *Bacillus subtilis* Strains on Growth, Immune Parameters, and *Streptococcus iniae* Susceptibility in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus.* The World Aquaculture Society, 48, 257–267.

Agnew, W., Barnes, A. C., 2007. *Streptococcus iniae*: An Aquatic Pathogen of Global Veterinary Significance and a Challenging Candidate for Reliable Vaccination. Veterinary Microbiology 122; 1–15.

AlGburi, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E., Chistyakov, V., Mazanko, M., Bren, A., Dicks, L., Chikindas, M., 2016. Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus myloliquefaciens* B-1895. Adv. Microbiol. 6;432–452.

Al-Harbı, A. H., Uddın, N., 2005. Bacterial Diversity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Brackish Water in Saudi Arabia. Aquaculture, 250, 566-572.

Al-Harbı, A. H., Uddın, N., 2003. Quantitative and Qualitative Studies on Bacterial Flora of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) Cultured in Earthen Ponds in Saudi Arabia. Aquaculture Research, 34, 43-48.

Al-Harbı, A. H., Uddın, N., 2004. Seasonal Variation in the Intestinal Bacterial Flora of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) Cultured in Earthen Ponds in Saudi Arabia. Aquaculture, 229, 37-44.

Al-Harbi, A. H., 2001. Molecular Characterization of *Streptococcus iniae* Isolated from Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) Aquaculture, 312, pp. 15-18

Aly, S. M., Abdel-Galıl Ahmed, Y., Abdel-Azız Ghareeb, A., Mohamed, M. F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as Potential Probiotics, on The Immune Response and Resistance of Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*) to Challenge Infections. Fish & Shellfish Immunology, 25, 128-136.

Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M., 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. Pertanika J. Trop. Agric. Sci, 34(2): 195 – 206.

Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H., Hirono, I., 2006. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress, 263–276.

Apún-Molına, J. P., Santamaría- Mıranda, A., Luna-González, A., Martínez-Díaz, S. F., Rojas-Contreras, M., 2009. Effect of Potential Probiotic Bacteria on Growth and Survival of Tilapia *Oreochromis niloticus* L., Cultured in The Laboratory Under High Density and Suboptimum Temperature. Aquaculture Research, 40, 887-894.

Arıg, N., Suzer, C., Gokvardar, A., Basaran, F., Coban, D., Yıldırım, S., 2013. Effects of Probiotic (*Bacillus Sp*.) Supplementation During Larval Development of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 13: 407–414.

Austin, B., 2006. The Bacterial Microflora of Fish, revised. Sci. World J., 6, 931–945.

Austin, B., Austin, D. A., 2012. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 5th edition. Springer Science and Business Media Dordrecht, London.

Austin, B., Austin, D. A., 1989. Microbiological Examination of Fish and Shellfish. Chichester: Ellis Horwood.

Balcazar, J. L., Blas, I., Zarzuela, I. R., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J. L., 2006. The Role of Probiotics in Aquaculture. Veterinary Mikrobiol., 114, 173-186.

Blottiere, H. M., Buecher, B., Galmiche, J. P., Cherbut C., 2007. Molecular Analysis of the Effect of Short-Chain Fatty Acids on Intestinal Cell Proliferation Proceedings of The Nutrition Society, 62:101-106.

Bromage, E. S., Owens, L., 2002. Infection of Barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: Effects of Different Routes of Exposure. Diseases Aquatic Organisms 52: 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. Volume 30, Issue10 573-579.

Brunvold, L., Sandaa, R., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H. .Bergh, Q., 2007. Characterisation of Bacterial Communities Associated with Early Stages of Intensively Reared cod (*Gadus morhua*) Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Aquaculture 272, 319–327.

Can, Y., 2011. Yavru Gökkuşağı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Görülen Soğuksu Hastalığının Kontrolü İçin Probiyotiklerin Kullanılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 75 sayfa, Isparta.

Candan, A., Karataş, S., 2010. "Balık Sağlığı", Kalmak Ofset , İstanbul.

Caspary, W. F., 1992. Physiology and Pathophysiology of Intestinal Absorption American Journal of Clinical Nutrition, 55 p. 299s

Casula, G., Cutting, S. M., 2002. Bacillus Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. Appl. Environ. Microb. 68 (5): 2344-2352.

Cengizler, İ., 2006. Balık Hastalıkları. Nobel Kitapevi. ISBN: 9944730105. 133 sayfa

Cheng, S., Y. H. Hu., X. D. JIao., L, Sun., 2010. Identification and Immunoprotective Analysis of a *Streptococcus iniae* Subunit Vaccine Candidate. Vaccine 28: 2636–2641.

Clements, K., Pasch, I. Y., Moran, D., Turner, S., 2007. Clostridia Dominate 16s Rrna Gene Libraries Prepared from the Hindgut of Temperate Marine Herbivorous Fishes. Marine Biology, 150, 1431-1440.

Company, R., Calduch-Gıner, J.A., Kaushık, S.J., Perezsanchez, J., 1999. Growth Performance and Adiposity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*): Risks and Benefits of High Energy Diets. Aquaculture, 171: 279-292.

Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K., Secombes, C. J., 2007. Cloning and Expression Analysis of Two Pro-inflammatory Cytokines, IL-1 beta and IL-8, in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Mol Immunol. 44(6):1361-73.

Çapkın, E., Altınok, İ., 2009. Effects of Dietary Probiotic Supplementations on Prevention/Treatment of Yersiniosis Disease. Journal of Applied Microbiology, 106(4), 1147-1153.

Dahiya, R. S., Speck, M. L., 1968. Hydrogen Peroxide Formulation by Lactobacilli and Its Effect on *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science, 51(10), 1068-1072.

Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R. Arnold, K. E. 2010. Effect of Dietary *Bacillus* spp. and Mannan Oligosaccharides (Mos) on European Lobster (*Homarus gammarus* L.) Larvae Growth Performance, Gut Morphology and Gut Microbiota. Aquaculture, 304, 49–57.

Daniels, G. D., Secombes, C. J., 1999. GenomicO of rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* TGF-beta. Dev. Comp. Immunol. 23: 139-47

Darwish, A., Rawles, S., Griffin, B., 2002. Laboratory Efficacy of Oxytetracycline for the Control of *Streptococcus iniae* Infection in Blue Tilapia. Journal of Aquatic Animal Health, 14, Pages 184–190.

Das, B. K., Nidhi, N., Roy, P., Muduli, A. K., Swain, P., Mishra, S. S., Jayasankar, P., 2014. Antagonistic Activity of Cellular Components of *Bacillus subtilis* AN11 Against Bacterial Pathogens Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 3, pp. 795-809

Dawood, M.A., Koshio, S., 2016. Recent Advances in the Role of Probiotics and Prebiotics in Carp Aquaculture: a Review, Aquaculture. 454;243-251.

De Schryver, P., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., Bossier, P., 2012. Managing the Microbiota in Aquaculture Systems for Disease Prevention and Control, in Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control (ed. B. Austin), Woodhead, pp.393–418.

De, D., Ghoshal, T.K., Ananda Raja, R., Kumar, S., 2015. Growth Performance, Nutrient Digestibility and Digestive Enzyme Activity in Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* Juveniles Feed Diets Supplemented With Cellulolytic and Amylolytic Gut Bacteria Isolated from Brackish Water Fish, Aquac. Res. 46 (7);1688-1698.

Del'duca, A., Cesar, D. E., Abreu, P. C., 2015. Bacterial Community of Pond's Water, Sediment And in the Guts of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Juveniles Characterized by Fluorescent in Situ Hybridization Technique. Aquaculture Research, 46, 707-715.

Del'duca, A., Evangelısta Cesar, D., Galuppo Dınız, C., Abreu, P. C., 2013. Evaluation of the Presence and Efficiency of Potential Probiotic Bacteria in the Gut of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using the Fluorescent in Situ Hybridization Technique. Aquaculture, 388–391, 115-121.

Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., Chadee, K., 2008. Role of Intestinal Mucins in Innate Host Defense Mechanisms Against Pathogens. Journal of Innate Immunity, 1: 123-135.

Dikel, 2009. Tilapia Yetiştirciliği. TC. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü ANKARA

Dixon, B., Stet, R.J., 2001. The Relationship Between Major Histocompatibility Receptors and Innate Immunity in Teleost Fish. Dev. Comp. Immunol.;25(8-9):683-99.

Dönmez, A. E., 2016. Balıklarda Melanomakrofaj Merkezleri. Su Ürünleri Dergisi 33(1) 81-87.

Eldar, A., Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* Infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Similar, But Different Diseases Dis. Aquat. Org., 36, pp. 227-231

Elsabagh, M., Mohamed, R., Moustafa, E., Hamza, A., Farrag, F., Decamp, O., Dawood, M. A. O., Eltholth, M., 2018. Assessing the Impact of Bacillus Strains Mixture Probiotic on Water Quality, Growth Performance, Blood Profile and Intestinal Morphology of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition. 24: 1613-1622.

El-Sayed, A. F. M., 2006. Tilapia Culture, Oxfordshire, UK, CABI Publishing.

Erdem B., 2013. Mikrobiyal Sideroforlar ve Biyoteknolojideki Uygulama Alanları. The Black Sea Journal of Sciences 3(8):77-88.

Etyemez, M., Balcázar, J. L., 2015. Bacterial Community Structure in The Intestinal Ecosystem of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA genes", Research in Veterinary Science, 100, 8-11.

Etyemez, M., Balcazar, J. L., 2016. Isolation and Characterization of Bacteria with Antibacterial Properties from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Res. Vet. Sci., 105: 62-64

Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., 2006. Identification and Epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in Tilapia, *Oreochromis* spp. International Symposium on Tilapia in Aquaculture 7. Charles Town, WV, USA, American Tilapia Association (pp. 25-42).

Facklam, R., Elliott, J., Shewmaker, L., Reingold, A., 2005. Identification and Characterization of Sporadic Isolates of *Streptococcus iniae* Isolated From Humans. J. Clin. Microbiol., 43, pp. 933-937

FAO, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT Statistics Database. Rome

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Rome: Food and Agriculture Organization.

