



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ  
KURT ZOLSEVİYELER ÜZERİNDE TERCİH BESLEME  
PROSEDÜRÜNÜN ETKİLERİ**

Gökten HAKÖZÜ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
ARALIK-2014



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ  
KORT ZOL SEVİYELER ÜZERİNDE TERCİH BESLEME  
PROSEDÜRÜNÜN ETKİLERİ

Gökten HAKÖZÜ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
ARALIK-2014

## ÖZET

### ÇİPURA (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVALARININ KORTİZOL SEVİYELERİ ÜZERİNE TİCARİ YEMLERİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmanın amacı çipura larvalarının (*Sparus aurata*) kortizol seviyeleri üzerine ticari yemler Gemma Micro (50-100 µ) ve Caviar (100-200µ) ve canlı yemlerin Zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli etkilerini belirlemektir. Aynı zamanda, larvaların proteaz aktiviteleri üzerine kullanılan ticari ve canlı yemlerin inhibisyon etkileri de belirlendi.

Çipura larvalarının prelarval a amasında gözlenen en düşük ve en yüksek proteaz aktiviteleri sırasıyla  $0,77 \pm 0,36$  U/mg protein (0. gün) ve  $4,77 \pm 0,7$  U/mg protein (4. gün) oldu. Larvaların postlarval a amasında gözlenen en düşük ve en yüksek proteaz aktiviteleri sırasıyla  $5,75 \pm 0,51$  U/mg protein (25. gün) ve  $111,57 \pm 0,74$  U/mg protein (15. gün) oldu. Zenginle tirilmi rotiferler en düşük proteaz aktivitesine ( $17,98 \pm 2,82$  U/mg protein) sahipti. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin proteaz aktiviteleri sırasıyla  $34,67 \pm 0,88$  U/mg protein ve  $317,16 \pm 2,67$  U/mg protein olarak bulundu. Canlı yemler, zenginle tirilmi rotiferlerle beslemenin 10. günü dışında larvaların proteaz aktiviteleri üzerine pozitif katkılara sahipti.

Gemma Micro (50-100 µ)'nun en düşük inhibisyon yüzdesi %13,17 (5. gün) olarak belirlendi.. Gemma Micro (50-100 µ) 20. ve 25. günlerde çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde Caviar (100-200 µ)'dan daha düşük inhibisyonlara sahipti.

Çipura larvalarının kortizol de erleri arasında önemli farklılıklar gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Çipura larvalarının en düşük ve en yüksek kortizol de erleri sırasıyla  $0,099 \pm 0,009$  ng/g (35. gün) ve  $4,033 \pm 0,38$  ng/g (10. gün) olarak bulundu. Çipura larvaları, anaçlardan gelen kortizol çıkıktan sonra prelarval dönemde düşük ürülememesinden dolayı ilk beslemenin başlangıcında yüksek kortizol de erlerine sahipti ( $1,199 \pm 0,15$  ng/g).

Sonuç olarak; 1) İlk beslemenin başlangıcında yüksek kortizol de erlerinin sebepleri gelecekte araştırılması gerekir 2) Çipura larvalarının ilk 10 günlük besleme periyodu, bu amaçla kullanılan rotiferlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki negatif etkileri ve besinsel yetersizliklerinden dolayı kritik bir öneme sahiptir 3) Kuru yemlere geçiş a amasında *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ticari yemlerle başlı bir şekilde kullanılabilirken, zenginle tirilmi rotiferlerin ticari yemlerle kullanımı önerilmez 4) Gemma Micro (50-100 µ), *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde kullanılabilir.

2014, 69 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Çipura, proteaz aktivite, kortizol, stres

## ABSTRACT

### THE EFFECTS of COMMERCIAL FEEDING PROCEDURES on CORTISOL LEVELS of GILTHEAD SEABREAM (*SPARUS AURATA*, LINNEAUS 1758) LARVAE

The aims of this study were to determine the effects of commercial diets (Gemma Micro (50-100  $\mu$ ) and Caviar (100-200 $\mu$ )) and live foods (Enriched Rotifer, *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii) on the cortisol levels of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae and also, the inhibition effects of commercial diets and live foods used on protease activities of larvae.

The lowest and highest protease activities observed in the prelarval stage of gilthead seabream larvae were  $0.77\pm 0.36$  U/mg protein (day 0) and  $4.77\pm 0.7$  U/mg protein (day 4), respectively. The lowest and highest protease activities observed in the postlarval stage of larvae were  $5.75\pm 0.51$  U/mg protein (day 25) and  $111.57\pm 0.74$  U/mg protein (day 15), respectively. Enriched rotifer had the lowest protease activity ( $17.98\pm 2.82$  U/mg protein). The protease activities of *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii were found as  $34.67\pm 0.88$  U/mg protein and  $317.16\pm 2.67$  U/mg protein, respectively. Live foods had positive contributions on protease activities of larvae except for 10th day of feeding with enriched rotifer.

The lowest inhibition percent of Gemma Micro (50-100  $\mu$ ) was determined as 13.17% (day 5). Gemma Micro (50-100  $\mu$ ) had lower inhibitions on protease activities of seabream larvae than those of Caviar (100-200  $\mu$ ), especially day 20 and day 25.

The significant differences between cortisol levels of seabream larvae were observed ( $p < 0.05$ ). The lowest and highest cortisol levels of seabream larvae were found  $0.099\pm 0.009$  ng/g (day 35) and  $4.033\pm 0.38$  ng/g (day 10), respectively. Seabream larvae had high cortisol levels at the beginning of exogenous feeding due to the maternal cortisol was not reduced in prelarval stage after hatching ( $1.199\pm 0.15$  ng/g).

In conclusion, (1) the reasons of the high cortisol levels at the beginning of exogenous feeding should be investigated in future, (2) the first 10-day feeding period of seabream larvae had a critical importance due to the rotifers used in this stage are the nutritional deficiencies and the negative effects on protease activities of seabream larvae, (3) *Artemia* nauplii and *Artemia* metanauplii in weaning stage can successfully be used together with commercial diets but not the enriched rotifer, (4) Gemma Micro (50-100  $\mu$ ) can be used in earlier periods together with *Artemia* nauplii.

**2014, 69 pages**

**Key Words:** Seabream, protease activity, cortisol, stress

## TE EKKÜR

Öncelikle lisans ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca her konuda bana destek olup beni eğiten, yüksek lisans tez konusunun belirlenmesi, ara tırmalarının yapılması ve tez yazım süresince tecrübelerini benimle paylaşarak bana yol gösteren saygı değer hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mehmet NAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübeleri ve güler yüzleri ile bana yol gösteren saygı değer hocalarımız, Prof. Dr. Ayçe GENÇ'e ve Prof. Dr. Funda TURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda yanımda olarak bana destek veren kıymetli dostlarım, Yük. Müh. Ali UYAN'a, Yük. Müh. Rengin GÜRA AÇ'a ve Sayın Betül ARSLAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Ara tırma Hastanesi'nden Dr. İter LHAN'a ELISA testlerindeki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Doğduğum günden beri her anımda yanımda olan, destekleri ile bana güç veren, çocukları olduğum için onur duyduğum sevgili annem NAZLI HAKÖZÜ, babam EMİN HAKÖZÜ'ne ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Tez çalışmamın örnekleme süresinde her türlü imkânlarından yararlanmamı sağlayan EGEMAR Su Ürünleri Gıda Sanayi Ticaret A.Ş.'nin sahibi Metin NEKE'ye ve orada her soru ve sorunuma cevap olan Sayın Onur KÜNKÇÜ'ye, Sayın İsmet OFLAZ'a ve Sayın Hüseyin DEMİRTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Süleyman Demirel Üniversitesi Erişir Su Ürünleri Fakültesi'nden Uzm. Gürkan DİDİKEN'e, teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamı rahmetli annemimin anısına ithaf ediyorum.

ARALIK 2014, Gökmen HAKÖZÜ

## Ç İNDEK İLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TE EK KÜR.....	III
Ç İNDEK İLER.....	IV
EK İLLER D Z N .....	VI
Ç ZELGELER D Z N .....	VII
S İMGELER VE KISALTMALAR D Z N .....	VIII
1. G R .....	1
2. ÖNCEK ÇALI MALAR.....	7
2.1. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Balı ının Sistemati i.....	7
2.2. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Balı ının Biyolojisi.....	7
2.3. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Yeti tiricili inde Kültür artları.....	8
2.4. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Yeti tiricili inde Larval Dönem.....	8
2.5. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Larvalarında Sindirim Sistemi Geli imi.....	9
2.6. Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) Larvalarında Beslenme.....	10
2.7. Canlı Yemlerde Sindirim Enzim Çalı maları.....	11
2.8. Balıklarda Sindirim Enzim Çalı maları.....	13
2.9. Stres Hormonları.....	20
2.9.1. Balıklarda Stres Metabolizması.....	20
2.9.2. Kortizol Hormonu Üzerine Yapılan Çalı malar.....	22
2.10. Sindirim Hormonları.....	26
2.10.1. Bombesin.....	26
2.10.2. Kolesistokinin.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Ara tırma Yeri.....	29
3.1.2. Denemede Kullanılan Larvalar.....	29
3.1.3. Denemede Kullanılan Tank Sistemi.....	29
3.1.4. Denemede Kullanılan Canlı ve Mikroyemler.....	29
3.2. Örnekleme.....	31

3.2.1. Denemedeki Ortam şartları.....	31
3.2.2. Beslenme Programı.....	31
3.2.3. Analizler.....	32
3.2.3.1. Çipura Larva Ekstraktlarının Hazırlanması.....	33
3.2.3.2. Protein Solüsyonlarının Hazırlanması.....	33
3.2.3.3. Protein Analizi.....	34
3.2.3.4. Çipura Larvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	34
3.2.3.5. Mikroyemlerin ve Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri.....	34
3.2.3.6. Kortizol Analizi.....	35
3.2.4. Statistiki Analizler.....	35
4. ARA TIRMA BULGULARI ve TARTI MA.....	38
4.1. Çipura Prelarvalarının ve Postlarvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi...	39
4.2. Mikroyemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri.....	42
4.3. Canlı Yemlerin Proteaz Aktiviteleri.....	44
4.4. Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri.....	47
4.5. Kortizol Analizi.....	51
5. SONUÇ ve ÖNER LER.....	55
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇM.....	69

## EK LLER D Z N

ekil 1.1.	2008-2012 yılları arasındaki dünya su ürünleri üretim de erleri.....	1
ekil 1.2.	2008-2012 yılları arasında ülkemizin yeti tiricilik ve avcılıktan gelen toplam su ürünleri üretimi ve bu üretimde çipura yeti tiricili inin payı...	2
ekil 1.3.	2008-2012 yılları arasında çipura balı nın ülkemizdeki toplam yeti tiricilik üretimindeki payı.....	2
ekil 3.1.	Kortizol analizi esnasında kullanılan ELISA yıkama ünitesi.....	36
ekil 3.2.	Kortizol analizi esnasında kullanılan RAYTO marka RT-6000 ELISA READER.....	36
ekil 3.3.	Kortizol analizleri için ön hazırlıklar, pipetleme ve inkübasyon a amaları.....	37
ekil 4.1.	Çipura larvalarının prelarval (0-4.gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen de i imler.....	38
ekil 4.2.	Çipura larvalarının prelarval (0-4.gün) ve postlarval (5-40.gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen de i imler.....	39
ekil 4.3.	Mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon de erleri (%)......	41
ekil 4.4.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz aktivitelerinde gözlenen de i imler.....	44
ekil 4.5.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz katkı ve inhibisyonları.....	47
ekil 4.6.	Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin bireysel proteaz katkı ve inhibisyonları.....	48
ekil 4.7.	Çipura larvalarının 5. günden ve 40. güne kadar olan her be günlük dönemdeki kortizol seviyeleri.....	51



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Çipura ( <i>Sparus aurata</i> L.1758) balığının sistematiği.....	7
Çizelge 3.1.	Çipura larvalarının ticari besleme prosedürü.....	32

## SİGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

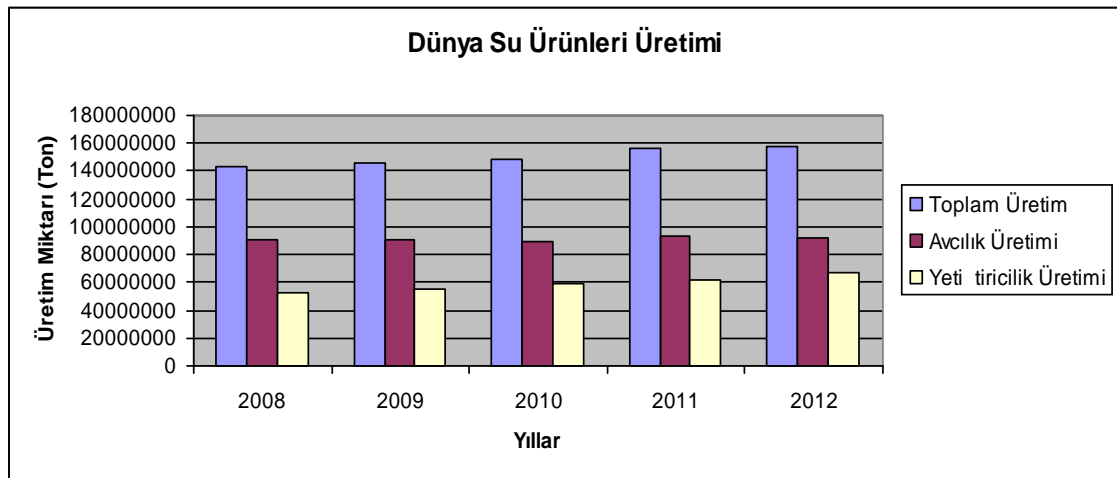
### SİGELER

U	: Unit
ng	: nanogram
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
mg	: miligram
g	: gram
kg	: kilogram
ppm	: mg/L
ppt	: g/L
°C	: derece
ml	: mililitre
L	: litre
m <sup>3</sup>	: metreküp
ACTH	: adrenokortikotropik hormon
CCK	: kolesistokinin
TCA	: trikloroasetik asit
%	: yüzde
PBS	: fosfat buffer saline

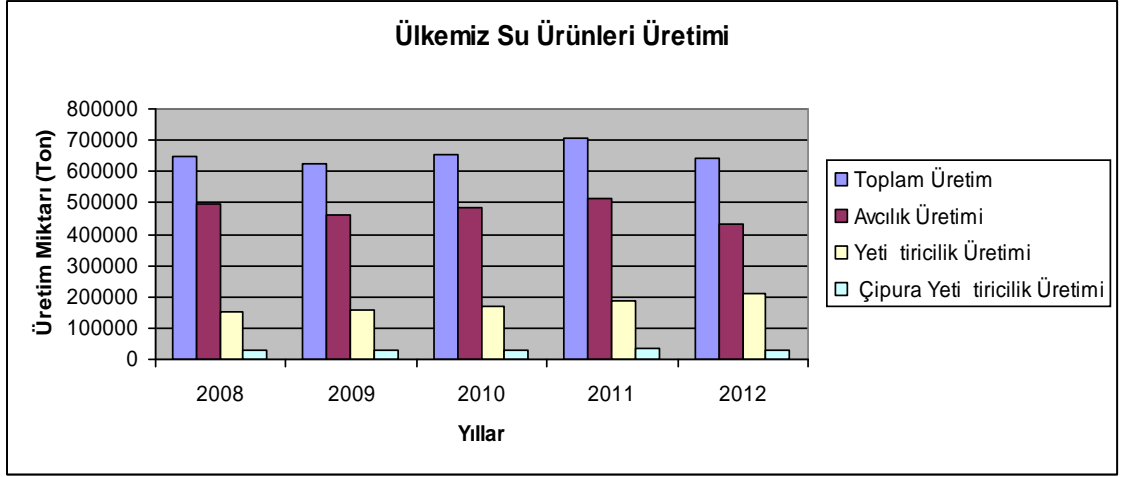
## 1. G R

Ülkemiz su ürünleri üretimi ve avcılığı ile ilgili su kaynakları potansiyeli açısından oldukça zengindir. Yakın zamana kadar ülkemizde su ürünleri üretimi avcılık yoluyla yapılırken, balıkçı teknelerinin sayılarındaki ve güçlerindeki artışlarla birlikte kontrolsüz avcılık sonucu balık stoklarında meydana gelen azalmalar avcılık yolu ile üretimin ekonomikliği ve sürdürülebilirliğini ortadan kaldırmıştır (Çelikkale ve ark., 1999).

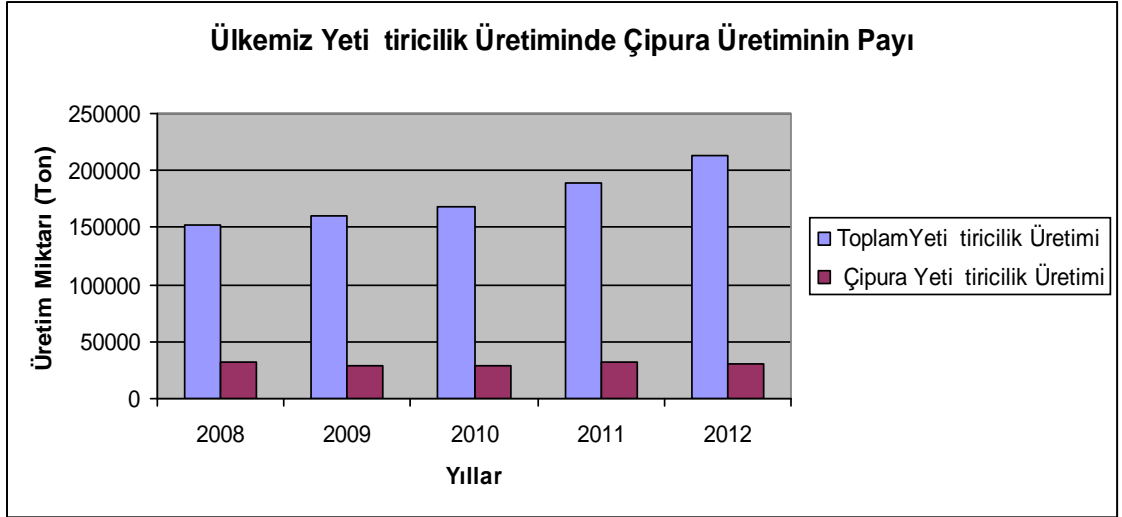
Dünyada ve ülkemizde ilk yetiştiricilik çalışmaları doğadan yavru toplama, kuluçkahane ortamlarına adaptasyon ve sonrasında tam kontrollü üretim şeklinde yapılmaktaydı. Bu üretim yöntemi, istenilen zamanda istenilen miktarlarda üreticilere yavru sağlayamadığı için, anaç beslemeden itibaren tam kontrollü üretim ekline dönüşmüştür. Ülkemizde tam kontrollü su ürünleri üretiminin diğer dünya ülkelerine göre geç başlamasının nedeni ilk dönemlerde bilinçsiz ve teknolojik gelişmelerden habersiz olarak yapılmasından kaynaklanmaktadır. Bu konudaki eğitim-öretim faaliyetlerinin başlaması ve teknolojik gelişmeleri takip eden işletmelerin Ar-Ge-Geliştirme (AR-GE) birimlerinin özveriyle çalışmaları sonucunda sektör kısa bir süre içinde Akdeniz ülkeleri içinde söz sahibi olacak noktaya gelmiştir. F.A.O. kaynaklarına göre, ekil 1.1 Dünya su ürünleri üretim değerlerini, ekil 1.2 Ülkemiz su ürünleri üretim değerlerini ve ekil 1.3 Ülkemiz yetiştiricilik üretiminde çipura üretiminin payını göstermektedir (Anonymous, 2014).



ekil 1.1. 2008-2012 yılları arasındaki dünya su ürünleri üretim değerleri



ekil 1.2. 2008-2012 yılları arasında ülkemizin yeti tiricilik ve avcılıktan gelen toplam su ürünleri üretimi ve bu üretimde çipura yeti tiriciliğinin payı



ekil 1.3. 2008-2012 yılları arasında çipura balığının ülkemizdeki toplam yeti tiricilik üretimindeki payı

Deniz balıklarının tam kontrollü üretimleri esnasında en büyük problemler larval dönemde ortaya çıkmaktadır. Kendine özgü yeti tiricilik sistemlerine ihtiyaç duyulan bu sistemlerde dikkat edilmesi gereken konuların başlıcaları şunlardır;

- Anaç balık yönetimi,
- Besleme programları,
- Mikrobiyel kontroller gelmektedir.

Anaç besleme, kaliteli ve direnci yüksek döllenmiş yumurta elde edebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Kaliteli ve direnci yüksek yumurtalar, prelarval ve

postlarval üretim esnasında meydana gelebilecek çevresel, besleme programları ve mikrobiyel kontrolsüzlüklerden kaynaklanabilecek olumsuzluklara karşı larvaların ya ama oranı ve direncini arttırmaktadır. Prelarval dönemlerde larvalara bir beslenme programı uygulanmadığı için burada dikkat edilmesi gereken konuların başında su kalite parametreleri ile diğer abiyotik (pH, sıcaklık, ışık) faktörler gelmektedir. Postlarval döneme geçilmesiyle birlikte besleme programı, bilhassa yem seçimi, yemin büyüklüğü ve mikrobiyel kontroller yüksek larva ya ama oranı elde edebilmek açısından büyük önem taşımaktadır. Postlarval dönemlerde yem seçimine ve besleme programının belirlenmesine etki eden faktörlerin başında;

- Larvanın ağız açıklığı,
- Larvanın sindirim sistemindeki enzimler gelmektedir.

Larvanın ağız açıklığı ve sindirim sisteminin enzimsel durumu doğrudan doğruya;

- Yumurta çapı ve kalitesine,
- Prelarval dönemdeki besin kesesinin tüketilme süresine ve bilhassa abiyotik faktörlerdeki değişimlere bağlıdır.

Doğrudan ilk yem almaya başlayan larvalara verilen canlı yemlerin ve mikroyemlerin büyüklüğü de yemlemenin etkinliği ve larvaların yaşayabilirlikleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yumurta çapı büyük olan ve prelarval dönemi uzun sürede geçirerek postlarval döneme ulaşan larvaların postlarval dönemdeki biyotik ve abiyotik olumsuzluklara karşı direncinin daha yüksek olduğu bilinmektedir.

Postlarval döneme gelen bir larvanın sindirim sisteminin enzimsel durumu, besleme programı kapsamında verilen yemin sindirilip sindirilemeyeceği konusunda net bilgiler vermektedir. Örneğin salmon larvalarının sindirim sistemi uzun bir inkübasyon süresi geçirmiş olmalarından dolayı iyi gelişmiş olup, doğrudan ilk yem almaya başladıkları dönemde ciddi problemler yaşamamaktadır. Buna karşılık çipura gibi deniz balıklarının birçokunun yumurta keselerini çevresel faktörlerin etkisiyle kısa sürede tüketiyor olmaları, postlarval dönemin başlangıcında dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle deniz balıklarının ilk beslenmeye başladıkları zaman verilecek yemlerin seçiminde dikkat edilecek hususlar;

- Larvanın a ız açıklı ına uygun olmalı,
- Sindirimi kolay olmalı,
- Larvaların besin taleplerini kar ılayabilmelidir (Altan,1998).