Ferguson, R. M. W., Merrıfield, D. L., Harper, G. M., Rawlıng, M. D., Mustafa, S., Pıcchıettı, S., Balcázar, J. L. & Davıes, S. J., 2010. The Effect of *Pediococcus acidilactici* on the Gut Microbiota and Immune Status of Ongrowing Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Microbiology, 109, 851-862.

Finegold, S. M., Vaisanen, M. L., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Song, Y., Liu, C., Collins, M. D., Lawson, P. A., 2003. *Cetobacterium somerae sp*. nov. from Human Feces and Emended Description of the Genus Cetobacterium. Syst. Appl. Microbiol 26, 177–181.

Fitzsimmons, K., 2000. Future Trends of Tilapia Aquaculture in the Americas. In: Tilapia Aquaculturein the Americas, Vol. 2. pp. 252–264 (Costa-Pierce, B.A. and J.E. Rakocy, Eds.). BatonRouge, Louisiana: World Aquaculture Society

Foey, A., Picchietti, S., 2014. Immune Defences of Teleost Fish John Wiley & Sons Ltd, Chichester

Fujiki, K., Shin, D. H., Nakao, M., Yano, T., 2002. Molecular Cloning and Expression Analysis of Carp (*Cyprinus carpio*) Interleukin-1 Beta, High Affinity Immunoglobulin E Fc receptor Gamma Subunit and Serum Amyloid A. Fish Shellfish Immunol. 10(3): 229-42.

Fuller, R., 1989. Probiotics in Man and Animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.

Fulton, T., 1902. Rate of Growth of Sea Fish. Scotland Scientific Investigation Rep. Scotland. 20 p

Galagarzaa, O. A., Smith, S. A., Drahoscjoseph, D. J., Eifertarobert, D., Williams,C., Kuhn, D. D., 2018. Modulation of Innate Immunity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Dietary Supplementation of *Bacillus subtilis* Endospores. Fish & Shellfish Immunology 83, 171-179.

Garcia-Castillo, J., Pelegrin, P., Mulero, V., Meseguer, J., 2002. Molecular Cloning and Expression Analysis of Tumor Necrosis Factor Alpha From a Marine Fish Reveal its Expression and Ubiquitous Nature. Immunogenetics. 54(3):200-7.

Gatesoupe, F.J., 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T. F., 1999. Inhibition of Vibrio Anguillarum by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. Appl. Environ. Microbiol., 65, pp. 969-973

Grayfer, L., Walsh, J. G., Belosevic, M., 2008. Characterization and Functional Analysis of Goldfish (*Carassius auratus L*.) Tumor Necrosis Factor-alpha. Dev. Comp. Immunol. 32(5):532-43.

Grisdale-Helland, B., Hatlen, B., Mundheim, H., Helland, S. J., 2011. Dietary Lysine Requirement and Efficiency of Lysine Utilization for Growth of Atlantic Cod. Aquaculture 315, 260–268.

Gupta, M., Acosta, B., 2004, A Review of Global Tilapia Farming Practices. Aquacult Asia IX: 7–16.

Gültepe, N., Bilen, S., Yılmaz, S., Güroy, D., Aydın, S., 2014. Effects of Herbs and spice on Health Status of Tilapia Challenged with *Streptococcus iniae.* Acta. Vet. Brno. 83: 125-131.

Haddad, G., Hanington, P.C., Wilson, E.C., Grayfer, L., Belosevic., 2008. M. Molecular and Functional Characterization of Goldfish (*Carassius auratus*

L.) Transforming Growth Factor Beta. Dev. Comp. Immunol. 32(6):654-63.

Hai, N. V., 2015. Research Findings From the Use of Probiotics in Tilapia Aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology. 45(2); 592-597.

Han, B., Long, W. Q., He, J. Y., Liu, Y. J., Si, Y. Q., 2015. Tian Effects of Dietary *Bacillus licheniformis* on Growth Performance, Immunological Parameters, Intestinal Morphology and Resistance of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) to Challenge Infections. Fish Shellfish Immunol., 46 (2): 225-231

He, S., Liu, W., Zhou, Z., Mao, W., Ren, P., 2011. Evaluation of Probiotic Strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a Feed Supplement for Koi Carp (*Cyprinus carpio*). J. Aquac. Res. Dev. 3(S):S1–S005

He, S., Zhang, Y., Xu, L., Yang, Y., Marubashı, T., Zhou, Z., Yao, B., 2013. Effects of Dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the Production, Intestinal Cytokine Expression and Autochthonous Bacteria of Hybrid Tilapia *Oreochromis niloticus* ♀; *Oreochromis aureus* ♂. Aquaculture, 412–413, 125-130.

Hirono, I., Nam, B.H., Kurobe, T., Aoki, T., 2000. Molecular Cloning, Characterization, and Expression of TNF cDNA and Gene from Japanese flounder *Paralychthys olivaceus*. J. Immunol. 15;165(8):4423-7.

Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The Use of Bacterial Spore Formers as Probiotics. FEMS Microbiol. Rev. 29: 813–835.

Honsheng, M., 2010. Effects of Probiotics on Activities of Digestive Enzyme for Tilapia. Journal of South China Normal University 2: 10–15.

Hu, C. H., Xu, Y., Xia, M. S., Xiong, L., Xu, Z. R. 2007. Effects Of Cu2+–Exchanged Montmorillonite on Growth Performance, Microbial Ecology and Intestinal Morphology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 270: 200–206.