Rotiferler (*Brachionus plicatilis*) ve *Artemia* naupli'leri, deniz balıkları ve tatlı su balıklarının larval dönemlerinde canlı yem olarak yo un bir ekilde kullanılmaktadır. Kültür artlarında bu yemlerin yo un kullanılmalarına ra men bazı dezavantajlara sahip oldukları bilinmektedir. Bunlar ;

- Laboratuvar ve enerji yatırımlarının yüksek olması,
- Sabit bir besin kompozisyonlarının olmaması,
- Bilhassa *Artemia* konusunda dı a ba ımlı olmamız, iklimsel de i imlerden dolayı *Artemia*'nın stoklarında dünya genelinde bir azalma ve buna ba lı olarak fiyatlarındaki artı ,
- Sürdürülebilir bir kaynak olmamasıdır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, su ürünleri sektörü son yıllarda daha sürdürülebilir, besin kompozisyonu sabit tutulabilir, daha ekonomik ve canlı yemlerde mevcut olmayan bazı besin maddelerinin larvaya geçi ine izin verebilen mikroyemlerin üretimi üzerine yo unla mı tır.

Çıpuranın larval dönemlerinde gözlenen yüksek ölüm oranları ve canlı yemden mikroyeme geçi lerde ya anan problemlerden dolayı ticari üretimlerinde halen sorun ya andı ı bilinmektedir. Deniz balıkları üzerinde yürütülen çalı malarda, larval dönemlerde gözlenen yüksek ölüm oranlarının besinsel ihtiyaçlarının tam olarak kar ılanamamasından ve bu yemlerde kullanılan hammaddelerin larvaların proteaz aktiviteleri üzerinde negatif etkilerinden kaynaklandı ı bildirilmi tir (Yufera ve ark., 1996).

Deniz balıklarının larval dönemlerinde besinsel açıdan zenginle tirilmi canlı yemlerin kullanılması durumunda ya ama oranlarının arttı ı bildirilmi tir (Alpaz, 1996; Kolkovski ve ark., 1993). Buna kar ılıklı ara tırcılar, canlı yemlerin verilmedi i ve sadece yapay yemlerin kullanılması durumunda deniz balık larvalarının ya ama ve büyüme oranlarının dü tü ünü bildirmi lerdir (Yufera ve ark., 1996; Fernandez-Diaz ve Yufera, 1997). Böyle bir sonucun ortaya çıkmasında; yemin fiziksel ve biyokimyasal

özellikleri kadar larvanın enzim faaliyetleri üzerindeki etkilerinin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Larvanın enzim faaliyetlerini indirgeyen protein kaynaklarının daha zor hidrolize olduğu ve buna bağlı olarak sindirimlerinin de güçlüğü tespit edilmiştir (Yufere ve ark., 2000). Deniz balıkları larva yetiştiriciliğinde canlı yemleri tamamen veya kısmen ikame edebilecek alternatif mikroyem imdiye kadar üretilmemiştir.

Kolkowski ve ark. (1997a), çipura larvalarının canlı ve mikro partikül yemlerle beslemenin larvalardaki sindirim hormonları üzerine, özellikle bombesin hormonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla çalımlar yapmışlardır. Bombesin hormonunun, mide duvarlarına kan sirkülasyonunu arttırmasına ilave olarak, HCI salınımı ve midenin peristaltik hareketini aktive etmesi gibi sindirimi çeşitli yollarla etkilediği bilinmektedir. Çalımda, canlı yem *Artemia* ile beslenen grupta, mikro partikül yemle beslenen gruba göre yaklaşık %300 kadar daha yüksek bombesin hormonunun arttığını gözlemlemiştirlerdir. Fakat çalıma sonunda, bu endokrin cevabının arttığını açıklayabilecek *Artemia* da sorumlu olabilecek besin faktörleri hakkındaki bilgiler bir netlik kazanmamıştır. Diğer araştırmacılar tarafından yapılmış olan çalımlar sonucunda elde edilen bilgilere göre, serbest aminoasitlerin bu endokrin cevabı tetikleyebileceği düşünülmektedir. Daha doğrusu larvaların canlı yemlerinde bulunan serbest aminoasitlerin, larval sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan yada gelişmekte olan larvalarda sindirim işlemlerini tamamlamak için larvada bulunan endokrin faktörleri harekete geçirmiş olabileceği düşünülmektedir (Koven ve ark., 2001). Bunlara ilaveten, bazı balık larvalarında çözülebilir proteinlerin, serbest aminoasitlere göre sindirim hormonları üzerinde daha iyi bir tetikleyici olduğu bildirilirken (Koven ve ark., 2002), bazen tersi bir durumda gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Cahu ve Zambonino Infante, 1995 a,b).

Yemlerde besinsel olmayan faktörlerin bulunması protein sindirilebilirliğini etkilemekte, büyümeyi azaltmakta ve olumsuz fizyolojik etkilere sebep olmaktadır (Olli ve ark., 1994). Aynı zamanda bu faktörlerin bazıları balıkların sindirim mekanizması üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır (Alarcon ve ark., 1999). Araştırmacılar, çipura larvaları ve karideslerin proteaz aktiviteleri üzerine mikroyemlerin üretiminde kullanılan bazı yem hammaddelerinin (ovalbumin, hemoglobin, sübye unu, kazein)

inhibisyon etkileri hakkında bilgi vermektedirler (Alarcon ve ark., 1997; Alarcon ve ark., 1999; El-Sayed ve ark., 2000).

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bu problemler üzerinde önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir. Deniz balı larva kültürü çalışmaları sırasında ışık, tuzluluk, sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerinin etkilerinin araştırıldığı, ancak besin kalitesindeki dalgalanmalar sonucu ortaya çıkabilecek etkilerin imdiye kadar çalışılmadığı bilinmektedir. Yeterli miktarda beslenemeyen larvanın bu memnuniyetsizliğini hücresel ve fizyolojik tepkilerle veya her iki tepki ekliyle gösterdiği ve bu tepkilerin larval beslenme sorunlarının çözümünde anahtar rol üstleneceği düşünülmektedir.

Çalışma konusunun ortaya koyacağı bu yaklaşımda, ticari ve alternatif türlerin kültür çalışmalarında başarıya ulaşabilmek için öncelikle besinden kaynaklanan stres faktörlerinin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, besin kalitesinin larval dönem fizyolojisi üzerinde çok önemli bir role sahip olduğu ve besin-stres ilişkisi çözülebildiği ölçüde ticari ve alternatif türlerin sorunlarına da çözüm getirilebileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda çipura ile ilgili besleme programları geliştirilmiş olsa da, mevcut besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin çipura larvalarının besinsel ihtiyaçlarını ne ölçüde karşıladığı konusunda tatmin edici bir gösterge bulunmamaktadır. Bu bağlamda geliştirilmiş olan mevcut besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin test edilmesi ve larval dönemde verilen yemlerle ilgili memnuniyetin fizyolojik olarak ortaya konması gerekmektedir. Bu nedenle, belli bir besleme programına göre ticari olarak üretimi yapılmakta olan çipuranın larval dönemlerinde kullanılan canlı ve mikroyemlerin, larvaların üzerinde yarattığı stres seviyelerinin belirlenmesi, sektörde faaliyet gösteren işletmelerin bilhassa çipura larvalarının ticari besleme programlarında kullanacakları yemlerin seçiminde yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada kullanılacak yaklaşımla işletmelerin ticari besleme prosedüründeki yem arayışları esnasındaki ekonomik kayıplar önlenmiş olacaktır.

“Çipura (*Sparus aurata*, Linneaus 1758) Larvalarının Kortizol Seviyeleri Üzerine Ticari Besleme Prosedürünün Etkileri” isimli ve Yüksek Lisans tezi olarak planlanan bu çalışmada, çipura larvalarının besleme prosedüründe kullanılan canlı ve mikroyemlerin neden olduğu fizyolojik tepkilerin ortaya konması amaçlanmıştır.



## 2. ÖNCEK ÇALI MALAR

Bu bölümde çipura balı nın sistematiki, biyolojisi, yeti tiricilik artları, beslenme özellikleri, sindirim sisteminin geli imi ve stres hormonlarının yanı sıra konuyla ilgili oldu unu dü ündü ümüz önemli çalı malar özetlenmi tir.

### 2.1. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Balı nın Sistematiki

Çipura balı nın sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmi tir.

Çizelge 2.1. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) balı nın sistematiki

<b>Filum</b>	:Chordata
<b>Alt Filum</b>	:Vertebrata
<b>Sınıf</b>	:Osteichtyes
<b>Takım</b>	:Perciformes
<b>Alt Takım</b>	:Percoidei
<b>Familya</b>	:Sparidae
<b>Cins</b>	:Sparus
<b>Tür</b>	: <i>Sparus aurata</i> L.1758

### 2.2. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Balı nın Biyolojisi

Günümüzde ticari olarak üretimi yapılmakta olan çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) balıkları genellikle kumlu ya da çamurlu biyotoplarla nehir a ızlarında ve lagünlerde yo un olarak bulunmaktadır. Genellikle iklimsel açıdan tropikal, subtropikal ve ılıman bölgeleri tercih eden çipura balı na Moritanya’dan ngiltere’ye kadar olan tüm Atlantik kıyılarıyla birlikte, ülkemizde daha çok Akdeniz ve Ege denizinde rastlanmaktadır. Karnivor olarak beslenen bu balıkların boyları genellikle 70 cm’ye a ırlıkları ise 4-8 kg’a kadar ula abilir. Yapılan çalı malar, karnivor olarak bilinen bu türün özellikle Crustacea ve Mollusca’larla beslendi ini net bir ekilde ortaya koymu tur. Su sıcaklı nın 6-32 °C ve deniz tuzlulu unun ise ‰ 0,5-40 oldu u sularda çipura balıkları ya amlarını devam ettirebilmektedirler. Bu balıkların istedi i optimum pH aralı ı ise 6,5-9 olarak bildirilmi tir. Çipura balıklarının en iyi geli imi için sıcaklık

de eri de 22-25°C olup, ülkemizde üreme dönemi Ekim-Ocak aylarıdır (Alpaz, 1996; Tucker, 2000).

### **2.3. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Yeti tiricili inde Kültür artları**

Çipura larvaların larval dönemleri üzerine yapılan çalı malar, ilk dönemlerinde en iyi ya ama oranının 16-22°C oldu unu ortaya koymu tur. Özellikle, pek çok ara tırcı tarafından da kabul edildi i gibi, prelarval dönemde optimal geli imin gözlendi i sıcaklık 16°C'dir (Polo ve ark.,1990; Süzer, 1998). Prelarval ve postlarval a amada ‰ 15-38'lik tuzluluk oranının ya ama oranını arttırdı ı bildirilmektedir. Çipura larvalarında 100-150 lüx arasında ve 24 saat aydınlatma optimum geli im için önemlidir. O<sub>2</sub> de eri larva besleme döneminde 5mg/L'nin altına dü ürülmemelidir.

### **2.4. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Yeti tiricili inde Larval Dönem**

Çipura larvalarında kritik dönem yumurtadan çıktıktan sonra ba lamaktadır. Çipura larvaları yumurtadan çıktı nda yakla ık olarak 2,6-3,0 mm boyda olup, besin kesesine sahiptirler. Besin kesesinin tüketildi i ve dı arıdan yem alımının ba ladı ı zamana kadar geçen dönem prelarval dönem olarak bilinmektedir (Muhtarolu, 1988; Alpaz, 1996). Bu dönemde besin rezervlerinin en iyi ekilde kullanılması larval ya amayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bu rezervlerin en iyi ekilde kullanımı üzerine yapılan bir çalı mada prelarval a amada ortamın karanlık ve su sıcaklı mın 16°C olması gerekti i belirtilmi tir. Bu artlarda keseyi tüketen larvaların, aydınlık ortamlarda ve 16°C'den yüksek sıcaklıklarda tüketenlere göre besin kesesi rezervlerini daha iyi kullandı ı ve postlarval dönemdeki direncinin daha yüksek olaca ı bildirilmi tir. Yani, boydaki artı ile vitellüsün tüketilmesi yakından ili kili olup bilhassa sıcaklı a ba lı olarak de i mektedir (Muhtarolu, 1988; Alpaz, 1996; Süzer, 1998).

Prelarvalarda 4.gün gözler pigmentlenip a ız açıldı ı zaman postlarval dönem ba lamı olur. Bu dönemde postlarva yem almaya hazırdır. A ız açıldı nda vitellüs kesesinin büyük bir kısmı tüketilmi durumdadır. Postlarval a ama yakla ık olarak 40. güne kadar devam eder (Pillay, 1995; Tucker, 2000). Postlarval a amanın ba langıcında ba ve vücut yakla ık aynı yükseklikte olup, genelde toplam boyun 1/3'ü kadardır. Postlarval a ama genelde 28-30 mm'de son bulur. Bu safha içinde larvada sindirim

sistemi hava kesesi olumu balmakta ve devam etmektedir (Muhtarolu, 1988; Alpaz, 1996).

## 2.5. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Larvalarında Sindirim Sistemi Gelişimi

Deniz balıklarında sindirim sisteminin gelişimi üzerine yapılan çalışmalar balık larvalarının küçük boylarda olmasının yarattığı zorluklara rağmen son zamanlarda hızlı ve yoğun bir şekilde devam etmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan yeşil su tekniği ve diğer tekniklerde ortamda canlı yemlerin bulunmasının sonuçları önemli şekilde etkilediği bildirilmiştir (Kolkovski ve ark., 1997a,b). Tüm deniz balıklarında larvalar erginlerine göre daha düşük sindirim fonksiyonuna, daha düşük enzim üretimine ve daha basit bir yapıya sahiptirler (De Silva, 1998; Navarro, 1998).

Embriyonal aamada muskular segmentasyon ile ön, orta ve son barsak meydana gelir. Embriyonal dönemdeki gelişme daha çok abiyotik faktörlere bağlıdır. Çipura larvalarında sindirim sisteminin olumu aamaya başlaması ve dışarıdan beslenmenin başlamasıyla birlikte hızlı bir şekilde gelişmeye devam eder. Aamaya başlaması ve ilk beslemenin başlaması ile sindirim sisteminin gelişimi, larva beslemeye başlamasında kullanılan yemlere ve bu yemlerin larvaların besin ihtiyaçlarını karşılayıp karşılamamasına göre değişkenlik göstermektedir. Çipuranın postlarval aamada sindirim sisteminin gelişimini 3 aamada incelemek mümkündür. Bunlar;

- **4-10. günlük dönem;** Ağız açılmış, farinks ve özefagus'un epitel olumu başlamıştır. Pankreas dış salgı salgılamaya başlar ve karaciğerde rezervler oluşur (De Silva, 1998). Yani sekonder salgılar henüz oluşmamıştır (Muhtarolu, 1988; De Silva, 1998). Karaciğer ve pankreas yumurtadan çıkış anında oluşur ve besin kesesinin absorpsiyonundan sonra fonksiyonel hale gelir. Tat alma hücreleri çok sayıda olup, larva büyüdükçe fonksiyonellemektedir (Navarro, 1998). Kas tabakaları tam olarak fonksiyonel olmadığı için sindirim kanalında bulunan silli hücreler gıdaların taşınmasında etkin bir rol oynarlar (De Silva, 1998). Sindirim kanalı fonksiyonel olmadığı için besinlerin barsak boyunca geçişi hızlı olup, gıdaların absorpsiyon verimi düşüktür (Navarro, 1998).

- **10-30 günlük dönem;** Besin kesesi tüketilmi , hava kesesi i irilmi , safra kesesi ve pankreas tam aktif de ildir. Epiteyum mide gastrit salgılamaya ba lamı tır. Ba ırsak mukositleri bu dönemin ba langıcında görülse de, ba ırsak silleri safhanın sonuna do ru görülebilmektedir (De Silva, 1998). Bu safhada aynı zamanda ba ırsak ve mide arasında bir kapakçıkta gözlenmektedir.
- **30.günden sonraki dönem;** nce ba ırsak ve mide arasındaki kapakçıklar tam olarak ekillenmi olup, mide aktif olarak faaliyete geçmi tir (Muhtarolu, 1988; De Silva, 1998). Sindirim sistemi ergin bireylere benzer fonksiyonlara sahiptir.

## 2.6. Çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) Larvalarında Beslenme

A zın açılması ile prelarval dönemden postlarval döneme giren çipura larvalarının canlı yemlerle besleme periyodu ba lamaktadır. Prelarvalar bu döneme girdikleri zaman tam olarak besin rezervlerini tüketmi de illerdir. Bir taraftan kalan besin rezervlerini tüketirlerken, di er taraftan ortamda bulunan canlı yemlerle beslenmeye çalı maktadırlar. İlk beslenmeye ba ladıkları dönemde besin olarak verilecek yemlerin boyutunun 60-100µ civarındaki rotiferler olması gerekmektedir (Alpaz, 1996; Tucker, 2000). Bu dönemde verilen rotiferlerin çok zayıf hareket etme yetene inde olması, hem larvaları cezp etmekte hem de larvalar tarafından kolayca yakalanmasına fırsat vermektedir (Kolkovski ve ark., 1997a). Nitekim larvaların bu dönemdeki avcılık yetenekleri çok geli memi tir. Larvalara verilen rotifer boyutu larval dönemin sonuna do ru 300µ'a kadar büyütülür (Pillay, 1995; Alpaz, 1996). Larvalar 15. günden itibaren a ama a ama *Artemia* naupli'ye alı tırılır. Tanklara verilen rotifer sayısı azaltılarak, *Artemia* naupli sayısı artırılarak geçi kademeli olarak sa lanır. 30. güne kadar *Artemia* naupli ile beslemesi yapılan larvalara, 30-40. günler arasında *Artemia* metanaupli verilmektedir (Alpaz, 1996; Tucker, 2000). *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde az miktarlarda mikroyem girilmesi, mikroyemlere geçi açısından önemlidir. Bu besleme protokolleri, i letmelere göre de i kenlik gösterebilmektedir. Besleme protokollerinde gözlenen de i ikliklerin anaç beslemeden, yumurta kalitesinden ve prelarval dönemdeki abiyotik faktörlerden etkilendi i bilinmektedir.

Bilhassa canlı yemlerle besleme a amalarında ortama alg verilmesi üç açıdan oldukça önemlidir. Bunlar;

- Ortamın pH-O<sub>2</sub> dengesini sağlamak,
- Larva tankında uzun süre kalan canlı yemlerin besin kompozisyonlarında meydana gelen azalmayı minimize etmek (Alpaz, 1996; Tucker, 2000).
- Alglerin balık larvalarının sindirim enzimleri üzerindeki tetikleyici etkisidir (Cahu ve ark.,1998)

## 2.7. Canlı Yemlerde Sindirim Enzim Çalışmaları

Balık larvalarının birkaç türünde alınan gıdanın sindirilebilirliği için yeterli sindirim enzimi üretildiği gösterilmiştir. Canlı yemlerden larvalara aktarılan sindirim enzim katkısının besleme periyodunun başlangıcında çok düşük olduğu, genellikle toplam enzim aktivitesinin % 6'sını geçmediği bildirilmiştir. Yaşlı larvaların sindirimine canlı yemlerden gelen dışal enzimlerin önemli bir katkısının olmadığı söylenebilir, beslemenin ilk a amalarında önemli bir rolünün olduğu tahmin edilmektedir.

Canlı yemlerin sahip olduğu enzimlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvalarda sindirime yardımcı olduğu bilinmektedir. Munilla-Moran ve ark. (1990), 3 günlük kalkan balığının sindirim enzimlerine canlı yemlerin katkılarını, % 15-27 amilaz, % 43-60 proteaz ve % 89-94 esteraz ekinde bildirmişlerdir. Ara tırcılar, bireyler arasında sindirim enzimlerinin üretimlerinde gözlenen varyasyonların bazı larvalarda gıdanın diğerlerinden daha iyi sindirilmesiyle sonuçlanacağını bildirmişlerdir (Munilla-Moran ve ark., 1990). Bundan dolayı larvalardan daha iyi büyüme ve ya amaları elde edilmesi mümkündür. Larvaların ya amaları arasındaki kayıplar ilk besleme esnasında ya da yem tüketimlikleri (özellikle mikroyeme geçi dönemlerinde) yapıldığı zaman görülmektedir. Buna karşılık bazı larvalar bu yem tüketimliklerine adapte olabilmektedirler. Düşük enzim seviyeleri gıdanın küçük miktarlarını sindirmek için yeterli olabilmektedir. Buna karşılık yüksek alım oranlarında (*Artemia* naupli'de gözlemlendiği gibi) larval enzimler çok seyrek olabilir, bu nedenle canlı yemler parçalanamayabilir ve enzimler larval sindirim sistemine salınmazlar.

*Artemia*'nın sindirilebilirliği *Artemia*'nın yaşıyla, balığın türü ve yaşıyla tüketimlik gösterir. *Artemia*'nın tüketimlik tan 12 saate kadar (Instar II metanaupli)

sindirim sistemi açık olmayıp, *Artemia*'dan larvalara dışal sindirim enzimlerinin girişinin sınırlı olduğu görülür. Bu durum *Artemia*'yı bazı deniz balıklarının erken dönemleri için daha az sindirilebilir yapmaktadır. Bu dönemden sonra, *Artemia*'nın sindirim enzimlerinde çıkışta gözlenen miktarının yaklaşık 5 katı kadar artı görülmektedir (Pan ve ark., 1991). Diğer taraftan dekapüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının sindirilebilirlik açısından dirençli olduğu bildirilmiştir (Dendinos ve Thorpe, 1987).

Canlı gıdaların ringa (*Clupea harengus*) larvalarında dışal tripsin salgısına ilaveten içsel tripsin salgısının da artışı önemli bir rol oynamıştı bildirilmiştir (Pedersen ve Hjelmeland, 1987).

Warner ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, *Artemia* yumurtalarındaki proteazların çoğunun sistein proteaz grubundan olduğunu, bu proteaz sınıfının alkalik pH'da aktif olmadıklarını bildirmişlerdir (Warner ve Shridhar, 1985). Bu nedenle sindirim sistemi fonksiyonel olmayan larvalar için dışal enzim katkısının önemi, deniz ve tatlı su larva kültüründe yaygın olarak kullanılan canlı yemlerden biri olan *Artemia* için azalmıştır. Garcia-Ortega ve ark. (1998), dekapüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile yeni çıkan *Artemia* naupli arasında da besinsel kompozisyon ve enzimsel aktivite arasında çok önemli farklılıkların olmayacağını bildirmişlerdir. Buna karşılık Naz ve ark. (2011), *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli arasında enzimsel farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

Garcia-Ortega ve ark. (2000), tarafından, dekapüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile beslenen karabalıkların (*Clarias gariepinus*) sindirim sistemlerindeki proteaz aktivitesini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, dekapüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerine %1'den daha az bir katkı yaptığı, buna benzer düşük katkı oranlarının levrek larvalarında (Zambonino Infante ve Cahu, 1994a) ve çipura larvalarında (Moyano ve ark., 1996) gözlemlendiği bildirilmiştir.

Kumar ve ark. (2005), *Daphnia carinata*'nın proteaz aktivitelerinin belirlemek için yaptıkları çalışmada, en yüksek ve en düşük proteaz aktivitesinin 0,55 U/mg protein ve 0,28 U/mg protein arasında olduğunu bildirmişlerdir.

## 2.8. Balıklarda Sindirim Enzim Çalışmaları

Enzimler proteinlerden yapılmışlardır. Enzimler, etki ettiği maddenin sonuna “-az” eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimeye göre isimlendirilirler. Örneğin proteinlere etki eden enzimler “proteaz” olarak adlandırılırlar. Enzimler hücrelerde zincirleme şekilde çalışmaktadırlar. Bir enzim reaksiyonunun son ürünü diğerinin substratını yapar. Örneğin amilaz enzimi nişastayı parçalayarak, maltoza çevirir. Maltaz enzimi ise bu son ürünü kullanarak maltozu, glikoza çevirir. Bu reaksiyonlar hücrede meydana gelen enerji talebi doğrultusunda devam etmektedir.

Enzimler protein (apoenzim) ve koenzim olmak üzere 2 kısımdan meydana gelmektedirler. Protein kısmı enzimin hangi substrata etki edeceğini belirlerken, koenzim kısmı ise enzimin esas işlevsel olan kısmıdır. Alman kimyacı EMIL FISCHER tarafından, enzimin hangi substrata etki edeceğini belirleyen apoenzim kısmıyla substrat arasında anahtar-kilit uyumunun olduğu bildirilmiştir. Enzimler üzerinde, sıcaklık, pH ve substratın etkili olduğu bilinmektedir.

**Sıcaklık etkisi;** Enzimlerin en iyi çalışabileceği optimum sıcaklıkları vardır. Bu sıcaklıkların altında ya da üstünde enzim aktivitelerinde dalgalanmalar meydana gelmektedir. Yüksek sıcaklıklarda (55-60°C) ve düşük sıcaklıklarda (0°C) enzimler etkisiz hale gelmektedirler.

**pH Etkisi;** Enzimlerin en iyi çalışabileceği pH aralıkları vardır. Bu aralıkların dışında tam olarak fonksiyonel değildirler. Örneğin; proteini parçalayan pepsin pH=2’de maksimum çalışırken, yine protein metabolizması ile ilgili tripsin pH=8,5’de maksimum bir şekilde çalışmaktadır.

**Substrat Etkisi;** Sıcaklık ve pH optimum şartlarda tutulursa, enzim-substrat konsantrasyonu arasındaki orana göre reaksiyon hızında değişiklikler görülmektedir. Fakat enzim substrata doyduktan sonra substrat konsantrasyonundaki değişimler reaksiyon hızını etkilememektedir (Akyurt, 2004).

Proteazlar peptit bağlarının hidrolize eden enzimler olarak bilinirler. Proteazlar etki gösterdikleri yere göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak ikiye ayrılırlar (Palma ve ark., 2002). Ekzopeptidazlar substratın amino ya da karboksil ucundaki peptit bağını parçalarken, endopeptidazlar substratın terminal ucunun uzağındaki peptit bağlarını parçalamaktadırlar. Ekzopeptidazlar, peptit zincirinin serbest N-ucuna etki ederek tek

bir aminoasitin, dipeptitin ya da tripeptitin ayrılmasını sağlayan aminopeptidazlar ve peptit zincirinin C-ucuna etki ederek tek bir aminoasitin ya da dipeptitin ayrılmasını sağlayan karboksipeptidazlar olarak iki gruba ayrılmakta olup, substrat özgünlüğüne göre kendi içlerinde farklılık göstermektedirler. Endopeptidazlar ise enzim aktif yerini iaret eden katalitik mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Özellikle peptit zincirinin N- ve C- ucundan uzakta veya polipeptit zincirinin iç bölgelerine etki ederek kendilerini gösterirler.

### **Proteazlar literatürde;**

- Serin Proteazlar,
- Aspartik Proteazlar,
- Glutamik Proteazlar
- Asparjin Proteazlar
- Sistein Proteazlar,
- Metalloproteazlar
- Treonin Proteazlar olarak 7 gruba ayrılmaktadır (Rawlings ve ark., 2010)

Bunlardan a a ıda verilmi olan 5 tanesi bitkilerde tanımlanmıştır (Rawlings ve ark., 2010).

- Serin Proteazlar,
- Aspartik Proteazlar,
- Sistein Proteazlar,
- Metalloproteazlar
- Treonin Proteazlar

Proteolitik enzimler gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda teknolojileri deniz kaynaklarından yüksek kalitedeki proteinleri ekstrakte etmek için bu enzimleri kullanmaya başlamışlardır (Cano-Lopez ve ark., 1987; Mackie, 1982; Stefanson, 1988).

### **Endüstriyel proteazlar;**

- Orjinlerine göre (bitkisel, hayvansal veya mikrobiyel kaynaklar),
- Katalitik mekanizmalarına göre (ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar),
- Özgünlüklerine göre (özel bir peptit baş hedefi veya tercih ettiği ayırma yeri),



- Katalitik aktiviteye katılan aminoasit veya prostetik grubun kimyasal dogasına göre (serin proteazlar, sistin proteazlar, aspartik proteazlar, metallo proteazlar) ayrılmaktadırlar.

Balı ın bir yemi sindirebilme yetene i uygun sindirim enzimlerinin mevcudiyetine ba lıdır. Spesifik enzim aktivitelerinin (proteazlar, lipazlar) ölçümleri sindirim sistemlerinin kapasiteleri ve yem bile enlerinin türlerin geli im dönemleri esnasında kullanılabilme potansiyelleri hakkında bilgi sa larlar (Buddington ve ark., 1997). Sindirim i lemi midede ba layan ve ba ırsaklarda devam eden bir i lemdir. Bu i lem esnasında alınan materyaller proteinler, ekerler ve ya lar sırasıyla aminoasitler, basit ekerler ve ya asitleri gibi daha küçük moleküllere hidrolize olurlar. Balıklar genellikle beslenme alı kanlıklarında farklı anatomik ve fonksiyonel özelliklerini yansıtan de i kenlikler göstermektedirler. Balıkların hem besinsel hem de fizyolojik karakteristikleri gıda kaynaklarının geni kullanımına müsaade etmektedir. Bu sayede de i en çevre artlarına adaptasyon sa lanabilmektedir.

Sindirim sistemi içindeki enzimlerin aktivitesinin ve da ılımlarının belenme alı kanlıklarından etkilendi i bildirilmi tir (Lundstedt ve ark., 2002). Herbivor balıkların, karnivor balıklardan daha uzun bir sindirim sistemine sahip oldu u ve onların polisakkarit ihtiva eden yem hammaddelerini hidrolize etme yeteneklerinin daha yüksek oldu u bildirilmi tir. Buna kar ılık karnivor balıklar, herbivor balıklarla kar ıla tırıldı ında daha kısa bir sindirim sistemine sahip olup, proteinlerin hidrolizinde daha aktiftirler. Aynı zamanda, karnivor balıklarda amilaz ve lipaz aktivitesinin de sindirim sistemlerinde küçük yüzdelerde temsil edildi i bildirilmi tir (Chakrabarti ve ark., 1995; Hidalgo ve ark., 1999). Karnivor balıkların yem rasyonların da proteinler ve ya ların temel besin ve enerji kayna ı olarak önemli rol oynadıkları bildirilmi tir (Chou ve ark., 2001). Balıklarda alınan gıda midede ilk önce asit proteaz pepsin tarafından hidrolize edilmekte, daha sonra alkalın enzimlerle (tripsin, kimotripsin, karboksipeptidazlar ve lipazlar) hidrolize edilmektedirler (Halver, 1989).

Larvaların sentezledi i pankreatik enzimlerin içeri i ve aktivitesi genelde yumurtadan çıkı ta dü üktür. Keseli larval dönem geli imi esnasında enzimlerde, gıdadın ba ımsız bir artı oldu u kabul edilir (Zambonino Infante ve Cahu 1994a,b). Prelarval dönemden sonra dı beslenmenin ba ladı ı ilk günlerde, hem beslenen hem de

aç kalan larvaların enzimatik aktivitelerinde dalgalanmalar gözlenmektedir. Larvaların gelişimi ve besleme artlarına vermiş oldukları cevaplar bu kısa period esnasında oldukça kritik öneme sahiptir. Bu dönem larvalarda genellikle artan ölüm ve düşük gelişim oranlarıyla karakterize edilmektedir (Blaxter, 1988). Sindirim sisteminin gelişimiyle birlikte, larvalar yeterli miktarda gıda ile beslenebiliyorlarsa enzim sentezi artmaktadır. Enzim salgısının miktarı larvanın yem alım miktarına ve yem formülasyonunda kullanılan hammaddelere bağlı olarak görülmektedir (Zambonino Infante ve Cahu, 2001).

Pankreatik hücreler dış beslemenin başlamasından önce sindirim enzimlerini sentezlemeye başlarlar (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). Deniz balı larvalarında sindirim enzimlerinin (mide enzimleri dışında) dışarıdan yem almaya başlamasından önce mevcut olduğu görülür. Bu enzimlerin lipazlar, tripsin, kimotripsin, amilaz, aminopeptidaz, maltaz ve alkalın fosfataz olduğu bilinmektedir. Pankreatik ve bağırsak enzim aktivitelerinin ilk beslemenin başlamasından önce genelde düşük olduğu görülmektedir. Buna karşılık dış beslemeye geçildikten sonra larvalara verilen yemin memnuniyet derecesine göre artmaları bildirilmiştir (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). En önemli larva sindirim enzimleri lipazlar gibi lipolitik enzimler ve tripsin gibi proteolitik enzimlerdir. Bunlar ekzokrin pankreasta üretilir ve sindirim sistemine salınırlar. Bu enzimler safra tarafından üretilen alkalın ortamda aktif olurlar. Larvaların sindirim enzimleri üzerine yapılan kantitatif çalışmaların çoğu pankreatik hücrelerin tripsinogjen (tripsinin inaktif formu) ve safra tuzları lipazın dış beslemeye başlamadan önce sentezlendiğini göstermiştir. Bahsedilen enzimler larval gelişime bağlı olarak benzer bir yol izlemektedir.

Zambonino Infante ve Cahu (1994a), tarafından yapılan çalışmada 25. günden sonra canlı yem ve mikroyem grupları oluşturularak besleme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar mikroyemle beslenen gruptaki gelişim durumunun canlı yem grubuna göre düşük olsa da, enzimatik aktivitenin mikroyem grubunda tripsin aktiviteleri dışında daha yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, amilaz, lösin-alanin peptidaz ve alkalın fosfataz enzimlerinin yem tüketimine bağlı olarak gelişim gösterdiği belirlenmiştir.

Cahu ve Zambonino Infante (1994), yaptıkları çalı mada canlı yemlerin ve mikropartikül yemlerin levrek larvalarının tripsin aktivitesinde farklılık yaratmadı ını bildirmi lerdir. Bu sonuçları, tripsin aktivitesinin larvalara verilen yemlerin protein ve aminoasit profillerinden etkilendi ini belirten Tseng ve ark. (1982)'nın sonuçları destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra, Naz (2007), yaptı ı çalı mada çipura larvalarında tripsinin besinsel adaptasyonunu kontrol eden mekanizmanın 36.güne kadar etkin olmadı ını bildirmi tir. Naz (2007), aynı zamanda tripsini kontrol eden kolesistokinin (CCK) hormonunun 32. ve 36. günlerde yüksek seviyelerde oldu unu ortaya koymu tur.

Cahu ve Zambonino Infante (1995a), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarının sindirim enzimleri üzerine farklı nitrojen kaynaklarının etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalı mada, 25. günde % 10 aminoasit karı ı, % 10 kazein hidrolizatı, ve % 10 balık unu içeren mikroyemler kullanı mlardır. Bu çalı mada kontrol grubu olarak canlı yem kullanı mlı tır. Larval geli im kullanılan mikroyemler arasında benzerlik göstermi , fakat kontrol grubundan önemli seviyede daha dü ük bulunmu tur. Ya ama oranı mikroyemle beslenen gruplar içinde en yüksek kazein hidrolizat grubunda gözlenmi tir. Aminoasit grubunun tripsin enzim salgısını tetikledi i, kazein hidrolizat grubunda ise ekzokrin pankreas salgılarının azaldı ı tespit edilmi tir. Lösin-alanin peptidaz aktivitesi tüm mikroyem gruplarında yüksek seviyelerde kalırken, kontrol grupta larvalarının geli imi esnasında aminopeptidaz N'in arttı ı gözlenmi tir. Çalı manın sonuçları klasik yem rasyonlarının sindirim sistemi geli imini erteledi ini, buna kar ılıklı protein hidrolizat içeren yemlerin bu ertelemeyi engelleyebilece ini göstermi tir.

Perez ve ark. (1996), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarını 15-35. günler arasında farklı protein ve karbonhidrat içelikli yemlerle besleyerek, yasama, geli me oranları ile birlikte amilaz ve tripsin enzim aktivitelerini tespit etmi lerdir. En iyi geli me ve yasama oranının %50 protein, %17 karbonhidrat içeren yemle beslenen grupta oldu unu bildirmi lerdir. Amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeri inin artı na paralel olarak arttı ı, 35. günde ise yemlerin protein içeri indeki artı a paralel olarak tripsin aktivitesinin de arttı ını bildirmi lerdir. Çalı ma sonucunda amilaz aktivitesinin larval dönemde yeterli oldu unu, enzim aktivitesinin de ya a ba lı olarak de i ti i ara tırcılar tarafından bildirilmi tir.

Cahu ve ark. (1998), levrek (*Dicentrarchus labrax*) larvalarının sindirim enzimleri üzerine alglerin etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, alglerin mevcudiyetinin tripsin ve alkalın fosfataz gibi enzimsel aktiviteler üzerinde olumlu etkilerinin yanı sıra ya ama oranını da yükselttiği sonucuna ulaşımlardır. Aynı zamanda alglerin üretim tanklarında bulunmasının hücre membranlarının hidrolitik fonksiyonlarının balmasına fırsat vermesiyle sindirim enzimlerinin aktiviteleri üzerinde tetikleyici bir role sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Riberio ve ark. (1999), dil balığı (*Solea senegalensis*) larvalarında sitozolik enzim olan lösin-alanin peptidazda gözlenen azalma ve sindirim sisteminin gelişimindeki göstergelerinden biri olan alkalın fosfataz aktivitelerinde elde edilen bilgilere dayanarak, 25. günde sindirim sisteminin fonksiyonel olduğunu bildirmişlerdir.

Martinez ve ark. (1999), dil (*Solea senegalensis*) balığının larval gelişim dönemlerindeki sindirim enzim aktivitelerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, asit proteaz aktivitelerinin ilk günlerde düşük olduğu 12. günde artış gösterdiği, 12. günden 20. güne azalma eğilimine girdiği, bu tarihten itibaren ise artış eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık alkalın proteaz aktivitesinin ilk dönemlerde yüksek seyrettiği 12. güne kadar azaldığı, 12. günden 25. güne kadar nispeten sabit kaldığı, 25. günden itibaren asit proteaz aktivitesindeki artışa karşılık azalma gösterdiği bildirmişlerdir.

Balık larvalarının enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimleri;

- Canlı gıdaların kompozisyonlarındaki değişimlere cevap,
- Yeni organ ve dokuların gelişimi,
- Büyümenin bir sonucu olarak açıklamak mümkündür.

Martinez ve ark. (1999), alkalın proteaz aktivitesindeki azalmanın metamorfozun başlamasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Moyano ve ark. (1999), farklı bitkisel kaynakların çipura (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) ve dil (*Solea senegalensis*) balığının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *Sparus aurata* (25-50 g), *Oreochromis niloticus* (14-20 g), *Solea senegalensis* (70-90 g)'in proteaz aktivitelerini sırasıyla  $244 \pm 35$  U/mg protein,  $1297 \pm 86$  U/mg protein,  $37 \pm 5$  U/mg protein olarak bildirmişlerdir.

Alarcon ve ark. (1999), *in vitro* analizler kullanarak mikro kapsüllerin içeriindeki protein kaynaklarının çipura larvalarında proteaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini çalışmışlardır. 8 günlük çipura larvalarında protein kaynağı olarak albumin kullanılmasının % 60 gibi önemli bir oranda proteaz aktivitesini düşürdüğü, kazein ve kalamarunu gibi protein kaynaklarının kullanımının ise proteaz aktivitesinin değişmesine neden olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, larval balık beslemesinde kullanılacak mikro kapsüllerin yapımında hammadde olarak kalamarununun en iyi aday olduğunu belirtmişlerdir.

Garcia-Ortega ve ark. (2000), dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile beslenen karabalıkların (*Clarias gariepinus*) sindirim sistemlerindeki proteaz aktivitesini açlık, bir öğün besleme ve sürekli besleme esnasında tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, açlık esnasında proteaz aktivitesinin azaldığı, günde bir öğün besleme yapılan grupta besleme sonrası 3. saat ve 12. saatte proteaz aktivitelerinde artış gözlemlendi ve istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Her 4 saatte beslenen karabalık larvalarının proteaz aktiviteleri, günde bir kere beslenen grupta bulunan denizlerden istatistiksel bakımdan farklılıklar göstermiştir. Bu çalışmada, dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının % 1'den daha az bir katkı yaptığı bildirilmiştir.

Yufera ve ark. (2000), çalışmalarında çipura (*Sparus aurata*) larvalarının ilk beslenmesinde protein duvarlı farklı tipteki mikro kapsülleri kullanmışlardır. Kullanılan yemlerin hiçbirisi kontrol grubu olan canlı yemlerden sağlanan gelişme ve yaşam oranını vermezken, sindirim sisteminde yemlerin kolayca parçalanabildiği, bazı dememe gruplarında histolojik incelemeler sonucunda bağırsak epitelyum yapısının çok iyi durumda olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda 4. günde proteaz aktivitesinin başladığı, larvanın yaşına bağlı olarak bu proteaz, amilaz ve alkalik fosfataz aktivitelerinin geliştiğini, fakat ilk bir ay proteaz enzim çetliliğinin artmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca; mikroyemlerin gelişiminde dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan birinin yem hammaddesinin seçimi olduğunu belirtmişlerdir.

Naz (2007), çipura larvalarının farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia*'larla beslendikleri zaman enzimatik değişimlerini belirlemeye yönelik yapmış olduğu çalışmada, lösin-alanin peptidaz aktivitesinin en düşük değerinin 28. günde gözlemlendiğini, aminopeptidaz-N enzim aktivitesinin 28. günden sonra artma eğiliminde

oldu unu, alkalın fosfataz enzim aktivitesinin 20. günde en yüksek de erlere ula tı mı, tripsini kontrol eden mekanizmanın 36. günden sonra aktif oldu u ve kolesistokinın (CCK) hormonunun 32. gün ve 36. günlerde, yüksek seviyelere ula tı ı belirtilmi tir.

## **2.9. Stres Hormonları**

### **2.9.1. Balıklarda Stres Metabolizması**

Balıklar, do al veya kültür artlarında dinamik çevreden dolayı sürekli olarak stres faktörleri tarafından uyarılmaktadırlar. Bu stres faktörlerinin iddeti ve süresi balık tarafından bir tepkinin olu turulup olu turulmamasında önemli rol oynamaktadır. Stresin homeostazi kavramı ile ili kili oldu u bildirilmi tir (Chrousos ve Gold, 1992). Homeostazi ise canlıların fizyolojik denge hali olarak tanımlanmı olup, ya am fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için önemlidir. Homeostazi dengesini bozmayı hedefleyen faktörlere kar ılık canlılar bu dengelerini muhafaza edebilmek için bazı davranı ve fizyolojik de i imler göstererek stres cevabı meydana getirmektedirler (Johnson ve ark., 1992).

Balıklarda stres olu turabilen faktörler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak gruplandırılabilir. Stres tipleri ise akut ve kronik olmak üzere iki ekildedir. Akut stres canlının ani ve iddetli olarak oka u ratılması, kronik stres ise uzun zaman diliminde, kesintisiz olarak uyarılmasıdır. Akut veya kronik olarak ortaya çıkan fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlere kar ı, balı ın ortaya koydu u fizyolojik de i imler “stres cevabı” olarak adlandırılmaktadır (Wedemeyer ve ark., 1990).

Akut stres balıklarda birbirini izeleyen iki tepkide kendini gösterir (Gamperl ve ark., 1994).

**Birincil tepki;** Enerji ihtiyacını kar ılamaya yönelik endokrin tepkidir. Katekolaminler kısa dönemde glikojenez aracılı ıyla enerji sa lama görevi üstlenirken, kortizol ise uzun dönemde glikojen, lipit ve protein katabolizmasını uyararak enerji sa lama görevini üstlenir (Gamperl ve ark., 1994).

**İkincil tepki;** Metabolik adaptasyonla ilgilidir. Su ürünleri yeti tiricili inde bilhassa yo un stok ko ullarında fizyolojik denge kurulamaz ve buna ba lı olarak dı etkenlere kar ı direnç azalır (Van Weerd ve Komen, 1998).

Bir faktörün stres olu turucu potansiyelinin olup olmadı ının de erlendirilebilmesi için, canlı açısından bir enerji maliyetinin olması gerekmektedir. Balıklarda stres esnasında enerji ihtiyacının arttı ı görülmektedir (Davis ve Peterson, 2006). Akut stres metabolik aktivitelerde hızlı gerçekte en geçici durumlardır.

#### **Akut stresin belirlenmesinde;**

- Plazma kortizol seviyeleri (Ruane ve ark., 2001),
- Glikoz seviyeleri (Martins ve ark., 2006),
- Davranı lar da gözlenen de i imler (Xu ve ark., 2006) kullanılabilir.

Kortizol ve glukoz serumda bulunan önemli bile enler olup, balıklarda fizyolojik durum hakkında indikatör olarak kullanılmaktadırlar. Kortizol, adrenal korteks tarafından üretilen, canlının strese gösterdi i tepkiyle ili kili bir kortikosteroid hormondur. Plazma kortizol düzeyinin ya , beslenme, beslenme sonrası durum ve mevsim gibi birçok faktörden etkilendi i bildirilmi tir (Wedemeyer ve ark., 1990). Aynı zamanda kortizolün, do rudan ve dolaylı olarak balıkların stres tepkilerinde önemli bir rol oynadı ı bildirilmi tir (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen ve ark., 1999).