Ireguı, C. A., Hernández, E., Jıménez, A. P., Pulıdo, E. A., Rey, A. L., Comas, J., Peña, L. C., Rodríguez, M., 2004. First epidemiological map of lesions and diseases of fish in Colombia. Universidad Nacional de Colombia, MADR, Bogotá DC, Colombia.

Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotic in Aquaculture. Journal of Fish Diseases 25: 633–642.

Iwashıta, M. K. P., Nakandakare, I. B., Terhune, J. S., Wood, T., Ranzanı-Paıva, M. J. T., 2015. Dietary Supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces serevisiae* and *Aspergillus oryzae* Enhance Immunity and Disease Resistance Against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* Infection in Juvenile Tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, 43: 60-66.

Kadowaki, T., Yasui, Y., Takahashi, Y., Kohchi, C., Soma, G., Inagawa, H., 2009. Comparative Immunological Analysis of Innate Immunity Activation After Oral Administration ofW Fermented Extract to Teleost Fish. Anticancer. Res. 29(11): 4871-7.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virlanen, E., Laine, S., Arvilommi, H., 1992. Enhancement of the Circulating Antibody Secreting Cell Response in Human Diarrhoea by a Human *Lactobacillus strain*. Pediatric Research, 32: 141-144.

Kaya, M., 2009. Probiyotik Bakteri İzolasyonu ve Kültürü Yapılan Balık Türlerinin Bağışıklık Sistemleri Üzerindeki Etkisinin Tespiti Üzerine Bir Çalışma. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 70 sayfa, Isparta.

Kayhan, F. E., Atasayar, Z., 2010. Sucul Organizmalarda Isı Şoku Proteinlerinin (Hsp) Biyolojik Önemi ve Termotolerans. Journal of Fisheries Sciences. 4(3): 246-253.

Kiristioglu, I., Antony, P., Fan, Y., Forbush, B., Mosley, R. L., Yang, H., Teitelbaum, D. H., 2002. Total Parenteral Nutrition-Associated Changes in Mouse Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Digestive Diseases and Sciences, 47: 1147-1157.

Kitao, T., Aoki, T. R., 1981. Sakoh Epizootic Caused by Beta-haemolytic *Streptococcus* Species in Cultured Freshwater Fish. Fish Pathol., 15: 301-307

Klesius, P., Evans, J., Shoemaker, C., Yeh, H., Goodwin, A.E., Adams, A., Thompson, K., 2006. Rapid Detection and Identification of *Streptococcus iniae* Using a Monoclonal Antibody-based Indirect Fluorescent Antibody Technique Aquaculture, 258: 180-186

Klesius, P. H., Shoemaker, C. A., Evans, J. J., 2008. *Streptococcus*: A Worldwide Fish Health Problem. 8*th* International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, 83-107.

Koca, S. B., Didinen, B. I., Ekici, S., Dulluç, A., 2011. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Uygulamaları. Journal of Fisheries Science. 5(4): 326-335.

Kusuda, R., Kawai, K., Toyoshima, T. Komatsu, I., 1979. A New Pathogenic Bacterium Belonging to The Genus *Streptococcus,* Isolated from a Epizootic of Cultured Yellowtail Nihon Suisan Gakkai Shi, 42: 1345-1352

Laing, K. J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., 2001. Cloning and Expression Analysis of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Tumour Necrosis Factor-alpha. Eur. J. Biochem. 268(5):1315-22.

Larsen, A. M., Mohammed, H. H., Arıas, C. R., 2014. Characterization of the Gut Microbiota of Three Commercially Valuable Warmwater Fish Species. Journal of Applied Microbiology, 116: 1396-1404.

Lawrence, D. A., 1996. Transforming Growth Factor-beta: a General Review. European Cytokine Network. 7: 363–374.

Lee, D. S., Hong, S. H., Lee, H. J., Jun, L. J., Chung, J. K., Kim, K. H., 2006. Molecular cDNA Cloning and Analysis of the Organization and Expression of the IL-1beta Gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 143(3):307-14.

Lesel, R., Peringer, P., 1981. Influence of Temperature on the Bacterial Microflora in *Salmo gairdneri* Richardson. Archives in Hydrobiology 93, 109–120.

Letterio, J. J., Roberts, A. B., 1998. Regulation of Immune Responses by TGF-β. Annual Reviews of Immunology 16: 137–161.

Lıu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z., Zhou, Z., 2013. Comparison of Adhesive Gut Bacteria Composition, Immunity, and Disease Resistance in Juvenile Hybrid Tilapia Fed Two Different Lactobacillus Strains. Fish & Shellfish Immunology, 35: 54-62.

Li, B., Samanta, A., Song, X., Furuuchi, K., Iacono, K.T., Kennedy, S., 2006. FOXP3 Ensembles in T-cell Regulation. Immunol Rev. 212: 99-113.

Li, M. O., Flavell, R.A., 2008. TGF-beta: a Master of All T cell Trades. Cell. 8;134(3): 392-404.

Li, M. O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., Flavell, R. A., 2006. Transforming Growth Factorbeta Regulation of Immune Responses. Annu. Rev. Immunol. 24: 99-146.