Stres tepkilerinin balıklarda meydana getirdi i negatif durumlara kar ılık organizmanın mücadele edebilmesinin enerjiyle ba lantılı oldu u bilinmektedir. Glukoz, stres tepkilerinde organizmanın ihtiyaç duydu u enerjiyi sa lamaktadır. Kortizol'ün balıklarda glukoneojenez ve glikojenoliz yoluyla glukoz üretimini artırdı ı ve bu nedenle plazma glukoz düzeyinde yükselmelere neden oldu u bilinmektedir (Iwama ve ark., 1999). Glukozun yüksek konsantrasyonları balı ın stres faktörlerine maruz kaldı ını ve yo un bir ekilde enerji kaynaklarını kullanmaya ba ladı ını göstermektedir. Bu esnada, azalan glukoz konsantrasyonu enerji kaynaklarının tüketildi ini ve buna ba lı olarak organizmanın durumunun kötüye gitti ini gösterir (Timur ve Timur, 2003).

Wedemeyer ve ark. (1990)'a göre balıklardaki stres cevabı esnasında, kortizol salgılanması a a ıdaki ekilde tanımlanmı tir.

- İlk tepki nöroendokrin bile enleri içermektedir. Stres faktörleri kromafin dokudan katekolamin salgılamasını ba latmaktadır. Bunlar adrenalin ve noradrenalinlerdir.

- Katekolaminlerin salgılanmasıyla birlikte hipotalamik hipofiz bezi sistemi uyarılmaktadır. Bu durum hipotalamustan kortikotropin salgı hormonunun serbest kalmasını sağlamakta ve hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasına neden olmaktadır.
- ACTH'ın böbrekler arası bezi tetiklemesiyle kortizol hormonunun sentezi ve salgılanması gerçekleşmektedir.

Kortizolün en iyi bilinen etkilerinden biride, karbonhidrat olmayan maddelerden karaci erde glikoz olu umunu (glikojenez) artırmasıdır. Kortizol bu görevi;

- Plazmadaki aminoasitlerin karaci er hücrelerine giri ini sa layarak,
- Karaci erde glikojenezde rol oynayan enzimlerin olu umunu sa layarak,
- Karaci er dı ındaki dokulardan, özellikle kan ve lenfoit dokulardan aminoasitlerin salınımını te vik ederek gerçekleşmektedir.

Kortizol ba ta kaslar olmak üzere karaci er dı ındaki dokulardan aminoasitlerin serbest hale gelmesine, hücre dı ı sıvılara ve kana geçmesine neden olmaktadır. Böylece plazmada, karaci erde glikoza dönü türülmek üzere daha çok aminoasit bulundurulur. Bu hormon etkisiyle aminoasitlerin plazmadan daha do rusu hücre dı ı sıvıdan karaci er hücrelerine ta nımını hızlanır ve karbonhidrat olmayan maddelerden glikoz olu umu artar.

Balıkların bu de i ikliklere göstermi oldukları fizyolojik tepkilerin ölçülmesi, yeti tiricilik yöntemlerinin optimize edilmesinde önemli katkılar sa lamı tır. Kronik stresin engellenmesi balı ın sa lık durumu ve büyüme performansı açısından su ürünleri yeti tiricili inde oldukça önemlidir. Kronik stres durumlarında kortizol seviyesi negatif feed-back mekanizmaları nedeniyle yükselmez (Procarione ve ark., 1999). Yo un balık yeti tiricili inde, stres faktörlerinin neden oldu u kronik strese balıklar adapte olamamakta ve sonuçta büyümeleri olumsuz etkilenmektedir.

### **2.9.2. Kortizol Hormonu Üzerine Yapılan Çalı malar**

Stres faktörlerine maruz bırakılmamı balıklar kortizol içeren yemlerle beslendiklerinde plazma kortizol konsantrasyonlarının uzun süreli olarak yüksek seyretti i gözlenmi bu durumun büyüme ve kondisyon üzerinde negatif etkileri oldu u belirtilmi tir (Barton ve ark., 1987). Di er taraftan balıklara kortizol enjekte edilmesi sonucunda, kortizol konsantrasyonlarında artı gözlenmi ve bu durum;



- Gonadal steroidlerin azalmasına,
- Gonadotropik hormon seviyelerinin azalmasına,
- Gonad büyüklü ünün dü mesine neden olmu tur (Foo ve Lam, 1993).

Plazma kortizol konsantrasyonundaki dalgalanmaların büyüklü ünün ve süresinin türlerine (Davis ve Parker, 1986) ve su sıcaklı na (Sumpter ve ark., 1985) ba lı olarak de i im gösterdi i tespit edilmi tir. Salmonid balıkların ilk kortikosteroid stres cevabını su sıcaklı na ba lı olarak kuluçka döneminin ikinci ve be inci haftalarında gösterdikleri bildirilmi tir (Pottinger ve Mosuwe, 1994).

Balıklarda yumurta çıkı ı öncesi tiroid ve kortizol hormonlarının bulundu u tespit edilmi tir. Bu hormonların fonksiyonel tiroid dokusu ve böbrekarası hücreler embryogenesiste geli medi i için anaç orjinli oldu u bildirilmi tir (Mylonas ve ark., 1994; Berry ve ark., 1995; Szisch ve ark., 2005).

Strese maruz bırakılmamı dinlenme dönemindeki balıklarda plazmadaki kortizol hormonunun konsantrasyonunun 5 ng/ml'den az oldu u ve stres faktörlerine maruz kalmalarıyla birlikte 30 dakika içinde 100 kat artı gösterdi i bildirilmi tir (Barton ve Iwama, 1991).

Morgan ve ark. (1997), tilapyaları (*O. mossambicus*) tatlı sudan ‰ 12 ve ‰ 25 tuzlu sulara aktardıkları çalı malarında, tuzlu sulara aktarımdan 1 gün sonra plazma kortizol ve glikoz seviyelerinin yükseldi ini bildirmi lerdir.

Pottinger ve Carrick (1999), di i gökku a ı alabalıklarında yumurtlamadan önce ve yumurtlamadan sonrasını içine alan 21 aylık dönemdeki yüksek stresin etkisini plazma kortizol ve plazma glikoz de erleriyle belirlemeye çalı mı lardır. Çalı ma sonucunda plazma kortizol ve plazma glikoz seviyesinin büyümeye herhangi bir etkisi olmadı ını, ancak di er çevresel etkenlerle beraber olu an stresin belirlenmesinde kortizol seviyesinin belirleyici olabilece ini bildirmi lerdir.

Montero ve ark. (1999), yüksek stok yo unlu unda üretilen stres altındaki juvenil çipuralarda bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin de i imini ara tırmı lardır. Çalı mada yüksek stok yo unlu unun kronik stres yarattı ı, yüksek stok

yo unlu undaki balıkların plazma kortizol seviyesinin dü ük stok yo unlu una göre dört kat arttı ı bildirilmi tir.

Rottlant ve ark. (2000), çipura balıkları üzerinde yaptıkları çalı mada iki stres faktörünü kullanarak glikoz, kortizol ve ACTH seviyelerini belirlemi lerdir. Birincisinde balıkları normal tanklardan alıp, daha küçük hacimli tanklara koymu lar, ikincisinde ise kortizol içerikli yemle beslemi lerdir. İlk stres tepkisi sonrasında kortizol ve ACTH seviyelerinde artı görülmesine ra men, ikinci stres faktöründe kortizolün, ACTH'ı baskıladı ı tespit edilmi tir.

Slovan ve ark. (2001), kortizol konsantrasyonlarının davranı parametreleriyle ili kili oldu unu bildirmi tir.

Stoltze ve Buchmann (2001), iki farklı su sıcaklı nda *Gyrodactylus derjavini* ile infekte edilen yavru gökku a ı alabalıklarının kortizol seviyelerini belirledikleri çalı mada, her iki su sıcaklı nda da, infekte balıklardaki kortizol seviyesinin arttı ını bildirmi lerdir.

Üreme, açlık, yo un stoklama ve kirleticiler gibi birçok faktörün balıklarda strese neden oldu u bildirilmi tir (Almeida ve ark., 2001). Kortizol'ün balıklarda antigonadal etki gösterdi i bildirilmi tir (Bisson ve Hontela, 2002).

Çipura (*S. aurata*) ve levrek (*D. labrax*) ile yapılan bir çalı mada balıklarda kronik stres neticesinde plazma kortizol, plazma glikoz seviyeleri ve di er bazı parametrelere bakıldı ı. Çalı manın sonuçları, plazma kortizol seviyelerinin artı ının kronik stres durumunu ortaya koymada indikatör olarak kullanılabilece i bildirilmi tir (Caruso ve ark., 2005).

Szisch ve ark. (2005), çipura larvalarının tiroid ve kortizol hormonlarının ontogenisi üzerine yaptıkları çalı mada, kortizol de erlerinin yumurtada  $0,83\pm 0,02$  ng/g, çıkı ta  $0,39\pm 0,03$  ng/g, ilk beslemede  $3,40\pm 0,19$  ng/g olarak belirlemi lerdir. Bu a amadan sonra kortizol de erlerinde sürekli bir artı gözlendi i, çıkı tan sonraki 23. günde  $7,38\pm 1,16$  ng/g, 29. günde  $7,53\pm 0,96$  ng/g ve 45. günde  $14,55\pm 2,82$  ng/g de erlerine ula ıldı ı bildirilmi tir. Çalı ma esnasındaki en yüksek kortizol de erleri,

52. günde ve 71. günde sırasıyla  $14,82 \pm 2,71$  ng/g ve  $14,82 \pm 3,12$  ng/g olarak kaydedilmiştir.

Pek çok çalı mada stoklama yo unlu unun artması ile balıkların plazma kortizol seviyelerinde yükseli tespit edilmiştir (Costas ve ark., 2008). Yüksek stoklama ko ullarında su kalitesinde gerçekleşen dü melerin de balıklarda büyümeyi olumsuz etkiledi i, yem alımını ve yemden yararlanmayı dü ürdü ü bildirilmiştir (Björnsson ve Olafsdottir, 2006).

Jorgensen ve Buchmann (2007), *Ichthyophthirius multifiliis* ile infekte edilen gökku a ı alabalıklarındaki kortizol seviyesinde artış oldu unu bildirmi lerdir.

Tuna Kele temur ve Özdemir (2008), nakil i leminin gökku a ı alabalıklarının plazma kortizol ve glikoz düzeylerine etkisini ara tırdıkları çalı mada, nakil i leminin kortizol seviyelerini arttırdı nı, 24 saat sonra ise eski seviyelerine geldi ini bildirilmiştir.

Rafatnezhad ve ark. (2008), mersin balı ı juvenillerinde stok yo unlu unun plazma kortizol ve glikoz konsantrasyonu üzerine önemli bir etki yapmadı nı bildirmi lerdir. Bu durum mersin balıklarının kültür ko ullarında yüksek stoklara toleranslı oldu unu göstermektedir.

Marco ve ark. (2008), farklı stoklama yo unlukları ve akut stresin levrek balıkları üzerindeki fizyolojik tepkilerini belirlemek için yaptıkları çalı mada,  $45 \text{ kg/m}^3$  ve daha üstü olan stoklama yo unlu unun daha yüksek serum kortizol seviyelerine yol açaca nı ve enerji durumunu etkileyebildi ine dikkat çekmi lerdir. Aynı balık türü ile daha yüksek stoklama yo unluklarında çalı an Sammouth ve ark. (2009), stres indikatörlerinden kortizol seviyesine bakarak levre in  $70 \text{ kg/m}^3$ 'e kadar büyüme parametrelerinde herhangi bir olumsuz etki olmadan yeti tirilebilece ini göstermiştir.

Santos ve ark. (2010), tarafından yapılan çalı mada ise, Avrupa levre i (*Dicentrarchus labrax*)'inde artan stok yo unluklarının balıklar üzerinde kronik stres etkisi yarattı ı ve sonuçta yem alımını ve büyümeyi dü ürdü ü belirlenmiştir.

Bayrak (2013), gökku a ı alabalı ının stoklama oranları ve refahı üzerine yaptıkları çalı mada artan kortizol konsantrasyonlarının üreme hormonlarını

baskıladı nı böylece oogenez ve spermatogenezi olumsuz etkileyerek gamet kalitelerini dü ürdü ünü bildirmi lerdir.

## **2.10. Sindirim Hormonları**

Deniz balıklarının larva yeti tiricili inde, prelarval dönemden sonra ilk beslenmeye ba lama dönemleri sindirim sistemlerinin henüz tam olarak fonksiyonel olmadı ı dönemlere rastlamaktadır. Deniz balıklarının sindirim sistemlerinin geli imi üzerine imdiye kadar birçok çalı ma yapılmı tır (Walford ve Lam,1993; Segner ve ark., 1994; Cahu ve Zambonino Infante, 1995a,b; Luizi ve ark., 1999; Ronnestad ve ark., 2000a,b). Balıklarda ba ırsak hormonlarının da ılımı konusunda da bazı çalı malar mevcuttur (Holmgren ve ark., 1982; Reinecke ve ark., 1997; Kurokawa ve ark.,2000; Kamisaka ve ark., 2001).

### **2.10.1. Bombesin**

Kolkovski ve Tandler (1995), serbest aminoasitlerin, pankreatik enzimlerin salgısını kontrol eden bombesin gibi hormonal faktörlerin salınımını te vik etti i bildirmi lerdir.

Kolkovski ve ark. (1997a), mikropartikül ve canlı yemlerin bombesin hormonu üzerine olan etkilerini incelemi lerdir. Sadece canlı yemle beslenen grupta, yalnızca mikro partikül yemle beslenen gruba göre % 300 daha fazla bombesin hormonunun tespit edildi i, fakat burada kullanılan canlı yemdeki tetikleyici faktörün hala belirsiz oldu unu bildirmi lerdir.

Kolkovski ve ark. (2000), juvenil tatlı su levreklerinin (*Perca flavescens*) beslenmesinde kullanılan yemlere hormon ve sindirim enzimi ilavesinin, bu balıkların büyüme ve enzimatik aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemi lerdir. Bu hormon ve enzim ilavesinin balıkların sindirimine katkısının olup olmayaca ı hipotezi bu çalı ma ile test edilmi tir. Bu çalı mada test edilen diyetler;

- Ticari alabalık ba langıç yemi,
- Yüksek oranda balık ve kalamar unu içeren yem,

- Deneysel diyeteye % 0,1 oranında ilave edilen bombesin (sindirim hormonu),
- Deneysel diyeteye % 0,1 oranında ilave edilen pankreatin (sindirim enzimi)'dir.

Çalı ma sonunda, dört farklı yemle beslenen balıklar benzer bir geli me göstermi tir. Ya ama oranı açısından deneme grupları arasında önemli bir farklılık gözlenmemi , buna ilaveten yüksek bir ya ama oranı elde edilmi tir. Deneme grupları arasında tripsin, kimotripsin ve pepsin'in aktiviteleri arasında önemli farklılık bulunmamı tır. Bu çalı ma, tatlı su levre i juvenillerinde sindirim hormonu ve enzimlerinin yemlere ilavesinin gerekli olmadı nı ortaya koymu tur. Hormon ve enzim ilavesine balıkların ihtiyaç duymaması bu balıkların sindirim sistemlerinin tam olarak geli ti ine i aret etmi tir.

### **2.10.2. Kolesistokinin**

Kolesistokinin (CCK) hormonu sindirim i lemlerinde en önemli düzenleyici hormonlardan biri olarak bilinmektedir. CCK ba ırsak hattı boyunca epitelyum hücreler etrafında da ılan endokrin hücreler tarafından üretilmektedir.

#### **CCK'nın fonksiyonları;**

- Safranın salınımı,
- Pankreatik sindirim enzimlerin salınımı,
- Mide bo lu unun düzenlenmesidir.

Kolesistokininle ilgili balık larvalarında yapılan çalı malar hala yetersizdir. İnsanlar üzerinde yapılan çalı malarda CCK'nın en popüler stimulantının di-tri peptidleri ihtiva eden proteinler ve kısmen sindirime u ramı ya ürünleri oldu u bildirilmi tir (Liddle, 2000).

Koven ve ark. (2002), ringa balıkları üzerinde yaptıkları çalı mada çözülebilir proteinin, serbest aminoasitlerden daha hızlı ve daha büyük miktarda CCK tetikledi ini (tüm vücut homojenatında) bildirmi lerdir. Buna ilaveten triptik aktivitelerinin de proteinle beslenen larvalarda arttı nı, buna kar ılık serbest aminoasitlerle beslenen larvalarda bir de i im gözlenmedi ini belirtmi lerdir.

Cahu ve Zambonino Infante (1995b), deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde yaptıkları çalı mada, protein hidrolizatı (kazein)'nın tripsin aktivitesini indirgedi i tespit etmi ler. Buna kar ılık serbest aminoasitlerin bir karı ımı ile beslenen larvalarda tripsin aktivitesinde bir artı oldu unu gözlemlemi lerdir.

Liddle (2000), triptofan ve fenilalanin'in CCK salgısını situmule etmek için potansiyel ürünler oldu u bildirmi tir.

Koven ve ark. (2002), yaptıkları bir çalı mada, sindirim kanalı dolulu unun CCK salgılamasında etkili olmadı ını bildirmi lerdir.

Benthley (1998), besleme esnasında proteolitik enzim salgısının düzenlenmesinin sindirim hormonlarını ihtiva eden birçok komponent tarafından kontrol edildi i bildirmi tir. Bu ara tırıcı, CCK hormonunun vertebratalarda sindirim esnasında tripsin gibi pankreatik enzimler ve safranin salınımının düzenlenmesinde anahtar bir rolü olmasından dolayı oldukça önemli oldu unu belirtmi tir. Bu konu üzerinde yapılan di er çalı malarda, tripsin'in di er proteolitik enzimleri aktive etmesinden dolayı sindirim i lemlerinde anahtar bir enzim olarak hizmet etti i belirtilmi tir (Holst ve Schmidt, 1994; Liddle, 1995).

Ueberschar (1988), larval a amada tripsin'in en önemli proteolitik sindirim enzimi oldu unu ve genelde çıkı tan sonra tespit edildi ini bildirmi tir.

Chey (1993), serbest aminoasitlerin pankreatik enzimlerin salgılanmasını kontrol eden somatostatin ve CCK gibi hormonal faktörlerin salınımını tetikledi ini bildirmi tir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Ara tırma Yeri**

Bu ara tırmanın deneysel a aması, **EGEMAR SU ÜRÜNLER Gıda San. ve Tic. A. .'** de, analiz a aması ise Süleyman Demirel Üniversitesi E irdir Su Ürünleri Fakültesi Yeti tiricilik laboratuvarı ile Süleyman Demirel Üniversitesi Ara tırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekte tirilmi tir.

##### **3.1.2. Denemede Kullanılan Larvalar**

Bu ara tırmada yumurtlama tanklarına alınan anaçlardan, sıcaklık 17°C'ye gelince tamamen do al ko ullarda yumurta alınımı tir. Döllenni yumurtalar tank dı ındaki reküparatörlerde toplanıp, gerekli tartım ve dezenfeksiyon i lemleri yapıldıktan hemen sonra konik inkübasyon tanklarına aktarılmı tir. nkübasyon tanklarında yumurtadan çıkan keseli larvalar 8 tonluk yo un larva üretim tankına 125 adet/lit olarak stoklanımı tir. 25. günden sonra larvalar 15 tonluk sörvaj tanklarına alınımı tir.

##### **3.1.3. Denemede Kullanılan Tank Sistemi**

Kullanılan tankların iç kısmı larvanın bu dönemdeki gereksiniminden dolayı siyah renklidir. Besleme a amasında tankların tabanında biriken atıklar sifonla iki günde bir temizlenmi tir.

##### **3.1.4. Denemede Kullanılan Canlı ve Mikroyemler**

Çipura larvalarının ticari besleme prosedüründe;

- Alg olarak *Nanochloropsis sp.*,
- Rotifer olarak *Brachionus plicatilis* (SS- ve S- tip rotifer)
- *Artemia* naupli ile *Artemia* metanaupli (AF ve EG serisi)
- Mikroyem olarak ise GEMMA Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ) kullanılmı tir.

Rotifer üretimi 3,2 tonluk tanklarda yapılmı olup, besleme esnasında Algamac Protein Plus, zenginle tirme esnasında da S.presso kullanılmı tır. Rotifer üretimindeki su sıcaklı ı 24-26°C, oksijen 8-12 ppm, pH ise 7-8 arasında tutulmu tur. Rotifer kültüründe stok miktarı 1500-2000 adet/ml olmu tur. Rotifer üretiminde 14-16 saat ön besleme, 7-8 saat zenginle tirme yapılmı tır.

Artemia yumurta açılımı ve zenginle tirme i lemi 4 tonluk tanklarda yapılmı olup, 1 m<sup>3</sup>'e 2-2,5 kg artemia yumurtası konulmu tur. *Artemia* naupli besleme a amasında küçük boyutlu ve zengin içeri e sahip olmasından dolayı AF tip, *Artemia* metanaupli besleme a amasında ise EG tip *Artemia*'nın kullanımı tercih edilmi tır. *Artemia*'nın zenginle tirme i leminde S.presso kullanılmı olup, zenginle tirme süresi 24 saat olarak ayarlanmı tır. *Artemia* üretimindeki su sıcaklı ı, 24-26°C, oksijen 8 ppm'in altına dü ürülmemi , pH ise 7,5-8,5 arasında tutulmu tur.

### 3.2. Örnekleme

Çipura anaçlarından yumurta alımı, larvaların beslenmesi ve örnekleme i lemleri **EGEMAR Su Ürünleri Gıda San. ve Tic. A. .'**ye ait kuluçkahanede gerçekleştirilmi tır ( ekil 3.1). Çipura larvaları ilk beslenmeye ba ladıkları dönemden 40. güne kadar örneklenmi tır. Örnekleme ticari besleme prosedürünün uygulandı ı 8 tonluk larva üretim tankından ve 15 tonluk sörvaj tankından yapılmı tır. Örnekleme i lemi sabah saatlerinde larvalara yem verilmeden önce yapılmı tır. 200-300µ göz açıklı ina sahip plankton a ı ile hazırlanan süzme düzene i kullanılarak larvalar tanklardan toplanmı ve so utulmu tatlı su ile yıkanarak tuzdan arındırılmı tır. Süzme düzene inde toplanan larvalar spatül yardımı ile 3 ml'lik kriyojenik tüplere aktarılmı tır. Kriyojenik tüpler vial tutucuya tutturularak Air Liquide GT 40 marka sıvı nitrojen tankına konmu lardır. Larva örnekleri i letmeden Süleyman Demirel Üniversitesi E irdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına getirilene kadar -196°C'de muhafaza edilmi tır. E irdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına getirilen larvalar - 80°C derin dondurucuya konarak analiz a amasına kadar muhafaza edilmi tır.



### 3.2.1. Denemedeki Ortam şartları

Çipura anaçlarından tamamen doğal koşullarda yumurta alımı gerçekleştirilmiştir. Yumurtalar gerekli sterilizasyon işlemlerinin ardından 17°C'de tamamen karanlık ortamda inkübasyon tanklarına alınmıştır. Inkübasyon tanklarının konik tabanından havalandırma yapılarak yumurtaların tank içinde homojen dağılımları sağlanmıştır. Yumurtadan çıkış esnasında ve prelarval dönemde gelişimin daha iyi olması için ortamın karanlık olmasına dikkat edilmiştir. Besin kesesinin tüketiminin ardından inkübasyon tanklarından alınan larvalar 8 tonluk larva üretim tanklarına konulmuştur. Alg girişi yapılarak 50 lux aydınlatma uygulanmıştır. Bu esnada larvalarda ağız açılımı olduğu için canlı yem olarak rotifer girişi yapılmıştır. Larvanın ağız büyüklüğündeki değişimlere göre canlı yemler *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli olarak değiştirilmiştir. Besleme periyodunda belirtildiği gibi canlı yem dönemlerinde larvaları mikroyeme alırtmak için mikroyem girişi de yapılmıştır. Larvalar 25. günden sonra sörvaj tanklarına alınarak beslemelerine devam edilmiştir. Örnekleme esnasında tuzluluk 30-37 ppt, su sıcaklığı 17-20°C, oksijen ise 7,8-8,3 arasında değişmiştir. Çipura üretimi esnasında 4. güne kadar 0,4 m<sup>3</sup>/saat, 7. güne kadar 0,6 m<sup>3</sup>/saat, 12. güne kadar 0,8 m<sup>3</sup>/saat, 17. güne kadar 1 m<sup>3</sup>/saat, 22. güne kadar 1.2 m<sup>3</sup>/saat, 27. güne kadar 1,4 m<sup>3</sup>/saat, 30-40. günler arasında 2 m<sup>3</sup>/saat olarak su değişimi yapılmıştır.

### 3.2.2. Beslenme Programı

Çizelge 3.1'de çipura larvalarının postlarval dönemdeki besleme prosedürü ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çipura larvalarının ticari besleme prosedürü

LARVA	ALG	ROT FER	ARTEM A	M KROPART KÜL		
YA (GÜN)	10 <sup>6</sup> hücre/ml	(adet/ml)	AF (adet/ml)	EG (adet/ml)	50-100 µ (%)	100-200 µ (%)
-3	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	3-3,5	8-13	-	-	-	-
10	5-5,5	8-13	-	-	-	-
15	7-8	8-13	1-1,5	-	-	-
20	7-8	8-13	2-3	2-3	-	-
25	-	-	-	7-8	5	-
30	-	-	-	1-2	5	-
35	-	-	-	-	2,5	2,5
40	-	-	-	-	-	5

### 3.2.3. Analizler

EGEMAR Su Ürünleri Gıda San. ve Tic. A. .'ye ait kuluçkahanede ticari olarak üretimi yapılan çipura larvalarından 40. güne kadar, her 5 günde bir örnekleme yapılmı tır. letme ko ullarında sıvı nitrojen tankında -196°C'de, E irdir su ürünleri fakültesinde -80°C'de muhafaza edilen larvalarda ilk olarak proteaz aktiviteleri belirlenmi tir.

Daha sonra ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin (Zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) ve mikroyemlerin (GEMMA Micro (50-100µ) ve Caviar (100-200µ)) larvalar üzerinde yaratmı oldukları inhibisyon etkileri analiz edilmi tir. Bu çalı ma esnasında ticari besleme prosedürünün

ileri safhalarında yaygın olarak kullanılan Caviar (200-300 $\mu$ ) ve Caviar (300-500 $\mu$ ) yemleri de test edilmi tir.

Son olarak larvalarda stres indikatörü olan kortizol aktiviteleri belirlenmi tir. Larva örneklerinin a a ıdaki gibi hazırlanan solüsyonlarının analizleri 3 tekerrürlü olarak yapılmı tir. Proteaz ve inhibisyon analizleri Süleyman Demirel Üniversitesi E irdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarında yapılmı olup, kortizol analizleri ise Süleyman Demirel Üniversitesi Ara tırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya laboratuvarında gerçekte tirilmi tir.

### **3.2.3.1. Çipura Larva Ekstraktlarının Hazırlanması**

Çipura larvaları distile su ile homojenize edildikten sonra, örnekler 16000 g, 30 dakika (+4°C) süre ile santrifüjlenmi tir. Elde edilen süpernatantlar analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmi tir.

### **3.2.3.2. Protein Solüsyonlarının Hazırlanması**

Çalı mada kullanılacak protein kaynakları (Zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli, GEMMA Micro(50-100 $\mu$ ), Caviar (100-200 $\mu$ ), Caviar (200-300 $\mu$ ) ve Caviar (300-500 $\mu$ )) 100 mg/ml'lik konsantrasyonlarda distile su ile hazırlandıktan sonra homojenize edilmi tir. Homojenize olan örneklere 15000 g de 10 dakikalık bir santrifüj i lemi uygulanmı tir. Elde edilen süpernatantlar analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmi tir.

### **3.2.3.3. Protein Analizi**

Çipura larva ekstraktlarının, çözülebilir protein konsantrasyonları Bradford (1976) tarafından geli tirilen bir protein renk (dye) çözeltisine dayalı yöntem ile belirlenmi tir (Biorad Protein Assay, Cat. No: 5002). Biorad kit prosedürleri uygulandıktan sonra **UV-M N 1240 (SHIMADZU)** spektrofotometrede 595 nm'de ölçümler yapılmı tir. Elde edilen de erler proteaz ve inhibisyon sonuçlarının mg protein ekinde ifade edilmesinde kullanılmı tir.

#### 3.2.3.4. Çipura Larvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çipura larva ekstraktlarında proteaz aktiviteleri Walter (1984) tarafından belirtilen metoda göre belirlenmiştir. Substrat olarak kazein kullanılmış olup, kazein solüsyonu 10 g/l konsantrasyonda (buffer: 50 mM Tris HCl, pH:8,5) hazırlanmıştır. Substrat ve larva ekstraktlarının inkübasyon reaksiyonu 0,5 ml trikloroasetik asitin (TCA, 120 g/l konsantrasyonunda) ilavesi ile durdurulmuştur. Proteaz aktiviteleri, dakikada salınan tyrosin miktarının µg cinsinden ifadesi olarak verilmiştir (U/mg protein).

#### 3.2.3.5. Mikroyemlerin ve Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

Bu amaçla daha önceden hazırlanmış olan protein solüsyonlarının (Zenginleştirilmiş Rotifer, *Artemia* naupli, *Artemia* metanaupli, GEMMA Micro (50-100µ), Caviar (100-200µ), Caviar (200-300µ) ve Caviar (300-500µ)) çipura larvalarının proteaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri analiz edilmiştir. Analizlerde Garcia-Carreno (1996) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır. Öncelikle larva, buffer ve protein solüsyonları oda sıcaklığında inkübe edilmiş, daha sonra kazein solüsyonu ilave edilerek tekrar inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon 0,5 ml TCA (120 g/l konsantrasyonunda) ilavesi ile durdurulmuştur. Körlere benzer şekilde hazırlanmış olup, TCA kazein solüsyonundan önce ilave edilmiştir. Proteaz inhibisyonu kontrol grubundakine göre azalan proteaz aktivitesi olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar % değerler olarak verilmiştir.

#### 3.2.3.6. Kortizol Analizi

Çipura larvalarının kortizol ekstraktlarının elde edilmesinde Alderman ve Bernier (2009) tarafından tanımlanan metod kullanılmıştır. Kortizol analizleri ise **FISH CORTISOL ELISA KIT (CUSABIO BIOTECH CO.,Ltd)** prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır. Yıkama işlemleri **BIOTEK marka ELx50** otomatik yıkama cihazı kullanılarak (ekil 3.2), okuma işlemleri ise **RAYTO marka RT-6000 ELISA READER** kullanılarak 450 nm 'de yapılmıştır (ekil 3.3).

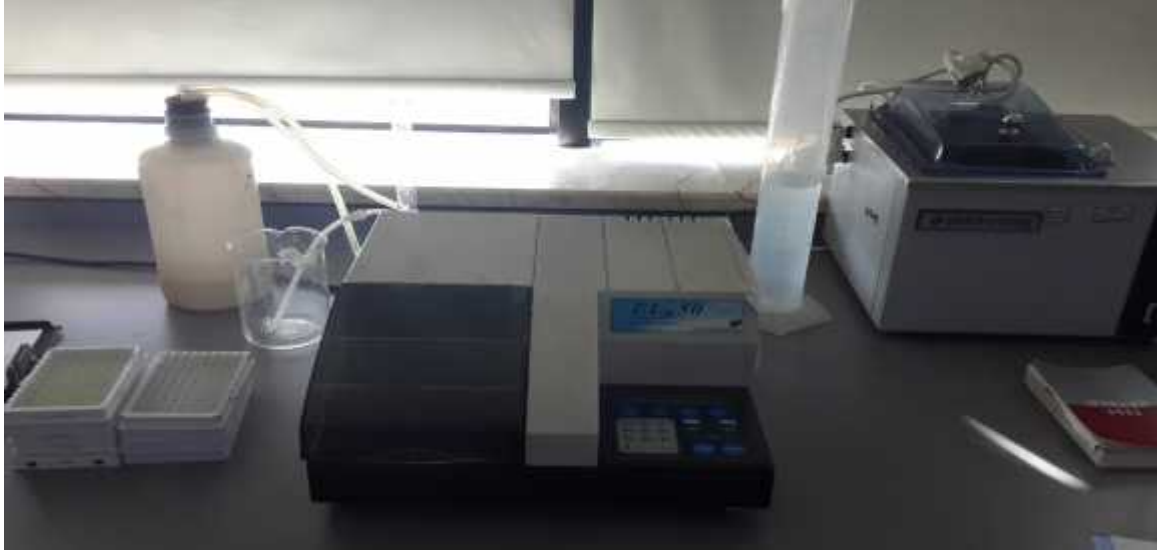
**Çipura larvalarının kortizol ekstraktları a a idaki ekilde hazırlanmı tir.**

- Çözdürülen larvalar, tartıldıktan sonra 500 µl PBS’de homojenize edilmi tir.
- Homojenizasyon sonrasında homojenizatör ucu 500 µl PBS ile yıkanmı tir. Örnek geçi leri arasında kontaminasyonu önlemek amacıyla % 100’lük ethanol ve de iyonize su ile iyice temizlenmi tir.
- Elde edilen homojenatlar 10 ml’lik tüplere alınarak 5 ml di etil ether ilave edilmi tir.
- 1 dakika vortekslendikten sonra 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmi tir.
- Sarı renkli kortizol tabakası alınır. Speed-VAC cihazı kullanılarak eter hızlı bir ekilde ortamdan uzakla tırılır. Buharla tırma sonrası örnekler -20°C’de ELISA K T prosedürleri uygulanana kadar muhafaza edilmi tir.

ELISA K T prosedürlerinin uygulanmasından önce örnekler 1 ml PBS ile tekrar olu turulmu ve +4°C’de gece boyu inkübe edilmi tir ( ekil 3.4).

**3.2.4. statistiksel Analizler**

Elde edilen canlı yem ve mikroyemlerin proteaz aktivite ve kortizol de erleri tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yöntemi ile de erlendirilmi tir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar ise Duncan çoklu kar ıla tırma testi yapılarak belirlenmi tir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar ortalama  $\pm$ standart hata ekinde verilmi tir. Ara tırma sonucundan elde edilen bütün veriler SPSS 9.0 istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmi tir (SPSS, 1993).



ekil 3.1. Kortizol analizi esnasında kullanılan ELISA yıkama ünitesi



ekil 3.2. Kortizol analizi esnasında kullanılan RAYTO marka RT-6000 ELISA READER



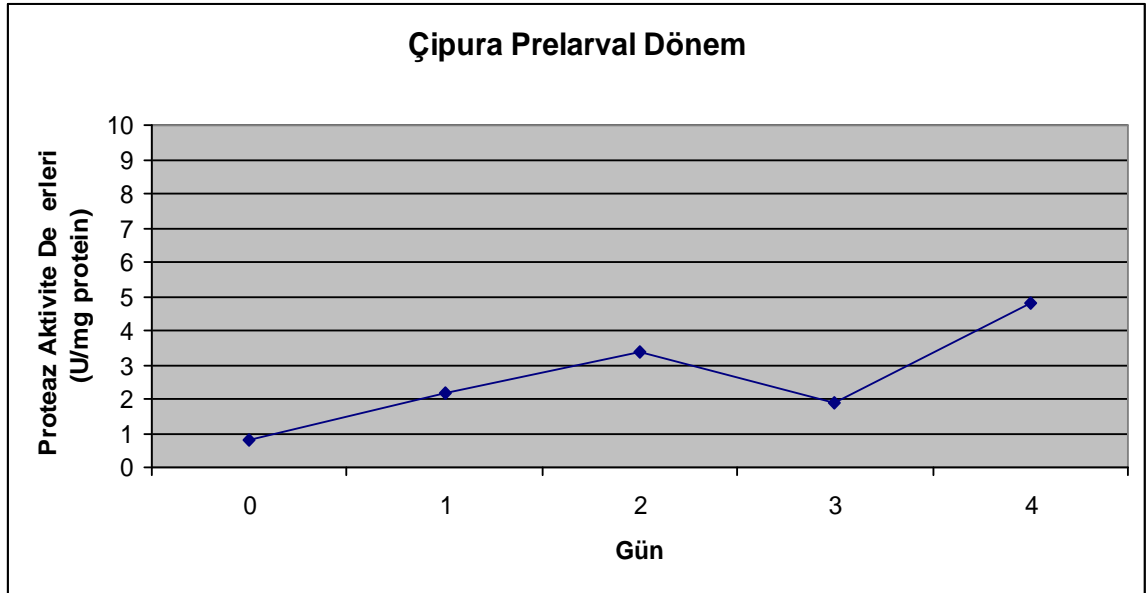
ekil 3.3. Kortizol analizleri için ön hazırlıklar, pipetleme ve inkübasyon a amaları

#### 4. ARA TIRMA BULGULARI ve TARTI MA

Bu çalı ma ile çipura larvalarının ticari besleme prosedüründe kullanılan yemlerin, larvaların proteaz aktiviteleri üzerindeki etkileri ve bu yemlere larvaların vermi oldukları fizyolojik tepkilerin test edilmesi amaçlanmı tır.

##### 4.1. Çipura Prelarvalarının ve Postlarvalarının Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çipura larvalarının prelarval dönemlerindeki proteaz aktiviteleri incelendi inde en dü ük aktivitenin larvanın yumurtadan ilk çıkı yaptı ı 0. günde  $0,77\pm 0,36$  U/mg protein, en yüksek aktivitenin ise postlarval döneme geçi yapmaya ba ladı ı 4. gün de  $4,77\pm 0,7$  U/mg protein olarak gözlendi i tespit edilmi tir ( ekil 4.1). 3. gündeki prelarvaların proteaz aktivitelerinde bir azalma gözlenmi tir ( $1,91\pm 0,23$  U/mg protein). Prelarvaların 0. gün, 1. gün, 2. gün, 3. gün ve 4. gün proteaz aktivitelerinin ortalamaları arasındaki farklılıkların, istatistiksel açıdan önemli oldu u gözlenmi tir ( $p<0,05$ ).



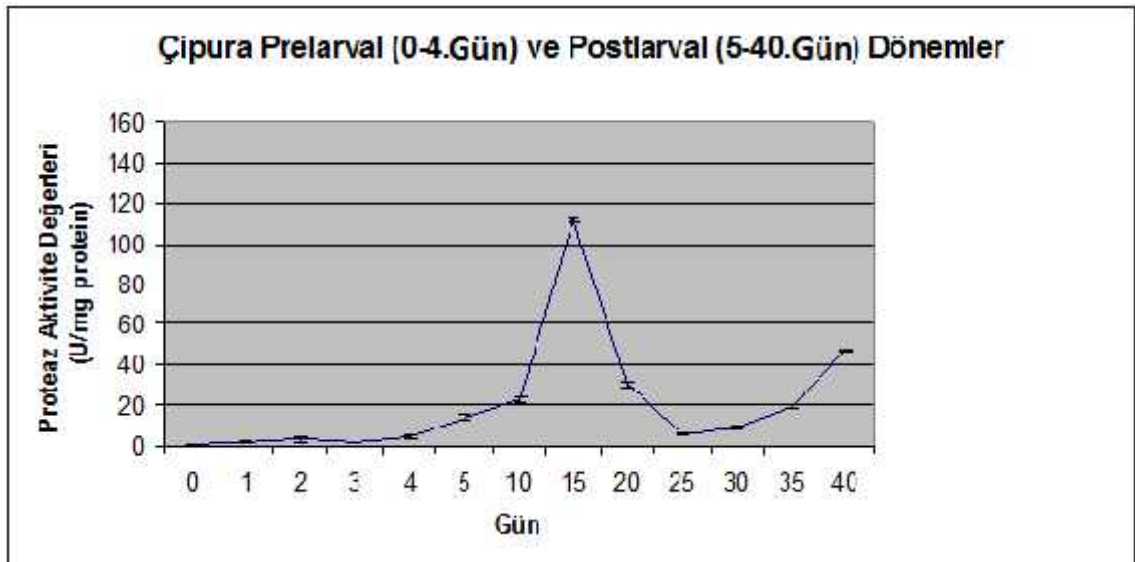
ekil 4.1. Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen de i imler

0. gün, 1. gün, 2. gün ve 3. gün prelarvalarında gözlenen proteaz aktivitelerinin ortalamaları arasında istatistiksel farklılık bulunmadı ı ( $p>0,05$ ), buna kar ılık 4. gün



grubunun sadece 0. gün ve 3. gün prelarvalarının proteaz aktivitelerinin ortalama değerlerinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

Çipura larvalarının postlarval dönemlerindeki proteaz aktiviteleri değerlendirildiğinde en düşük aktivite 25. günde  $5,75\pm0,51$  U/mg protein, en yüksek aktivite ise 15. gün de  $111,57\pm0,74$  U/mg protein olarak gözlemlenmiştir (ekil 4.2). Postlarval döneme geçiş yapmaya başladığı 4. gün de  $4,77\pm0,7$  U/mg protein olarak gözlenen proteaz aktivitesi, postlarval döneme geçiş yaptığı ilk günde (5. gün) artışı göstererek  $14,04 \pm 1,09$  U/mg protein olmuştur. 5. günden 15. güne kadar postlarvaların proteaz aktivitelerinde yükselme eğilimi gözlemlenmiş olup, 15. günde çalışmaya süresi içindeki en yüksek proteaz aktivite değerine ulaşılmıştır ( $111,57\pm0,74$  U/mg protein). 15. günden sonra 25. güne kadar postlarvaların proteaz aktiviteleri düşme eğiliminde olmuştur. 25. günde postlarvalar en düşük proteaz aktivitesine sahip olmuşturlar (5,75±0,51 U/mg protein). 25. günden itibaren postlarvaların proteaz aktivitelerinde artış eğilimi başlamış olup, çalışmanın sonunda proteaz aktivite değeri  $47,13\pm0,79$  U/mg protein (40. günde) olmuştur. Postlarvaların 5. günden 40. güne kadar olan tüm yaş gruplarının proteaz aktivitelerinin ortalamalarının birbirlerinden farklı olduğu, bu farklılıklarında istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



ekil 4.2. Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) ve postlarval (5-40. gün) dönemlerindeki proteaz aktivitelerinde gözlenen değişimler

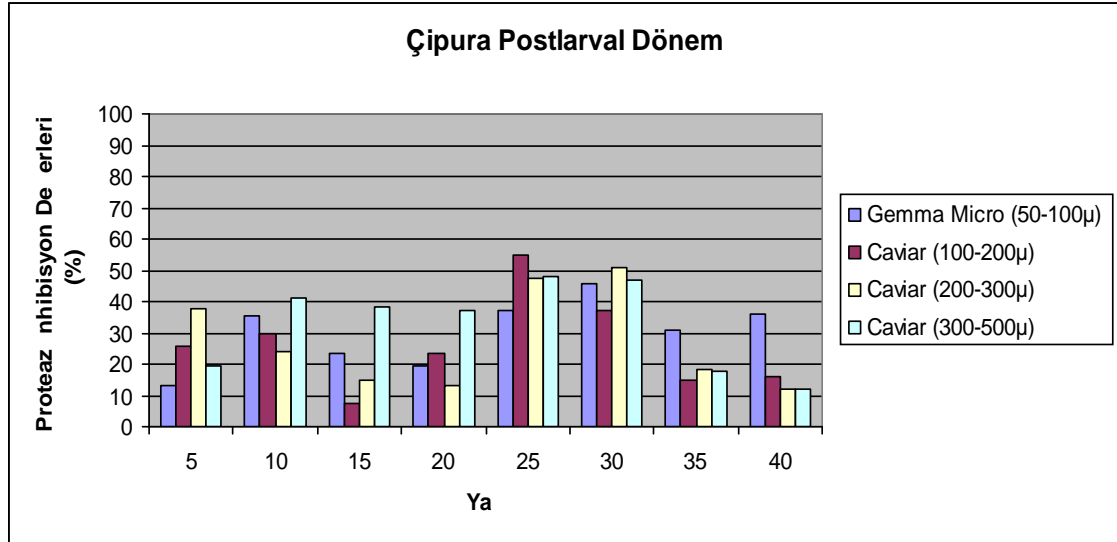
Balık larvalarında toplam spesifik enzim aktivitesinin hem doku a ırlı ında hem de doku proteinlerinin her gramında ki enzim aktivitesinde gözlenen artı tan dolayı ya a ba lı olarak artı gösterdi i birçok ara tırcı tarafından bildirilmi tir (Martinez ve ark. 1999; Ribeiro ve ark. 1999; Zambonino Infante ve Cahu, 2001). Ara tırcılar aynı zamanda, spesifik enzim aktivitesindeki azalmaların, enzim sentezinde bir azalmadan kaynaklanmadı nı, daha çok doku proteinlerindeki artı nın bir sonucu oldu unu ortaya koymu lardır. Zambonino Infante ve Cahu (1994b) tarafından yapılan çalı mada sindirim enzimlerinin yem de i imine ba lı olarak de i im gösterdi i belirlenmi tir. Perez ve ark. (1996), amilaz aktivitesinin 18. günden sonra yemlerin karbonhidrat içeri inin artı na paralel olarak arttı nı, 35. günde ise yemlerin protein içeri indeki artı a paralel olarak tripsin aktivitesinin de arttı nı bildirmi lerdir. Naz (2007), yaptı ı çalı mada çipura larvalarında tripsinin besinsel adaptasyonunu kontrol eden mekanizmanın 36. güne kadar etkin olmadı nı bildirmi tir. Pankreatik ve ba ırsak enzim aktivitelerinin ilk beslemenin ba langıcında genelde dü ük oldu u görölmektedir. Sindirim sisteminin geli imiyle birlikte, larvalar yeterli miktarda gıda ile beslenebiliyorlarsa enzim sentezinde artma e iliminin olaca ı bildirilmi tir (Hoehne-Reitan ve ark., 2001a,b). Enzim salgısı miktarının larvanın yem alım miktarına ve yem formülasyonunda kullanılan hammaddelere ba ımlı oldu una dikkat çekilmi tir (Zambonino Infante ve Cahu, 2001).