Lilly, D. M., Stillwell, R. H., 1965. Probiotics. Growth Promoting Factors Produced By Micro-organisms. Science 147, 747-748.

Lim, C., Webster, C. D., 2008. Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. African Journal of Aquatic Science 33(1): 103-103

Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L., Wang, S. W., 2009. Improvement in the Growth Performance of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, By a Protease-producing Probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from Natto. J. Appl. Microbiol. 107 (3): 1031-1041.

Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W., Zhou Y. 2017. Dietary Administration of

Bacillus subtilis HAINUP40 Enhances Growth, Digestive Enzyme Activities, Innate Immune Responses and Disease Resistance of Tilapia, *Oreochromis niloticus* Fish Shellfish Immunol., 60: 326-333.

Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z., Zhou, Z. 2013. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different Lactobacillus strains. Fish & Shellfish Immunology 35: 54–62.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402–408.

Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., Derome, N., 2014. Teleost Microbiomes: The State of the Art in Their Characterization, Manipulation and Importance in Aquaculture and Fisheries. Front. Microbiol., 5, p. 207

Lu, D. Q., Bei, J. X., Feng, L. N., Zhang, Y., Liu, X. C., Wang, L., 2008. Interleukin-1beta Gene in Orange-spotted Grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular Cloning, Expression, Biological Activities and Signal Transduction. Mol. Immunol. 45(4):857-67.

Makled, S. O., Hamdan, A. M., El-Sayed, A.F. M., Hafez, E. E., 2017. Evaluation of Marine Psychrophile, *Psychrobacter namhaensis* So89, as a Probiotic In Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diets. Fish Shellfish Immunol. 61: 194–200.

Martin-Antonio, B., Manchado, M., Infante, C., Zerolo, R., Labella, A., Alonso, C., Borrego J. J., 2007. Intestinal Microbiota Variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) Under Different Feeding Regimes. Aquaculture Research 38: 1213–1222.

McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G., 2005. Antigen-Specific Memory B cell Development. Annu. Rev. Immunol. 23: 487-513.

Molinari, L. M., Scoaris, D. O., Pedroso, R. B., Bittencourt, N.L.R., Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Abreu, Filho B.A. Dias Filho, B. P., 2003.

Bacterial Microflora in the Gastrointestinal Tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Cultured in a Semi-intensive System. Acta. Scientiarum Biological Sciences Maringa 25: 267–271.

Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C., Massie, B., 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. Mol. Cell Biol. 20: 7146–7159.

Mukherjee, A., Ghosh, K., 2014. Antagonism Against Fish Pathogens by Cellular Components and Verification of Probiotic Properties in Autochthonous Bacteria Isolated from the Gut of an Indian Major Carp, *Catla catla* (Hamilton). Aquaculture Research, doi: 10.1111/are.12676.

Mulero, V., Meseguer, J., 1998. Functional Characterisation of a Macrophage-activating Factor Produced by Leucocytes of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology 8: 143–156.

Nayak, S. K., 2010. Probiotics and Immunity: a Fish Perspective, Fish shellfish Immunol. 29 (1): 2-14.

Nguyen, H. T., Kanai, K., 1999. Selective Agars for the Isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese Flounder, Paralichthys Olivaceus, and Its Cultural Environment. J. Appl. Microbiol., 86: 769-776

Nguyen, H. T., Kanai, K., Yoshikoshi, K., 2002. Ecological Investigation of *Streptococcus iniae* in Cultured Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Using Selective Isolation Procedures Aquaculture, 205: 7-17

Ni, J., Yan, Q., Yu, Y., Zhang, T., 2014. Factors Influencing the Grass Carp Gut Microbiome and Its Effect on Metabolism. FEMS Microbiol. Ecol. 87: 704–714.

Ocak, F., 2006. Balıklarda Lenfoid Organlar ve Immun Sistemin Özellikleri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 3(1): 61-66.

Oduleye, S.O., 1982. Growth and growth regulation in the cichlids. Aquaculture 27, 301–306.

Oggioni, M. R., Ciabattini, A., Cuppone, A. M., Pozzi, G., 2003. Bacillus Spores for Vaccine Delivery Vaccine, 21; S2/96-S2/101.

Olivares, M., Ropero, M. P. D., Gomez, N., Villoslada, F. L., Sierra, S., Maldonado, J. A., Martin, R., Rodriguez, J. M., Xaus, J., 2006. International Microbiology, 9(1): 47-52.

Ordas, M. C., Costa, M. M., Roca, F. J., Lopez-Castejon, G., Mulero, V., Meseguer, J., 2007. Turbot TNF alpha Gene: Molecular Characterization and Biological Activity of the Recombinant Protein. Mol. Immunol. 44(4):389-400.

Özturk, R. C., Altinok I., 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. Turk. J. Fish Aquat. Sci. 14: 275-297.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., 2007. Immune Modulation and Expression of Cytokine Genes in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Upon Probiotic Feeding. Dev. Comp. Immunol. 31: 372-382.

Parker, R. B., 1974. Probiotics, the Other Half of the Antibiotic Story. Animal Nutrion Health 29: 4-8.