Çipura larvalarının prelarval (0-4. gün) ve postlarval dönemleri (5-40. gün) arasındaki proteaz aktivitesindeki dalgalanmaların;

- Doku protein konsantrasyonlarındaki de i ikliklerinden,
- Postlarval dönemde sindirim sisteminin geli iminin bir sonucu olarak ticari besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlere kar ı vermi oldu u tepkilerden,
- Ticari besleme programında kullanılan canlı ve mikroyemlerin biyokimyasal kompozisyonlarına vermi oldu u tepkilerden,
- Ticari besleme programındaki mikroyemlerin rasyonlarında kullanılan yem hammaddelerine kar ı göstermi oldu u tepkilerden,
- Naz (2007)'de belirtilen kolesistokin (CCK)-tripsin ili kisi, mevcut çalı mada ki 25. günden sonra ki proteaz aktivitelerinde gözlenen artı ları desteklemektedir.

## 4.2. Mikroyemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

Mevcut çalı manın ticari besleme prosedüründe larvaların sörvaj tankına alınması ile birlikte kullanılan yemler Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ )'dır. Ticari besleme prosedürlerinde yaygın olarak kullanılan Caviar (200-300 $\mu$ ) ve Caviar (300-500 $\mu$ ) mikroyemleri de bu çalı ma kapsamında test edilmiştir ( ekil 4.3). Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) en dü ük inhibisyon yüzdesini 5. günde % 13,17 olarak göstermiştir. 10. ve 15. günlerde %29,99 ve %7,67'lik inhibisyon değerleri ile Caviar (100-200 $\mu$ )'ın, Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'ya göre üstün olduğunu dikkat çekmektedir. 20. ve 25. günlerde sırasıyla % 19,59 ve % 37,28'lik inhibisyon yüzdesiyle Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun, Caviar (100-200 $\mu$ )'dan daha iyi bir yem olduğunu gözlenmektedir. 30., 35. ve 40. günlerde sırasıyla % 36,93, % 14,62 ve % 16,18'lik inhibisyon yüzdeleriyle Caviar (100-200 $\mu$ )'ın Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'ya göre daha iyi bir performans sergiledi i tespit edilmiştir.



ekil 4.3. Mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon De erleri (%)

Di er taraftan 10. ve 20. günlerde Caviar (200-300 $\mu$ )'ın sırasıyla % 23,78 ve % 12,87'lik inhibisyon yüzdeleriyle, Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ )'dan daha iyi bir performans sergiledi i görülmü tür. 30., 35. ve 40. günlerde sırasıyla %

36,93, % 14,62 ve % 16,18'lik inhibisyon yüzdeleriyle iyi bir performans sergileyen Caviar (100-200 $\mu$ )'a yakın inhibisyon yüzdeleri, 35. ve 40. günlerde Caviar (200-300 $\mu$ ) ve Caviar (300-500 $\mu$ )'dan elde edilmiştir.

Deniz balı larvalarının besinsel problemlerini çözmek için, larvaların beslenmesinde potansiyel olarak kullanılacak yem hammaddelerinin inhibisyon etkilerinin incelenmesi kadar, üretilen yemlerin larvaların sindirim sistemi üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalarında önemi oldukça fazladır. İmkiye kadar yapılan çalışmalarda deniz balı larvalarının sindirim enzimlerinin fonksiyonel özellikleri, biyokimyasal karakteristikleri tanımlanmıştır (Alarcon ve ark., 1998; Perez-Jimenez ve ark., 2009). Ara tırcılar, çipura larvaları ve karideslerin proteaz aktiviteleri üzerine mikroyemlerin üretiminde kullanılabilen bazı yem hammaddelerinin (ovalbumin, hemoglobin, sübye unu, kazein) inhibisyon etkileri hakkında bilgi vermiştir (Alarcon ve ark., 1997; Alarcon ve ark., 1999; El-Sayed ve ark., 2000).

Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ ) arasında gözlenen bu farklılıkların, bu yemlerin üretimlerinde kullanılan hammaddelerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Alarcon ve ark. (1999), mikroyemlerin balık larvaları tarafından sınırlı faydalanmasının yem hammaddelerinin larvaların proteaz aktivitelerini kısmi inhibisyonuyla ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Alarcon ve ark. (1999), 8 günlük çipura larvalarında mevcut proteaz aktivitesinin % 60'dan fazlasını ovalbuminin inhibe ettiğini rapor etmiştir. Alarcon ve ark. (1997), ovalbumin içeren ticari olarak üretilen mikroyemler karides proteazları üzerinde test edildiğinde de benzer sonuçlar almışlardır. Kolkovski ve Tandler (2000), çipura larvalarının yemlerinde % 50'den daha fazla kalamar hidrolizati kullanıldığında büyümede azalma olduğunu belirlemiştir. Diğer taraftan, Alarcon ve ark. (1999), sübye ununun 8 günlük çipura larvalarının proteaz aktivitesini etkilemediğini, mikroyemlerin hazırlanmasında iyi bir aday olabileceğini göstermiştir. Moyano ve ark. (1999), çipura proteaz aktivitesinin soya ununda bulunan proteaz inhibitörüne karşı çok hassas olduğunu rapor etmiştir. El-Sayed ve ark. (2000), tilapya'nın toplam proteaz aktivitesi üzerine soya ununun % 60'dan daha yüksek oranlarda inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

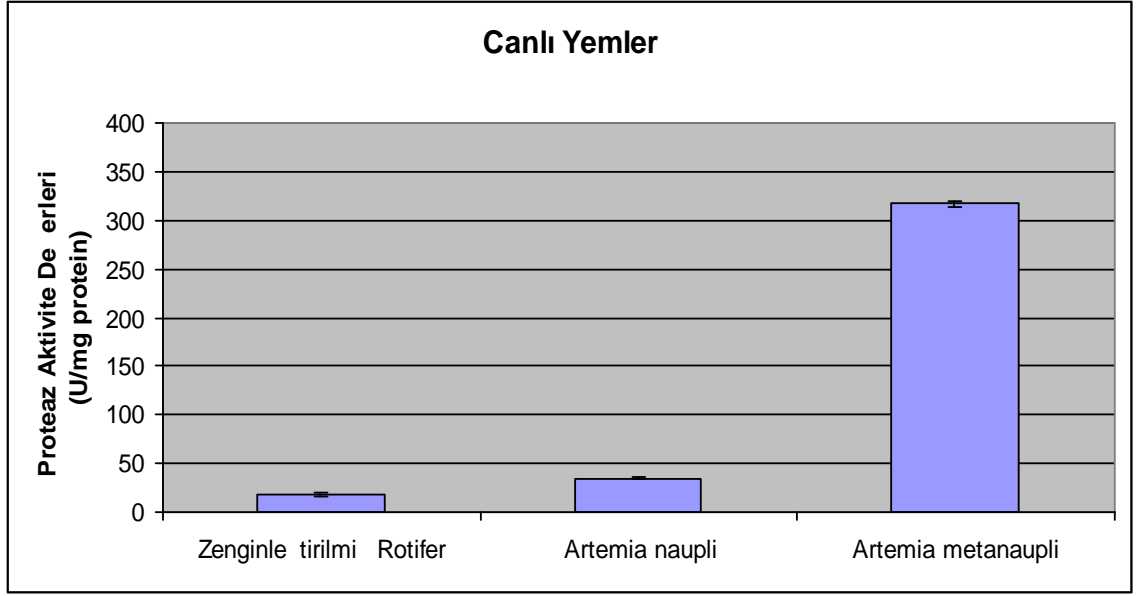
Bilindiği üzere larvaların farklı dönemler farklı besinsel talepleri olmaktadır. Besin gereksinimlerini karşılayabilen yemlerle beslendikleri zaman bu memnuniyetlerini fizyolojik olarak gösterebilmektedirler. Yukarıda Gemma Micro

(50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ ) için verilmi olan % de erler larvaların sunulan yemlerden memnuniyetsizliklerinin göstergesidir. Bu de erler ticari besleme prosedürü esnasında çipura larvalarının vermi oldukları stres tepkileri ile birlikte de erlendirildi inde, Gemma Micro (50-100 $\mu$ )’nun çipura larvalarına sörvaj döneminin ba langıcında (25. gün) *Artemia* metanaupli ile birlikte verildi i, bu dönemde çipura larvalarının fizyolojik stres tepkilerinden kortizol de erlerinde istatistiksel olarak bir de i im gözlenmedi i, 30. günde de yine *Artemia* metanaupli ile birlikte verildi inde kortizol de erinde dü ü gözlenmesine ra men bunun istatistiksel açıdan önemli olmadı ı belirlenmi tir. *Artemia* metanauplinin verilmedi i (35. günde), Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ile Caviar (100-200 $\mu$ )’ın birlikte verildi i durumda da kortizol de erlerinde dü me gözlenmi tir fakat bu durum istatistiksel olarak önemli bulunmamı tir. Buna kar ılık Caviar (100-200 $\mu$ )’ın yalnız verildi i 40. günde kortizol de erlerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir yükselme gözlenmi tir.

Bu veriler, Gemma Micro (50-100 $\mu$ )’nun daha dü ük inhibisyon gösterdi i ticari besleme prosedüründeki *Artemia* naupli’nin giri inden itibaren kullanımının bir risk olu turmayaca ına, buna kar ılık sindirim sistemi fonksiyonel olmu 40. gündeki çipura larvalarına yalnız sunuldu unda, Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ile birlikte sunulduklarından daha yüksek bir fizyolojik stres tepkisine (kortizol) yol açan Caviar (100-200 $\mu$ )’ın ise daha erken dönemlerde kullanımının riskli olaca ına i aret etmektedir.

### 4.3. Canlı Yemlerin Proteaz Aktiviteleri

Ticari besleme prosedüründe 20. güne kadar yalnız, 25. gün sonrasında mikroyemlerle birlikte 30. gününe kadar kullanılan canlı yemlerin (zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) proteaz aktivitelerinde gözlenen de i imler ekil 4.4’de verilmi tir. Canlı yemlerin proteaz aktiviteleri istatistiksel açıdan de erlendirildi in de, ortalamalar arasındaki farklılıkların önemli oldu u belirlenmi tir ( $p<0,05$ ). En dü ük proteaz aktivitesini zenginle tirilmi rotifer (17,98 $\pm$ 2,82 U/mg protein) göstermi tir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli’nin proteaz aktivite de erleri sırasıyla 34,67 $\pm$ 0,88 U/mg protein ve 317,16 $\pm$ 2,67 U/mg protein ekinde belirlenmi tir.



ekil 4.4. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz aktivitelerinde gözlenen değerler

Rotiferler (*Branchionus plicatilis*) ve *Artemia* naupli'leri dünyada ticari bir potansiyele sahip deniz balıklarının larval dönemlerinde canlı gıda kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu yemler larva yetiştiriciliğinde vazgeçilmez gibi görünse de, günümüzde, bu tür canlı yemlerin yoğun üretimleri için laboratuvar ve enerji yatırımlarının çok yüksek olması ve besinsel kompozisyonlarının sabit tutulamaması gibi nedenlerden dolayı larva yetiştiriciliğinde mikro yemlere geçiş hızlandırmak için çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir (Roselund ve ark., 1997). Aynı zamanda *Artemia*'nında doğal populasyonlarının azalması ve buna bağlı olarak fiyatlarında gözlenen artış yükselmeleri bu geçişin su ürünleri yetiştiriciliğinin devamlılığı açısından oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Naz ve ark. (2011), tarafından yürütülen bir çalışmada *Artemia* metanaupli, *Artemia* naupli, zenginleştirilmiş rotifer ve rotiferin proteaz aktiviteleri sırasıyla  $481,31 \pm 22,10$  U/mg protein,  $253,48 \pm 6,54$  U/mg protein,  $139,42 \pm 18,38$  U/mg protein,  $114,26 \pm 20,19$  U/mg protein olarak bulunmuştur. Rotifer ve zenginleştirilmiş rotifer arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). Buna karşılık *Artemia* metanaupli, *Artemia* naupli ve rotifer grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). *Artemia* grubunda gözlenen proteaz aktivitesinin, rotifer grubuna göre daha yüksek olduğu ve bu farkların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Mevcut çalışmada, zenginleştirilmiş rotifer,

*Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin proteaz aktiviteleri sırasıyla  $17,98 \pm 2,82$  U/mg protein,  $34,67 \pm 0,88$  U/mg protein,  $317,16 \pm 2,67$  U/mg protein olarak bulunmu tur. Canlı yem grupları arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmi tir ( $p < 0,05$ ). Naz ve ark. (2011), tarafından yapılmı olan çalı mada elde edilen canlı yemlerin proteaz aktivite de erleri ile mevcut çalı mada elde edilen de erler arasında farklılıklar bulunmu tur.

Toplam spesifik enzim aktivitesinin balık larvalarında hem doku a ırlı nda hem de doku proteinlerinin her gramında ki enzim aktivitesinde gözlenen artı tan dolayı ya a ba lı olarak artı gösterdi i bildirilmi tir (Martinez ve ark. 1999; Ribeiro ve ark. 1999; Zambonino Infante ve Cahu, 2001). *Artemia*'nın sindirilebilirli i *Artemia*'nın ya ıyla, balı ın türü ve ya ıyla de i kenlik gösterebilir. *Artemia*'nın çıkı tan 12 saate kadar (Instar II metanaupli) sindirim sistemi açık olmayıp, *Artemia*'dan larvalara dı sal sindirim enzimlerinin giri inin sınırlı oldu u görülür. Bu durum *Artemia*'yı bazı deniz balıklarının erken dönemleri için daha az sindirilebilir yapmaktadır. Bu dönemden sonra, *Artemia*'nın sindirim enzimlerinde çıkı ta gözlenen miktarının yakla ık 5 katı kadar artı görölmektedir (Pan ve ark., 1991). Di er taraftan dekapsüle edilmi *Artemia* yumurtalarının sindirilebilirlik açısından dirençli oldu u bildirilmi tir (Dendinos ve Thorpe, 1987).

Bu konudaki mevcut literatürler, *Artemia* metanaupli ve *Artemia* naupli arasındaki proteaz aktivitelerindeki farklılıkların geli im dönemlerinden kaynaklanabilece i görü ünü desteklemektedir. Geli imsel dönemlerin etkisinin dı nda, *Artemia*'nın biyokimyasal kompozisyonları üzerine global iklimsel de i imlerin etkisi oldu u bilinmektedir. Global iklimsel de i imlerin *Artemia*'nın enzimatik aktiviteleri üzerindeki etkilerinin de ara tırılması gerekmektedir. Rotifer grubunda bu enzimatik de i imler üzerinde besleme ve zenginle tirme i lemlerinin etkili olabilece i tahmin edilmektedir.

#### **4.4. Canlı Yemlerin Çipura Larvalarının Proteaz Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri**

Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin (zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli), çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde (sadece 10. gün) zenginle tirilmi rotifer dı nda pozitif katkısı oldu u belirlenmi tir

( ekil 4.5). 10. günde zenginle tirilmi rotiferin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde % 15,19'luk bir inhibisyona neden oldu u tespit edilmi tir.

5. gün ve 40. gün arasında protein kayna ı olarak rotifer dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 11,78, 25. günde % 81,92 olarak gözlenmi tir. Rotiferin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip oldu u 25. günde en yüksek katkıyı sa ladı ı gözlenmi tir.

5. gün ve 40. gün arasında protein kayna ı olarak *Artemia* naupli dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 29,95, 5. günde % 145,13 olarak gözlenmi tir. *Artemia* naupli'nin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip oldu u 25. günde % 122,59 gibi bir katkı sa ladı ı bulunu tur.

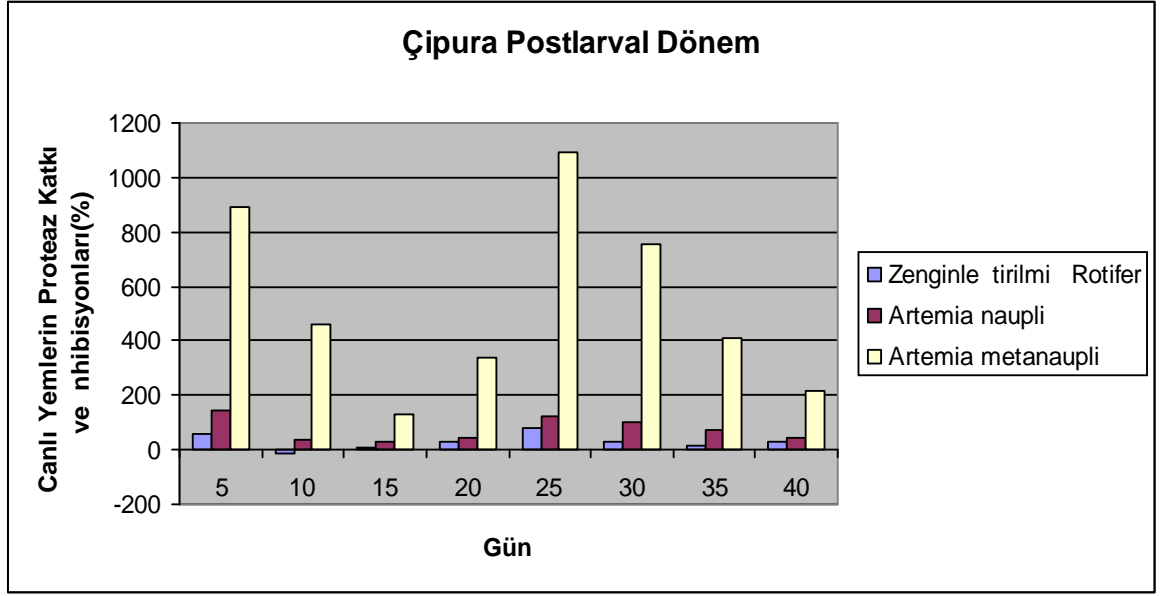
5. gün ve 40. gün arasında protein kayna ı olarak *Artemia* metanaupli dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 130,66, 25. günde % 1093,22 olarak tespit edilmi tir. *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip oldu u 25. günde en yüksek katkıyı sa ladı ı gözlenmi tir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerine olan pozitif katkı oranlarındaki dalgalanmaların benzer oldu u, *Artemia* metanauplinin hem rotifer hem de *Artemia* naupli'den daha yüksek katkı sa ladı ı gözlemlenmi tir.

Canlı yemlerin (zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli), çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde pozitif katkılarının oldu u tespit edildikten sonra, canlı yemlerin bireysel katkıları ve inhibisyon yüzdeleri hesaplanarak ekil 4.6'da verilmi tir.

Canlı yemlerin, çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde sadece 10. gün zenginle tirilmi rotifer dı ında pozitif bireysel katkısı oldu u belirlenmi tir. 10. günde zenginle tirilmi her bir rotiferin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerinde % 0,006 'lık bir inhibisyona neden oldu u tespit edilmi tir.

5. gün ve 40. gün arasında protein kayna ı olarak rotifer dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,005, 25. günde % 0,034 olarak gözlenmi tir. Rotiferin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip oldu u 25. günde en yüksek bireysel katkıyı sa ladı ı gözlenmi tir.



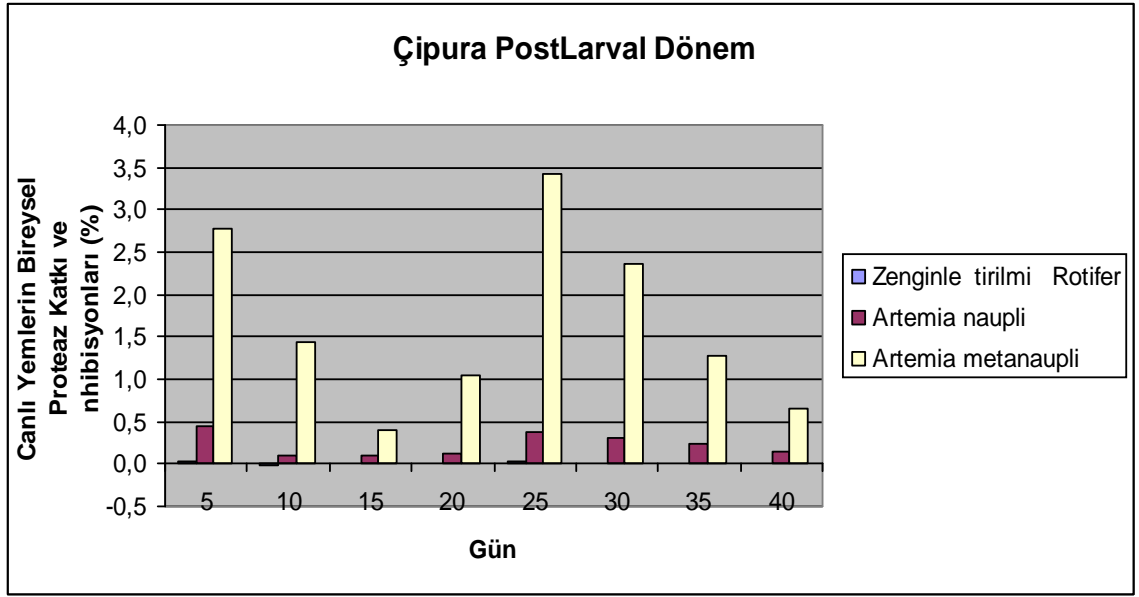


ekil 4.5. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin proteaz katkı ve inhibisyonları

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* naupli dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,094, 5. günde % 0,454 olarak gözlenmiştir. *Artemia* naupli'nin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde % 0,383 gibi bir bireysel proteaz katkı sağladığı bulunmuştur.

5. gün ve 40. gün arasında protein kaynağı olarak *Artemia* metanaupli dü ünüldü ünde, en dü ük ve en yüksek bireysel proteaz katkı oranları sırasıyla 15. günde % 0,408, 25. günde % 3,416 olarak tespit edilmiştir. *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının en dü ük proteaz aktivitesine sahip olduğu 25. günde en yüksek bireysel katkıyı sağladığı gözlenmiştir. *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerine olan pozitif katkı oranlarındaki dalgalanmaların benzer olduğu, *Artemia* metanauplinin hem rotifer hem de *Artemia* naupli'den daha yüksek bireysel katkı sağladığı gözlemlenmiştir.

Larvaların beslenmesinde *Artemia* ve mikro yemlerin beraber kullanımı sırasında dolaylı olarak kimyasal ve görsel uyarım ile *Artemia*'nın sindirim enzimi katkısının mikro yemlerin sindiriminde etkili olduğu bildirilmiştir (Kolkovski ve ark., 1993). Ara tırcılar, deniz balıkları larvalarında mikro yemlerin performansının, canlı yemlerle birlikte kullanıldıkları zaman arttığını ortaya koymuşlardır (Cahu ve Zambonino Infante., 2001; Koven ve ark., 2001).



ekil 4.6. Ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı yemlerin bireysel proteaz katkı ve inhibisyonları

İmdiye kadar yürütülen çalışmalar, canlı yemlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan balık larvalarının sindirimine katkı sağladığını, aynı zamanda larvalara mikroyemlerle beraber verildikleri zaman mikro yemlerin sindirilebilirliğini önemli ölçüde düzenlediğini göstermektedir. Türler arasında sindirim sisteminin gelişimlerinde gözlenen farklılıklardan dolayı canlı yemlerin katkı oranları konusunda imdiye kadar yapılan çalışmalarda net bir değerlendirilme ortaya konamamıştır. Sindirim sistemi larval dönemde iyi gelişen larvalar için canlı yemlerin düşük bir enzimsel katkısından bahsedilirken, ilkel bir sindirim sistemine sahip bir larva için canlı yemlerin enzimsel katkısının hayati önem taşıdığı konusunda bir fikir birliği ortaya çıkmıştır.

Canlı gıdaların ringa (*Clupea harengus*) larvalarında dışsal tripsin salgısına ilaveten içsel tripsin salgısının da artımda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Pedersen ve Hjelmeland, 1987). Munilla-Moran ve ark. (1990), 3 günlük kalkan balığının sindirim enzimlerine canlı yemlerin katkılarını, % 15-27 amilaz, % 43-60 proteaz ve % 89-94 esteraz şeklinde bildirmişlerdir. Kurokawa ve ark. (1998), yaptıkları bir çalışmada rotiferlerin balık larvalarına proteaz katkısının % 0,6 olduğunu bildirmişlerdir. Garcia-Ortega ve ark. (2000), tarafından yapılan bir çalışmada dekapüle edilmiş *Artemia* yumurtalarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerine % 1'den daha az bir katkı yaptığı, buna benzer düşük katkı oranlarının levrek larvalarında

(Zambonino Infante ve Cahu, 1994a) ve çipura larvalarında (Moyano ve ark., 1996) gözlemlendiği bildirilmiştir. Cahu ve Zambonino Infante (1995a), *Artemia* katkısının % 5 olduğu bildirilmiştir.

Canlı yemlerin sahip olduğu enzimlerin, sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvalarda sindirime yardımcı olduğu bilinmektedir. Karabalık (*Clarias gariepinus*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi bazı balıkların larval dönemde gerekli sindirim yeteneğine sahip olduklarından dolayı bir gıdanın sindirimi için canlı gıdadan gelen proteazlara ihtiyaç duymadıkları bildirilmiştir (Verreth ve ark., 1992; Zambonino Infante ve Cahu, 1994a; Moyano ve ark., 1996).

Warner ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada, *Artemia* yumurtalarındaki proteazlarının çoğunun sistin proteaz grubundan olduğu, bu proteaz sınıfının alkalik pH'da aktif olmadıklarını bildirmişlerdir (Warner ve Shridhar, 1985). Garcia-Ortega ve ark. (1998), dekapsüle edilmiş *Artemia* yumurtaları ile yeni çıkmış *Artemia* naupli arasında da besinsel kompozisyon ve enzimsel aktivite arasında çok önemli farklılıkların olmayacağını bildirmişlerdir. Naz ve ark. (2011), *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli arasında enzimsel farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

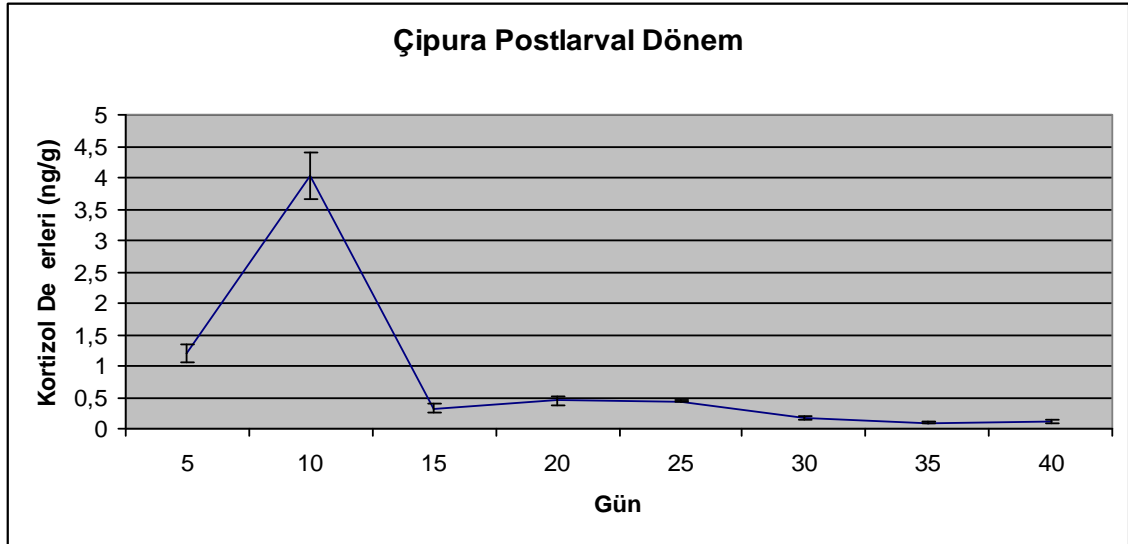
Canlı yemlerin larvaların proteaz aktiviteleri üzerindeki katkı oranları konusunda çok farklı değerler bildirilmiş olup, bu konuda bir netlik henüz sağlanamamıştır. Bu konuda literatürde verilen değerlerin farklı olmasına rağmen, canlı yemlerin sindirim sistemi tam olarak fonksiyonel olmayan larvaların kritik dönemlerinde önemli bir katkı sağladıkları konusunda fikir birliğinin ortaya çıktığı söylenebilir. Mevcut çalışmaların sonuçlarında bu katkının olduğu desteklenmektedir. Bu katkı oranlarının;

- Tür içi ve türler arasındaki sindirim sisteminin gelişiminde gözlenen farklılıklara göre,
- Beslenme programında kullanılan yemlerin proteaz aktiviteleri üzerindeki etkilerine göre,
- Rotiferlerin beslenmesi ve zenginleştirilmesi esnasındaki değişimlere göre,
- *Artemia*'nın gelişim dönemlerine göre,
- *Artemia*'nın tipine göre,
- *Artemia*'nın global iklimsel değişimlerden etkilenme derecesine göre değerlendirilmelidir.

#### 4.5. Kortizol Analizi

Bu çalı mada, ticari besleme prosedürünün çipura larvalarının 5. günden 40. güne kadar her 5 günlük dönemdeki kortizol seviyelerinin de i imleri belirlenmi tir ( ekil 4.7). Özellikle ticari besleme prosedürü esnasında kullanılan canlı yemlerin (zenginle tirilmi Rotifer, *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli) ve mikroyemlerin (Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ )), çipura larvaları üzerindeki etkileri belirlenmeye çalı ılmı tir. Çalı ma sonunda elde edilen kortizol de erleri istatistiksel olarak de erlendirildi inde 35. gün, 40. gün, 30. gün, 15. gün, 25. gün ve 20. gün kortizol de erlerinin istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olmadı ı bulunmu tur ( $p>0,05$ ). Buna kar ılık 5. gün ve 10. güne ait çipura larva kortizol de erlerinin birbirlerinden ve di er ya gruplarından istatistiksel olarak önemli farklılıklara sahip oldu u tespit edilmi tir ( $p<0,05$ ). En dü ük ve en yüksek kortizol seviyeleri sırasıyla 35. günde  $0,099\pm 0,009$  ng/g ve 10. günde  $4,033\pm 0,38$  ng/g olarak belirlenmi tir.

Çalı mada elde edilen kortizol de erleri incelendi inde, prelarval dönemden postlarval döneme yüksek bir kortizol geçi inin oldu u gözlenmektedir ( $1,199\pm 0,15$  ng/g). Bu kortizol de erini etkileyen faktörler; a ız açılımı gerçekte mi olan çipura larvalarının ilk yem alma gayretleri ve alınan yemin besin gereksinimleri kar ılayabilme potansiyelinin olup olmamasıdır.



ekil 4.7. Çipura larvalarının 5. günden ve 40. güne kadar olan her be günlük dönemdeki kortizol seviyeleri

A ız açılımının gerçekte mesiyle birlikte postlarvalara canlı yem olarak zenginle tirilmi rotifer verilmektedir. Zenginle tirilmi rotiferin çipura larvaları üzerinde 5. günde pozitif yönde bir proteaz katkısı oldu u gözlenmektedir. Buna kar ılık 10. günde zenginle tirilmi rotiferin çipura larvalarının proteaz aktivitesini negatif yönde etkiledi i gözlenmektedir. Zaten 5. günde tüm çalı ma periyoduna göre yüksek bir kortizol de erine sahip olan çipura larvalarının, besin olarak verilmi olan zenginle tirilmi rotiferinde proteaz aktivitesini negatif yönde etkilemesiyle birlikte kortizol de eri çalı ma esnasında kaydedilen en yüksek de ere ula mı tır ( $4,033\pm 0,38$  ng/g).

10. günden sonra larvanın sindirim sisteminin geli imi ve ortama *Artemia* nauplinin giri i ile birlikte kortizol seviyelerinde önemli dü ü ler kaydedilmi tir. 15. günde kortizol seviyeleri, 10. günde gözlenen yüksek kortizol de erlerinden  $0,321\pm 0,065$  ng/g de erine kadar dü mü tür. Bu dü ü te etkili olan faktörleri, çipura larvalarının proteaz aktivitelerindeki artı ve *Artemia* naupli'nin hem besinsel hem de proteaz katkısı bakımından rotiferden yüksek olması eklinde sıralamak mümkündür.

15. günden 20. güne geçerken kortizol de erlerinde istatistiksel olarak önemli olmayan ( $p>0,05$ ) bir yükselme gözlenmi tir. Bu yükselmede etkili olan faktörleri, çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen dü ü ve bu dü ü ün istatistiksel açıdan önemli olmasını engelleyen hem besin de eri hem de proteaz katkısı yüksek olan *Artemia* metanaupli'nin giri i eklinde sıralamak mümkündür.

25. günde çipura larvaları en dü ü k proteaz aktivitesine sahip olmasına ra men 20. günden 25. güne geçi te kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmemi tir ( $p>0,05$ ). Bu a amada etkili olan faktörün, hem besin de eri hem de proteaz katkısı yüksek olan *Artemia* metanaupli'nin giri i oldu u görülmektedir. *Artemia* metanaupli ile birlikte girilen Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun % 37,28'lik bir inhibisyon yaratmasının ve çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen dü ü ün, kortizol seviyeleri üzerinde önemli de i iklik yaratmadı ı tespit edilmi tir.

25. günden, 30. güne geçi te kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir dü ü gözlenmi tir. Bu dönemde Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun % 45,58'lik bir inhibisyon yaratmasına kar ılık, *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısının ve çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde gözlenen artı ı kortizol de erinin dü ü ünde etkili faktör olarak sıralamak mümkündür.

30. günden sonra çipura larvalarının proteaz aktiviteleri sürekli bir yükselme e iliminde olmu tur. 30. günden 35. güne geçi te kortizol seviyelerinde dü ü gözlenmi tir. Canlı yemlerin verilmemesine ra men, Gemma Micro (50-100µ)'nun % 30,95'lik inhibisyon ve Caviar (100-200µ)'ın % 14,62 lik bir inhibisyon yaratması kortizol de erlerinin yükselmesine neden olmamı tır. Bu dönemde elde edilen veriler üzerinde çipura larvalarının yüksek proteaz aktivitelerinin en önemli faktör oldu u görülmektedir.

35. günden 40. güne geçi te kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir artı gözlenmi tir. Çipura larvalarının proteaz aktivitesi ve gücünün artmasına ra men bu a ama larvalara sadece Caviar (100-200µ)'ın verilmi olmasından kaynaklı bir stres cevabının etkisi oldu u görülmektedir.

Salmonid balıkların ilk kortikosteroid stres cevabını su sıcaklı ına ba lı olarak kuluçka döneminin ikinci ve be inci haftalarında gösterdikleri bildirilmi tir (Pottinger ve Mosuwe, 1994). Balıklarda yumurta çıkı ı öncesi tiroid ve kortizol hormonlarının bulundu u tespit edilmi tir. Bu hormonların fonksiyonel tiroid dokusu ve böbrekarası hücreler embryogenesiste geli medi i için anaç orjinli oldu u bildirilmi tir (Mylonas ve ark., 1994; Berry ve ark., 1995; Szisch ve ark., 2005). Bayrak (2013), gökku a ı alabalı ının stoklama oranları ve refahı üzerine yaptıkları çalı mada artan kortizol konsantrasyonlarının üreme hormonlarını baskıladı nı böylece oogenez ve spermatogenezi olumsuz etkileyerek gamet kalitelerini dü ürdü ünü bildirmi lerdir. Mevcut çalı mada da prelarval dönemlerde kortizol de erlerine rastlanılması, sonuçların literatürler tarafından desteklendi ini göstermektedir.

Szisch ve ark. (2005), çipura larvaları üzerine yaptıkları çalı mada, kortizol de erini yumurtada  $0,83\pm 0,02$  ng/g, ilk beslemede  $3,40\pm 0,19$  ng/g olarak belirlemi lerdir. Bu a amadan sonra kortizol de erlerinde sürekli bir artı gözlendi i, çıkı tan sonraki 23. günde  $7,38\pm 1,16$  ng/g, 29. günde  $7,53\pm 0,96$  ng/g ve 45. günde  $14,55\pm 2,82$  ng/g de erlerine ula ıldı ı bildirilmi tir. Mevcut çalı mada, ilk beslemede kortizol de eri  $1,19\pm 0,15$  ng/g, 25. günde  $0,43\pm 0,02$  ng/g, 30. günde  $0,16\pm 0,02$  ng/g ve 40. günde  $0,12\pm 0,03$  ng/g olarak bulunmu tur.

Çalı madan elde edilen kortizol de erleri, Szisch ve ark. (2005), tarafından bulunan kortizol de erlerine göre daha dü ük seviyelerdedir. Bu durum anaç besleme, prelarval dönem abiyotik faktörler ve postlarval besleme konularında sektörün son 10

yılda ama kaydetti ini göstermektedir. Bu geli meye kar ılık, larvalar üzerindeki anaç orijinli kortizol katkıları konusunda eksikliklerin giderilmesi, bilhassa postlarval dönemin ba langıcından itibaren ilk 10 günlük dönemdeki beslemeye ba lı eksikliklerin giderilmesi, kitle halinde larval ölümlerin önlenmesinde etkili olacaktır.

Çalı ma sonuçlarından da görülece i gibi prelarval dönemden yüksek bir stres yükü ile çıkmı çipura postlarvalarının, proteaz katkısı ve besin de eri dü ük bir canlı yemle beslemenin sonuçları 10. gün kortizol de erlerinde kendini göstermektedir. Çipura larvalarında yüksek ölümlerin bu a amalarda gerçekleşti i bilinmektedir. Prelarval dönemde stres sadece abiyotik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Prelarvalar anaçlardan gelen kortizol yükünü bu dönemde abiyotik artlar optimum tutulabildi i sürece tamamen postlarval döneme ta ımakta, bu dönemde de sindirim sisteminin az geli mi olması, sunulan canlı yemin proteaz katkısının ve besin de erlerinin dü ük olması gibi faktörler mevcut stres yükünü azaltmak yerine arttırmaktadır. Bu artan stres yükünü tolere edemeyen postlarvalarda kitlesel ölümler gerçekleşmektedir. Kitlesel ölümleri önlemek için;

- Anaçların strese girmesini önlemek için biyotik ve abiyotik faktörlere dikkat edilmelidir. Yani, anaçlardan prelarvalara geçen stres yükünü minimize etmek,
- Prelarval dönemde abiyotik artları optimum seviyelerde tutmak,
- Postlarval dönemde abiyotik artlarla birlikte, larvalara sunulan yemin besin kalitesine ve sindirim sistemi geli memi olan larvaların sindirim gücünü arttırabilmesine dikkat edilmelidir.

*Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde çipura larvalarının kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak önemli de i iklikler gözlenmemi tir ( $p>0,05$ ). *Artemia* naupli'nin zenginle tirilmi rotiferle besleme a amasından gelen stres yükünün azaltılmasında etkili oldu u dikkat çekmi tir ( $p<0,05$ ). *Artemia* naupli'nin bu stres yükünün azaltılmasında zenginle tirilmi rotifere göre besin kompozisyonunun ve yüksek proteaz katkısının etkili oldu u söylenebilir. *Artemia* metanaupli'de stres yükünün *Artemia* naupli'ye göre istatistiksel olarak önemli olmasa da daha dü ük seviyelere getirilmesinde etkili olmu tur ( $p<0,05$ ). *Artemia* metanaupli'nin çipura larvalarının stres yükünü daha dü ük seviyelere getirmesindeki

ba lıca etkenin proteaz katkısının *Artemia* naupli ve zenginle tirilmi rotiferden daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun çalı mada elde edilmi olan en yüksek inhibisyon de erinde (% 45,88) *Artemia* metanaupli ile birlikte verildi i zaman ıpuranın stres tepkisi üzerinde önemli bir etkisinin olmadı ı belirlenmi tir. Bu alı mada 25. günde verilmeye ba lanan Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısı ile birlikte, ıपुरa larvalarının proteaz aktivitelerinde dü ü ler görölmesine ra men iyi bir performans sergiledi i tespit edilmi tir. Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun yine *Artemia* metanaupli gibi ıपुरa larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde girilmesinin, mikroyemlere adaptasyonda etkili olabilece i görü ünü çalı ma sonuçları desteklemektedir. Buna kar ılıık Caviar (100-200 $\mu$ )'ın Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ile birlikte girilmesi önerilirken, tek ba ına 40. günden önce girilmesinin kortizol seviyeleri arttırma yönünde istatistiksel olarak önemli farklılıklar yaratma olasılı ı dikkat çekmektedir.



## 5. SONUÇ ve ÖNER LER

Ülkemiz ticari olarak üretimi yapılmakta olan deniz balıklarından çipura ve levrek üretimi konusunda Akdeniz ülkeleri arasında söz sahibi konumdadır. Dünya genelinde do al stoklarda meydana gelen azalmalardan dolayı avcılık üretiminin dü mesiyle birlikte, su ürünleri yeti tiricili inden elde edilecek üretimin önemi artmaktadır.

Su ürünleri yeti tiricili inin larval dönemlerinde rotifer ve *Artemia*'ya ihtiyaç duyuldu u bilinmektedir. Rotifer ve *Artemia* gibi canlı yemler konusunda dı a ba ımlı olu umuz, laboratuvar üretim maliyetlerinin yüksek olması, ülkemiz su ürünleri sektöründe faaliyet gösteren i letmecilerin dı pazarda rekabet gücünü azaltmaktadır. Bununla birlikte, *Artemia*'nın global iklimsel de i imlerden dolayı do al üretim alanlarındaki stoklarının azalması ve fiyatlarında gözlenen yükselmeler üretim maliyetlerini günden güne arttırmaktadır. *Artemia* stoklarının gelecekte su ürünleri yeti tiricili inin larval dönemlerinde istenen miktarı kar ılayamaması ihtimali, su ürünleri yeti tiricili inin sürdürülebilirli ini tehlikeye sokmaktadır. Ülkemizin dı pazarda rekabet gücünün artırılması ve su ürünleri yeti tiricili inin sürdürülebilirli ini sa lamak için, canlı yemlere olan ba ımlı ın en kısa zamanda ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu nedenle ara tırmacılar canlı yemleri ikame edebilecek mikroyemlerin üretimine yönelik çalı malar üzerinde yo unla mı lardır. imdiye kadar yürütülen çalı malardan elde edilen sonuçlar, canlı yemleri tam olarak ikame edebilecek ve larvaların besin gereksinimlerini tam olarak kar ılayabilen bir yemin üretimini sa layamamı tır.

Mikroyemlerin üretimi esnasında temel yem hammaddelerinden biri olan balık ununa baskı artmakta, yakın gelecekte su ürünleri yeti tiricilik sektörünün talebini kar ılamada yetersiz kalaca ı tahmin edilmektedir. Bu nedenle çalı malar balık ununu ikame edebilecek alternatif protein kaynakların bulunması yönünde yo unla mı tır. Larvaların besin gereksinimleri kar ılayabilen mikroyemlerin üretiminde, rasyonlarda kullanılacak yem hammaddelerinin seçimi, sa lıklı larvaların üretimi, ya aması ve iyi bir büyüme performansının elde edilmesi açısından büyük önem ta ımaktadır.

Mikroyemlerde kullanılan protein kaynaklarının larvaların proteaz aktiviteleri üzerinde olumsuz etkileri oldu u bilinmektedir. Buna kar ılıklı canlı yemlerin, sindirim sistemi tam olarak geli memi larvaların enzimsel aktiviteleri üzerine olan katkıları,

mikroyemlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Mikroyemlerde kullanılan yem hammaddelerinin doğru seçimi, doğru oranlarda kullanımı, yüksek bir performansa sahip bir yem hammaddesinin düşük bir performansa sahip yem hammaddesiyle birlikte kullanılmaması larva üretiminde başarıyı etkileyen temel unsurlardır. Protein kaynaklarının bireysel etkilerinin test edilmesi ve performansı yüksek olanların larva üretiminde başarı sağlayacağı düşünülebilir, nedenleri tespit edilemeyen kitlesel ölümlere neden olmaktadır. Protein kaynaklarının rasyonda bulunan diğer protein kaynaklarıyla birlikte hareket etmesi gözden kaçırılmamalıdır. Bu nedenle bireysel etkiler test edildikten sonra son ürün olan mikroyemlerinde ticari boyutta yetiştiricilikte kullanılmadan önce test edilmesi işletmelerin kitlesel ölümlere yönelik ekonomik kayıplarını önlemeleri açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada kapsamında, ticari besleme prosedüründe kullanılan canlı ve mikroyemlerin çipura larvalarının proteaz aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bu yemlerle beslenen larvaların üzerindeki fizyolojik stres seviyeleri de (kortizol) belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, prelarval dönemden postlarval döneme yüksek bir kortizol geçişinin olduğunu göstermektedir. Bu yüksek kortizol geçişine ilaveten ilk 10. günde rotifer gibi besin değeri ve enzim katkısı düşük olan bir canlı yemin kullanımı 10. günde kortizol seviyelerinin postlarval dönemin en yüksek seviyelerine çıkmasına neden olmuştur. 10. güne kadar olan kritik dönemi atlatabilmek için prelarval dönemden daha düşük bir kortizol geçişinin olması gerekmektedir. Prelarval dönemde abiyotik faktörler dışında stres faktörü bulunmadığı bilinmektedir. Abiyotik parametreler optimum seviyelerde tutulduğu takdirde postlarval döneme kortizol geçişinin en düşük seviyelerde olması, ancak anaçlardaki stresin düşürülmesiyle mümkündür. Anaçlardan yumurta ve prelarvalara aktarılan stresin düşük olması, postlarval aamaya daha düşük bir kortizol değeriyle geçişini sağlayacaktır. Buda kritik dönemdeki larvanın mukavemetini arttırabilecektir.

*Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile besleme dönemlerinde çipura larvalarının kortizol seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Çalışma sonuçları, *Artemia* naupli'nin zenginleştirilmiş rotiferle besleme amaçlarından gelen stres yükünün azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. *Artemia* metanaupli'de stres yükünün *Artemia* naupli'ye göre daha düşük seviyelere getirilmesinde etkili olmuştur.

Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun çalı mada elde edilmi olan en yüksek inhibisyon de erinde (% 45,88), *Artemia* metanaupli ile birlikte verildi i zaman çipura larvalarının kortizol de erleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadı ı belirlenmi tir. Bu çalı mada 25. günde verilmeye ba lanan Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun *Artemia* metanaupli'nin yüksek proteaz katkısı ile birlikte, çipura larvalarının proteaz aktivitelerinde dü ü ler görülmesine ra men iyi bir performans sergiledi i tespit edilmi tir.

### **Çalı ma sonuçları;**

- Zenginle tirilmi rotiferle beslemenin larvaların kortizol de erlerini arttırdı ını,
- Prelarvadan postlarvalara geçen stresin dü ü k olması ile dü ü k besin ve enzim katkısına sahip zenginle tirilmi rotiferle beslemenin yapıldı ı ilk 10 günlük kritik dönemin daha rahat bir ekilde geçirilece ini ve bu sayede kitlesel larval ölümlerin önlenebilece ini,
- *Artemia* naupli ve *Artemia* metanaupli ile beslemenin kortizol de erleri üzerinde önemli de i iklikler yaratmadı ını,
- *Artemia* metanaupli ile Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun birlikte kullanımının kortizol de erleri üzerinde önemli de i iklikler yaratmadı ını,
- Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun yine *Artemia* metanaupli gibi çipura larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde girilmesinin, mikroyemlere adaptasyonda etkili olabilece ini,
- Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ )'ın 35. günden sonra birlikte girilmesinin kortizol de erleri üzerinde önemli de i iklikler yaratmadı ını,
- Caviar (100-200 $\mu$ )'ın tek ba ına 40. günden önce girilmesinin kortizol de erlerini yükseltme e iliminde oldu unu göstermi tir.

### **Öneriler;**

- Anaçlardan, yumurta ve prelarvalara geçen stres yükünün minimize edilmesi,
- Prelarvalardan postlarvalara geçen stres yükünün optimum geli imi te vik eden abiyotik faktörlerin kültür ortamında sa lanması ile minimize edilmesi,
- *Artemia* metanaupli ile Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun birlikte kullanılabilece i,

- Gemma Micro (50-100 $\mu$ )'nun yine *Artemia* metanaupli gibi çipura larvaları üzerinde yüksek bir proteaz katkısına sahip olan *Artemia* naupli ile birlikte daha erken dönemlerde kullanılabilir i,
- Gemma Micro (50-100 $\mu$ ) ve Caviar (100-200 $\mu$ )'ın 35. günden sonra birlikte kullanılabilir i,
- Caviar (100-200 $\mu$ )'ın tek ba ına 40. günden önce kullanılmaması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akyurt, ., 2004. Balık Besleme. **Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitapları**, 3, p.226, Hatay.
- Alarcon, F.J., Diaz, M. ve Moyano, F.J., 1997. Studies of digestive enzymes in characterization ve practical applications. **Cahiers Options Mediterr.**, 22, p.113-121.
- Alarcon, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. ve Abellan, E., 1998. Characterization ve functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). **Fish Physiol. Biochem.**, 19: 257–267.
- Alarcon, F.J., Moyano, F.J., Diaz, M., Fernandez Diaz, C. ve Yufera, M., 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. **Aquaculture Nutrition**, 5: 107-113.
- Alderman, S.L. ve Bernier, N.J., 2009. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish, **Gen Comp Endocrinol.**, 164(1): 61-69.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal Pai Silva, M. ve Alves-Junior, R., 2001. Environmental Cadmium Exposure and Metabolic Responses of the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Environ. Pollut.**, 114(2): 169-175.
- Alpaz, A., 1996. Deniz Balıkları Yeti tiricili i. **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları**, 20, p.335, zmir.
- Altan, Ö., 1998. The Course of Master International Programme, Session of Larvae Culture, Spain.
- Anonymous, 2014. **The State of World Fisheries and Aquaculture yearbook**.
- Barton, B.A., Schreck, C.B. ve Barton, L.D., 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. **Disease of Aquatic Organisms**, 2: 173-185.
- Barton, B.A. ve Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, 1: 3–26.
- Bayrak, H., 2013. Gökku a ı Alabalı ı (*Onchorhynchus mykiss*) anaçlarında farklı stoklama oranları ve balık refahı arasındaki ili kinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Egirdir Su Ürünleri Fakültesi, **Su Ürünleri Yeti tiricili i Anabilim Dalı**, Isparta.
- Bentley, P.J., 1998. Comparative Vertebrate Endocrinology. **Cambridge Univ. Press**, 3rd edn, p.526, UK.
- Berry, T.P., Malison, J.A., Held, J.A. ve Parrish, J.J., 1995. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, 97: 57–65.
- Bisson, M. ve Hontela, A., 2002. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 180: 110-117.
- Björnsson, B. ve Olafsdottir, S.R., 2006. Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). **Ices Journal of Marine Science**, 63: 326-334.

- Blaxter, J. H. S., 1988. Pattern and variety of development. (W. S. Hoar ve D. J. Randall, Editors), In: **Fish physiology**, Acad. Press,1-58, N.Y.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248–254.
- Buddington, R.K, Krogdahl, A. ve Bakke-Mckellep, A.M.,1997. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiol. Scand.**,161: 67-80.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet:effect on digestive enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109: 213-222.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1995a. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. **Fish Physiology and Biochemistry**, 14: 209-214.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 1995b. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. **Fish Physiol Biochem.**, 14: 431-437.
- Cahu, C.L. ve Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, 200: 161-180.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Peres, A., Quazuguel, P. ve Le Gall, M.M., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. **Aquaculture**, 161: 479-489.
- Cano-Lopez, A., Simpson, B. ve Haard, N., 1987. Extraction of carotenoproteins from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. **Journal of Food Sciences**, 52, p.503-506.
- Caruso, G., Genovese, L., Maricchiolo, G. ve Modica, A., 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. **Aquaculture International**, 13, p.67-73.
- Chakrabarti, I., Gani, MdA., Chaki, K.K., Sur, R. ve Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol.**, 112: 167-177.
- Chey, W.Y., 1993. Hormonal control of pancreatic exocrine secretion. In the pancreas: Biology, Pathobiology and Disease. (Go,V.L.W., Gardner,J.D., Brooks, F.P., Lebenthal,E., DiMagno, E.P., Sheele, G.A., Editors), In: **The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease**,. Raven Press, p. 403-424, New York.
- Chou, R.L., Su, M.S. ve Chen, H.Y., 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, 193: 81-89.
- Chrousos, G.P. ve Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. **Journal of the American Medical Association**, 267: 1244-1252.
- Costas, B., Arago, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T. ve Conceicao, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. **Aquaculture Research**, 39, p.1-9.
- Çelikkale, M.S., Düzgüne , E. ve Okumu , ., 1999. Türkiye su ürünleri sektörü, potansiyeli, mevcut durumu ve çözüm önerileri. **istanbul Ticaret Odası Yayınları**, 2: 414.

- Davis, K.B. ve Parker, N.C., 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. **Transactions of the American Fisheries Society**, 115, p.495-499.
- Davis, K.B. ve Peterson, B.C., 2006. The effect of temperature, stress, and cortisol on plasma IGF-I and IGF-BPs in sunshine bass. **General and Comparative Endocrinology**, 149, p.219-225.
- Dendrinou, P. ve Thorpe, J.P., 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). **Aquaculture**, 61, p. 121-154.
- De Silva, S.S. ve Anderson, T.A., 1998. Fish Nutrition in Aquaculture., **Chapman and Hall**, p.319,Sulfolk.
- El-Sayed, AFM., Nmartinez, I. ve Moyano, F.J., 2000. Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. **Aquaculture International**, 8(5), p.403-415.
- Fernandez-Diaz, C. ve Yufera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* larvae fed microcapsules. **Aquaculture**, 153, p.93-102.
- Foo, J.T.W. ve Lam, T.J., 1993. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. **Aquaculture**, 115(1), p.133-143.
- Gamperl, AK., Vijayan, M.M. ve Boutilier, R.G., 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4, p.215-255.
- Garcia-Carreno, F.L., 1996. Proteinase inhibitors. **Trends Food Sci Technol.**, 7, p.197-204.
- Garcia-Ortega, A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A. ve Sorgeloos, P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. **Aquaculture**, 161, p.501-514.
- Garcia-Ortega, A., Verreth, J. ve Segner, H., 2000. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish *Clarias gariepinus* larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. **Fish Physiology and Biochemistry**, 22, p.237-244.
- Halver, J.E., 1989. Fish Nutrition, **Academic Press**, San Diego.
- Hidalgo MC., Urea, E. ve Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habitus. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, 170, p.267-83.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. ve Reitan K.I., 2001a. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. **J. Fish Biol.**, 58, p.746-754.
- Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. ve Gjellesvik D.R., 2001b. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. **J. Fish Biol.**, 58, p. 737-745.
- Holmgren, S., Vaillant, C. ve Dimaline, R., 1982. VIP-, substance P-, gastrin /CCK-, bombesin-, somatostatin- and glucagon- like immunoreactivities in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Cell Tissue Res.**, 223 (1), p.141-153.
- Holst, J.J. ve Schmidt, P., 1994. Gut hormones and intestinal function. **Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.**, 8(1), p.137-164.

- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. ve Ackerman, P.A., 1999. Heat shock proteins and physiological in fish. **Am. Zool.**, 39, p. 901-909.
- Johnson, E.O., Kamilaris, T.C., Chrousos, G.P. ve Gold, P.W., 1992. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioural homeostasis. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, 16, p.115-130.
- Jorgensen, T.R. ve Buchmann, K., 2007. Stress response in rainbow trout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, 37 (1), p.25-28.
- Kamisaka, Y., Kurokawa, T., Suzuki, T., Tagawa, M., Tanaka, M., Totland, G. ve Ronnestad, I., 2001. Ontogeny of cholecystokinin immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 123, p.31-37.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, W.G. ve Gertlez, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) larvae. **Fish Phys. and Biochem.**, 12(3), p.203-209.
- Kolkovski, S. ve Tandler, A., 1995. Why microdiets are still inadequate as viable alternative to live zooplankton for developing marine fish larvae. **Larvi'95 Fish and Shellfish Symposium**, 24, p.265-266.
- Kolkovski, S., Koven, W. ve Tandler, A., 1997a. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilisation of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, 155, p.193-205.
- Kolkovski, S., Arieli, A. ve Tandler, A., 1997b. Visual and Chemical cues stimuli microdiet ingestion in seabream larvae. **Aquaculture International**, 5, p.527-536.
- Kolkovski, S., Yackey, C., Czesny, S. ve Dabrowski, K., 2000. The effect of microdiet supplementation of dietary digestive enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. **North American Journal of Aquaculture**, 62, p.130-134.
- Kolkovski, S. ve Tandler, A., 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, 6, p.11-15.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E. ve Gamsiz, K.T.A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. **Aquaculture**, 194, p.107-121.
- Koven, W., Rojas-Garcia, C.R., Finn, R.N., Tandler, A. ve Ronnestad, I., 2002. The stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone, cholecystokinin (CCK) and the protease, trypsin, in first feeding herring larvae, *Clupea harengus*. **Marine Biology**, 140, p.1241-1247.
- Kumar, S., Srivastava, A. ve Chakrabarti, R., 2005. Study of digestive proteinases and proteinase inhibitors of *Daphnia carinata*. **Aquaculture**, 243, p.367-372
- Kurokawa, T., Shiraishi, M. ve Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanotictus* larvae. **Aquaculture**, 161, p.491-499
- Kurokawa, T., Suzuki, T. ve Andoh, T., 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 120 (1), p.8-16.
- Liddle, R.A., 1995. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. **Am. J. Physiol.**, 269, p.319-327.



- Liddle, R.A., 2000. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. **J. Gastroenterol.**,35, p.181-187.
- Luizi, FS., Gara, B., Shields, R.J. ve Bromage, N.R., 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. **Aquaculture**, 176(1-2), p.101-116.
- Lundstedt, LM., Melo, J.F.B., Santos Neto, C. ve Moraes, G., 2002. Diet influences proteolytic enzyme profile of the South American catfish *Rhamdia quelen*. **International Congress on the Biology of Fish, Biochemical and Physiological Advances in Finfish Aquaculture**, Vancouver, Canada.
- Mackie, I., 1982. Fish protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, p.26-31.
- Marco, Di P., Priori, A., Finoa, M.G., Massari, A., Mandlich, A. ve Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. **Aquaculture**, 275, p.319-328.
- Martinez, I., Moyano, F. J., Fernandez-Diaz, C. ve Yufera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 21, p.317-323.
- Martins, CIM., Trenovski, M., Schrama, J.M. ve Verreth, J.A.J., 2006. Comparison of feed intake behaviour and stress response in isolated and non-isolated African catfish. **Journal of Fish Biology**, 69, p.629-636.
- Mommsen, TP., Vijayan, M.M. ve Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleost: Dynamics, mechanism of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol.**, 9, p.211-268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robania, L. ve Vergar, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, 20, p. 53-60.
- Morgan, JD., Sakamoto, T., Grau, E.G. ve Iwama, G.K., 1997. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia 55 (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology A - Physiology**, 117, p.391-398.
- Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. ve Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzymes activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 15, p.121-130.
- Moyano, F.J., Diaz, I. M., Lopez, M. D. ve Alarcon, F.J., 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 122, p.327-332.
- Muhtaroglu, C.G., 1988. Çipura balı ı (*Sparus aurata*, L.) yumurta ve larvalarında gelişim ve larval safhada canlı besin alımı. **Dokuz Eylül Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknoloji Enstitüsü**, zmir.
- Munilla-Moran, R., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, 88(3-4), p.337-350.
- Mylonas, CC., Sullivan, C.V. ve Hinshaw, J.M., 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. **Fish Physiology and Biochemistry**, 13, p.485-493.
- Navarro, J.C., 1998. Aspect of larval physiology and larval nutrition, **Mediterranean Aquaculture New Techniques For Marine Hatcheries**. Macaroon, Spain.

- Naz, M., 2007. Farklı aminoasitlerle zenginleştirilmiş *Artemia nauplii*'leri ile beslenen çipura balığı (*Sparus auratus*, L. 1758)'nin sindirim hormonları ve enzimlerindeki değişimler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zooteknik Anabilim Dalı**, Hatay.
- Naz, M., Yılmaz, E., Töre, Y., Diken, G., Tanrıverdi, Z. ve Tekin, S. 2011. Canlı yemlerin proteaz aktivitelerinin belirlenmesi. **16. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu**, p.146, Antalya.
- Olli, J.J., Krogh, A., Van Den Ingh, T.S.G.A. ve Brattas, L.E., 1994. Nutritive value of four soybean products in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) **Acta Agricultura Scandinavica**, 44, p.50-60.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I. ve Del Rio, I.A., 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiol. Biochem.**, 40, p.521-551.
- Pan, B.S., Lan, C.C. ve Hung T.Y., 1991. Changes in composition and proteolytic enzyme activities of *Artemia* during early development. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 100 (3), p.725-730.
- Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., Hijelmeland, K., 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. **Mar. Biol.**, 94, p.171-181.
- Perez, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 15(3), p.237-242.
- Perez-Jimenez, A., Cardenete, G., Morales, A.E., Garcia Alcazar, A., Abellan, E. ve Hidalgo, M.C., 2009. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 154, p.157-164.
- Pillay, T.V.R., 1995. Seabass and Seabream in Aquaculture. Principles and Practices, **Write Typesetters Ltd.**, p.398-407, Hongkong.
- Polo, A., Yufera, M. ve Pascuale, E., 1990. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. **European Aquaculture Society Special Publication**, 10, p.207-208.
- Pottinger, T. G. ve Mosuwe, E., 1994. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a "critical period". **General and Comparative Endocrinology**, 95, p.350-362.
- Pottinger, T.G. ve Carrick, T.R., 1999. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. **Aquaculture**, 175, p.351-363.
- Procarione, L.S., Barry, T.P. ve Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, 61, p.91-96.
- Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Mohammad, H. ve Gilani, T., 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. **Aquaculture Research**, 39, p.1506-1513.
- Rawlings, N.D., Baret, A.J. ve Bateman, A., 2010. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, 38, p.227-260.
- Reinecke, M., Müller, C. ve Segner, H., 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in

- endocrine cells and nerve fibers of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus teleostei* . **Anat. Embryol.**, 195 (1), p.87–101.
- Riberio, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C. ve Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. **Aquaculture**,179, p.465-473.
- Ronnestad, I., Perez Dominguez, R. ve Tanaka, M., 2000a. Ontogeny of digestive tract functionality in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* studied by in vivo microinjection: pH and assimilation of free amino acids. **Fish Physiol. Biochem.**, 22, p.225–235.
- Ronnestad, I., Conceicao, L.E.C., Aragao, C. ve Dinis, M.T., 2000b. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole *Solea senegalensis* . **J. Nutr.**,130, p.2809–2812.
- Roselund, G., Stoss,J. ve Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. **Aquaculture**,155, p.183-191.
- Rottlant, J., Arends, R.J., Mancera, J.M., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. ve Tort, L., 2000. nhibition of HPI axis response to stres in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. **Fish Physiology and Biochemistry**, 23, p.13-22.
- Ruane, NM., Huisman, E.A. ve Komen, J., 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. **Journal of Fish Biology**, 59, p.1-12.
- Sammouth, S., Dorbcastel, E.R., Gasset, E., Lemarie, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier,J.L., Fivelstad,S., Blancheton,J.P., 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. **Aquacultural Engineering**, 40, p.72-78.
- Santos, GA., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J. ve Verreth, J.A.J., 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. **Aquaculture**, 299, p.73-80.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. ve Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. **Mar. Biol.**, 119, p.471–486.
- Sloman, KA., Metcalfe, N. B., Taylor, A. C. ve Gilmour, K. M., 2001. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. **Physiological and Biochemical Zoology**, 74(3), p.383-389.
- SPSS,1993. **SPSS for Windows Base System User’s Guide**,release 8.0.2, Chicago, USA.
- Stefanson, G., 1988. Enzymes in the fishing industry.**Food Technology**, p.84-85.
- Stoltze, K. Ve Buchmann, K., 2001. Effect of *Gyrodactylus derjavini* infections on cortisol production in rainbow trout fry. **Journal of Helminthology**, 75, p.291-294.
- Sumpter, JP., Pickering, A.D. ve Pottinger, T.G.,1985. Stress-induced elevation of plasma -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**, 59, p.257-265.
- Süzer, C., 1998. Çipura (*Sparus aurata* L.) prelarvalarında aydinlatmanın vitellüs kesesi ve yag damlacigi absorbsiyonuna, sindirim tüpüne ve boyca gelismisi ile yasama yüzdesine etkisi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, **Su Ürünleri Yeti tiricili i Anabilim Dalı**, zmir.

- Szisch, V., Papandroulakis, N., Fanouraki, E. ve Pavlidisa, M., 2005. Ontogeny of the thyroidhormones and cortisol in the giltheadsea bream, *Sparus aurata*. **General and Comparative Endocrinology**, 142,186–192.
- Timur, G. ve Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları, **stanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları**, 5, p.538, stanbul.
- Tseng, HC., Grendell, J.H. ve Rothman, S.S., 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. **Am.J.Physiol.**, 43, p.304-312.
- Tucker, J.W., 2000. Marine Fish Culture.**Kluwer Academic Publishers**, p.752, USA.
- Tuna Kele temur, G. ve Özdemir, Y., 2008. Gökku a ı Alabalı ı'nın (*Oncorhynchus mykiss*. W.1792) kortizol ve glikoz düzeylerine nakil i leminin etkisi. **Süleyman Demirel Üniversitesi E irdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi**, 4(1), p.11.
- Ueberschar, B., 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analysing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. **Meeresforschung**, 32, p.144–154.
- Van Weerd, J.H. ve Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology**, 120, p.107-112.
- Verreth, J., Torreele, E., Spazier, E., Van Der Sluiszen, A., Rombout, J., Booms, R. ve Segner, H., 1992. The development of a functional digestive system in the African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). **J.World Aquaculture Soc.**, 23, p.286-298.
- Walford, J. ve Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. **Aquaculture**, 109, 187–205.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. Bergmeyer, H.J. (Editor). **Methods of Enzymatic Analysis**, 5, p.270-277.
- Warner, A.H. ve Shridhar, V.,1985. Purification and characterization of a cytosol protease from dormant cysts of the brine shrimp *Artemia*. **J.Biol.Chem.**,260, p7008-7014.
- Warner, AH., Pertz, M.J., Osahan, J.K. ve Zielinski, B.S., 1995. Potential role in development of the majorcysteine protease in larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Cell Tissue Resources**, 282, p.21-31.
- Wedemeyer, GA., Barton, B.A. ve Mcleay, D.J., 1990. Stress and acclimation. (B. Schreck ve P. B. Moyle, Editors), In: **Methods for Fish Biology**, American Fisheries Society, 451- 489, Maryland, USA.
- Wendelaar Bonga,S.E.,1997. The Stres Response in Fish. **Physiol. Rev.**, 7, p.591–625.
- Xu, JY., Liu,Y., Cui, S.R. ve Miao, X.W., 2006. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. **Aquacultural Engineering**, 35, p.207-217.
- Yufer, M., Fernandez Diaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J., Garcia Gallego, M. ve Para, G., 2000. Towards an inert diet for first feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. Larvae. **Aquaculture Nutrition**,6, p.143-152.
- Yufer, M., Sarasquete, M.C. ve Fernandez Diaz, C., 1996. Testing proteinwalled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream (*Spans auratu* L.1 larvae. **Mar. Freshwater Res.**, 47, p.211-216.

- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C., 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, 12, p.399-408.
- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C.L., 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109, p. 209-212.
- Zambonino Infante, J.L. ve Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 130, p.477-487.

## ÖZGEÇM

1989 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2007 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliğini kazandı. 2011 yılında mezun oldu. 2012 senesinde MKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Yetiştiricilik Bölümünde Yüksek Lisans eğitimi başladı. Eğitime halen burada devam etmektedir.