Pérez, T., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Múzquiz, J. L., 2010. Host–microbiota Interactions Within the Fish Intestinal Ecosystem. Mucosal immunology, 3(4): 355.

Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini G., de Blas, I., Ruiz-Zarzuelaa, I., 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection Fish Shellfish Immunol, 31: 196-201.

Pirarat, N., Pınpımaı, K., Endo, M., Katagırı, T., Ponpornpısıt, A., Chansue, Maıta, M., 2011. Modulation of Intestinal Morphology and Immunity in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Research in Veterinary Science, 91, E92-E97.

Pier, G. B., Madin, S. H., 1976. *Streptococcus iniae sp*. nov., a Beta-hemolytic *Streptococcus* Isolated from an Amazon Freshwater Dolphin, Inia Geoffrensis Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 545-553

Plumb, J. A., Hanson, L. A., 2011. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fish Wiley- Blackwell. 400 p. ISBN: 978-0-813-81693-7.

Popma, T., Masser, M., 1999. Tilapia Life Story and Biology. Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 283.

Praveen, K., Evans, D. L., Jaso-Friedmann, L., 2006. Constitutive Expression of Tumor Necrosis Factor-alpha in Cytotoxic Cells of Teleosts and its Role in Regulation of Cell-mediated Cytotoxicity. Mol. Immunol. 43(3):279-91.

Purwandari, A. R., Chen, H. Y., 2013. Effects of Probiotic *Bacillus subtilis* on Intestinal Microbial Diversity and Immunity of Orange Spotted Grouper *Epinephelus coioides*. Journal of Applied Biotechnology 1(1): 25–36.

Qin, Q. W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G. I., Yokomizo, Y., Nakanishi, T., 2001. Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF alpha)-like Factor Produced by Macrophages in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Shellfish Immunol. 11: 245-256.

Rahman, M. M., McFadden, G., 2006. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. PLoS Pathog. 2(2):e4.

Ran, C., Carrias, A., Williams, M. A., Capps, N., Dan, B. C. T., Newton, J. C., Kloepper, J. W., Ooi, E. L., Browdy, C. L., Terhune, J. S., Liles M. R., 2012. Identification of Bacillus Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. Plos One, 7(9): E45793.

Rasheed, V., Plumb, J., 1984. Pathogenicity of a Non-hemolytic Group B *Streptococcus* sp. in Gulf Killifish, *Fundulus grandis* Baird and Girard. Aquaculture 37: 97–105.

Ray, A.K., Ghosh, K., Ringo, E., 2012. Enzyme-producing Bacteria Isolated from Fish Gut: a Review. Aquaculture Nutrition 18: 465–492.

Reid, H. I., Treasurer, J. W., Adam, B., Birkbeck, T. H., 2009. Analysis of Bacterial Populations in the Gut of Developing Cod Larvae and Identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as Pathogens of Cod Larvae. Aquaculture 288: 36–43.

Ridha, M. T., Azad, I. S., 2016. Effect of Autochthonous and Commercial Probiotic Bacteria on Growth, Persistence, Immunity and Disease Resistance in Juvenile and Adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquac Res 47: 2757–2767

Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., Krogdahl, A., 2006. Characterisation of the Microbiota Associated with Intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): the Effect of Fishmeal, Standard Soybean Meal and a Bioprocessed Soybean Meal. Aquaculture 261: 829–841.

Robertson, P., ÓDowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium sp*. as a Probiotic for Atlantic Salmon (*Salmo salar L*.) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum) Aquaculture, 185: 235-243

Rombout, J. H., Huttenhuis, H. B. T., Picchietti, S., Scapigliati, S., 2005. Phylogeny and Ontogeny of Fish Leucocites. Fish and Shellfish Immunology 19: 441–455.

Ruyet, J. P. L., Mahe, K., Bayon, N. L., And D. H. L., 2004. Effects of Temperature on Growth and Metabolism in a Mediterranean Population of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 237 (1-4): 269-280.

Saeij, J. P., Stet, R. J., De Vries, B. J., Van Muiswinkel, W. B., Wiegertjes, G. F., 2003. Molecular and Functional Characterization ofC TNF: a Link Between TNF Polymorphism and Trypanotolerance. Dev. Comp. Immunol. 27(1):29-41.

Saether, B. S., Joblıng, M., 1999. The Effects of Ration Level on Feed Intake and Growth, and Compensatory Growth After Restricted Feeding, in Turbot *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture Research, 30: 647-653.

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., Bestervelt, L. L., 2013. Microbial Siderophores: a Mini Review. J. Basic Microbiol.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 2009. Heterogeneity of CD4+ Memory T Cells: Functional Modules for Tailored Immunity. Eur. J. Immunol. 39(8):2076-82.

Salminen, S., Deighton, S., Gorbach, S., 1998. Lactic Acid Bacteria in health and Disease. Pages 1-72, ın "Lactic Acid Bacteria", Second Edition, Ed. S. Salminen and A. von Wright, Marcel Dekker Inc. 270 Madison Avenue, New York, 10016, USA, 442s.

Santınha, P. J. M., Medale, F., Corazze, G., And Gomes, E. F. S., 1999. Effects of the Dietary Protein: Lipid Ratio on Growth and Nutrient Utilization in Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Aquac. Nutr., 5:147-156

Sarihan, F., 2005. Tilapia (*Oreochromis niloticus*)'larda Levamisol ve *Streptococcus iniae* Uygulamasından Sonra Oluşan İmmün Yanıtın İzlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 88syf.

Savan, R., Sakai, M., 2006. Genomics of Fish Cytokines. Comp Biochem Physiol Part D Ge- nomics Proteomics. 1(1):89-101.

Saxena, V., Lienesch, D.W., Zhou, M., Bommireddy, R., Azhar, M., Doetschman, T., 2008. Dual Roles of Immunoregulatory Cytokine TGF-beta in the Pathogenesis of Autoimmunity- mediated Organ Damage. J. Immunol. 1;180(3):1903-12.

Scapigliati, G., Buonocore, F., Bird, S., Zou, J., Pelegrin, P., Falasca, C., 2001. Phylogeny of Cytokines: Molecular Cloning and Expression Analysis of Sea Bass *Dicentrarchus labrax* İnterleukin-1beta. Fish Shellfish Immunol. 11(8):711-26.

Secombes, C. J., Ellis, A. E., 2012. The Immunology of Teleosts. In: Fish Pathology (Ed. Roberts R.J.). Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Secombes, C. J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., 2001. Cytokines and Innate Immunity of Fish. Dev. Comp. Immunol. 25: 713–723.

Selim, K. M., Reda, R. M., 2015. Improvement of İmmunity and Disease Resistance in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by Dietary Supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens* Fish. Shellfish Immunol., 44: 496-503.

Sera, H., Ishida, Y., Kadota, H., 1974. Bacterial Flora in the Digestive Tracts of Marine fish. In: Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities (ed. by R.R.Colwell & R.Y.Morita), pp. 467–490. University Park Press, Baltimore, MD, USA.

Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2017. Probiotics for Disease Control in Aquaculture. In: Austin B, Newaj-Fyzul A (eds) Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish. John Wiley & Sons, Chichester, pp 189–222

Shelby, R. A., Lım, C., Yıldırım-Aksoy, M., Delaney, M. A., 2006. Effects of Probiotic Diet Supplements on Disease Resistance and Immune Response of Young Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Aquaculture, 18: 23-34.

Shoemaker, C. A., Evans, J. J., Klesıus, P. H., 2000. Density and Dose: Factors Affecting Mortality of *Streptococcus iniae* Infected Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 188: 229–235.

Shoemaker, C. A., Klesıus, P. H. , Evans, J.J., 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in Tilapia, Hybrid Striped Bass, and Channel Catfish on Commercial Fish Farms in the United States. American Journal of Veterinary Research 62: 174–177.

Standen, B. T., Rawlıng, M. D., Davıes, S. J., Castex, M., Foey, A., Gıoacchını, G., Carnevalı, O., Merrıfield, D. L., 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici*

Modulates Both Localised Intestinal- and Peripheral-Immunity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology, 35: 1097-1104.

Standen, B., Rodiles, A., Peggs, D., Davies, S., Santos, G., Merrifield, D. 2015. Modulation of the Intestinal Microbiota and Morphology of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Following the Application of a Multi-Species Probiotic. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99: 8403-8417.

Standen, B. T., Peggs, D. L., Rawling, M. D., Foey, A. Davies, S. J., Santos, G. A., Merrifield, D. L., 2016. Dietary Administration of a Commercial Mixed-Species Probiotic Improves Growth Performance and Modulates the Intestinal Immunity of Tilapia, *Oreochromis niloticus* Fish Shellfish Immunol., 49: 427-435.

Sugita, H., Tokuyama, K., Deguchi, Y., 1985. The Intestinal Microflora of Carp *Cyprinus carpio*, Grass Carp *Ctenopharyngodon idella* and Tilapia *Sarotherodon niloticus*. Bulletin of Japanese Society Sciences of Fisheries 50: 1325–1329.

Sun, J. R., Yan, J. C., Yeh, C. Y., Lee, S. Y., Lu, J. J., 2007. Invasive Infection with *Streptococcus iniae* in Taiwan. J Med Microbiol 56: 1246–1249.

Sutthi, N., Thaimuangphol, W., Rodmongkoldee M., Leelapatra W., Panase, P., 2018. Growth Performances, Survival Rate, and Biochemical Parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Reared in Water Treated With Probiotic. Comparative Clinical Pathology 27: 597–603

Svanborg, C., Godaly, G., Hedlund, M., 1999. Cytokine Responses During Mucosal Infections: Role in Disease Pathogenesis and Host Defence. Curr Opin Microbiol. 2(1): 99-105.

Tafalla, C., Figueras, A., Novoa, B., 2001. Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Alters Turbot *Scophthalmus maximus* Macrophage Nitric Oxide Production. Disease of Aquatic Organism. 47: 101–107.

Telli, G. S., Ranzanı-Paıva, M. J. T., Dıas, D. D. C., Sussel, F. R., Ishıkawa, C. M. & Tachıbana, L., 2014. Dietary Administration of *Bacillus subtilis* on Hematology and Non-Specific Immunity of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Raised at Different Stocking Densities. Fish & Shellfish Immunology, 39: 305-311.

Thy, H. T. T., Tri, N. N., Quy, O. M., Fotedar, R., Kannika, K., Unajak, S., 2017. Effects of the Dietary Supplementation of Mixed Probiotic Spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54a, and *Bacillus pumilus* 47b on Growth, Innate Immunity and Stress Responses of Striped Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Fish Shellfish Immunol. 60: 391–399.

Tinh, N. T. N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2007. A Review of The Functionality of Probiotics in the Larviculture Food Chain. Mar. Biotechnol. 10: 1-12.

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugıta, H., 2008. Novel Ecological Niche of *Cetobacterium somerae*, an Anaerobic Bacterium in The Intestinal Tracts of Freshwater Fish. Letters in Applied Microbiology, 46: 43-48.

Twibell, R. G., Brown, P. B., 1998. Optimal Dietary Protein Concentration for Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) Fed All-plant Diets. J. World Aquacult. Soc. 29(1): 9-16.

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., 2000. Verstraete W. Probiotics Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rew., 64: 655-671

Villamil, L., Reyes, C., Martínez-Sılva, M. A., 2014. In Vivo and in Vitro Assessment of *Lactobacillus acidophilus* as Probiotic for Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Perciformes:Cichlidae) Culture Improvement. Aquaculture Research, 45: 1116-1125.

Wan, Y. Y., Flavell, R. A., 2007. 'Yin-Yang' Functions of Transforming Growth Factor-beta and T Regulatory Cells in Immune Regulation. Immunol Rev. 220:199-213.

Wang, T., Huang, W., Costa, M. M., 2011. Secombes CJ. The Gamma-chain Cytokine/receptor System in Fish: More Ligands and Receptors. Fish Shellfish Immunol. 31(5): 673-87.

Wang, Y, B, Jian-Rong, L., Junda, L., 2008. Probiotics in Aquaculture: Challenges and Outlook Aquaculture 281 : 1–4

Welker, T. L., Lim, C., 2011. Use of Probiotics in Diets of Tilapia. Aquaculture Research and development S1:014. doi:10.4172/2165-9546

Winfree, R. A., Stickney, R. R., 1981. Effects of Dietary Protein and Energy on Growth, Feed Conversion Efficiency and Body Composition of Tilapia Aurea. J. Nutr. 111(6): 1001-1012.

Xia, D. Q., 2000. The Current Status of Tilapia Culture and Prospects in China. Scientific Fish Farming, (5):1-2.

Yamashita, M., Yabu, T., Ojima, N.. 2010. Stress Protein HSP70 in Fish. Aqua-BioScience Monographs 3: 111–141.

Yan, F., Polk, D. B., 2002. Probiotic Bacterium Prevents Cyctokine Induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells, The Journal of Biological Chemistry, 277(52): 50959-65.

Yan-Bo, W., Jian-Rong, L., Junda, Lin., 2008. Probiotics in Aquaculture: Challenges and Outlook. Aquaculture. 281: 1–4.

Yano, T., 1996. The Non Spesific Immune System: Humoral Defense. The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Pres, Inc (Google Books), 105-109.

Yin, Z., Lam, T. L., Sin, Y. M., 1997. Cytokine-mediated Antimicrobial Immune Response of Catfish, *Clarias gariepinus*, as a Defence Against *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. 7: 93–104.

Zhang, L., Yi, H., Xia, X. P., Zhao, Y., 2006. Transforming Growth Factor-beta: an Important Role in CD4+CD25+ Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Autoimmunity. 39(4): 269-76.

Zheng, Y., Zhao, Z., Wu, W., Song, C., Meng, S., Fan, L., 2017. Effects of Dietary Resveratrol Supplementation on Hepatic and Serum Pro-/Anti-İnflammatory Activity in Juvenile Gıft Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Dev Comp Immunol. 73: 220- 228.

Zhou, X., Tıan, Z., Wang, Y. & Lı, 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.

Zou, J., Grabowski, P. S., Cunningham, C., Secombes, C. J., 1999. Molecular Cloning of Interleukin 1beta from Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Reveals no Evidence of an Ice Cut Site. Cytokine. 11(8):552-60.

Zou, J., Secombes, C. J., Long, S., Miller, N., Clem, L. W., Chinchar, V. G., 2003. Molecular Identification and Expression Analysis of Tumor Necrosis Factor in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). Dev. Comp. Immunol. 27(10): 845-58.

Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., 2002. Differential Expression of two Tumor Necrosis Factor Genes in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Dev. Comp. Immunol. 26(2):161-72.

ÖZGEÇMİŞ

06/09/1986 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlayarak, 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılında aynı fakültede Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Şu an Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
3	25.03.2015	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 5– Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı'nda Öğretim görevlisi Prof.Dr.İbrahim CENGİZLER'in sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, **"TİLAPİA (OREOCHROMİS NİLOTİCUS, LİNNEUS 1757) İÇİN KORUYUCU PROBİYOTİKLERİN ELDESİ: BÜYÜME PERFORMANSI VE STREPTOCOCCUS İNİAE'YE KARŞI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI"** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN — Prof. Dr . Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER — Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof .Dr.Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyoistatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Mehmet Ali AKGÜL
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Scanned by CamScanner