

## Balıklarda Probiyotik Kullanımı<sup>1</sup>

Fatma Yaman<sup>2</sup>, Ömer Esendal<sup>3</sup>

### Giriş

Bakteriyel hastalıklar balık kuluçkahanelerindeki ölüm nedenlerinin başlıcaları olarak görülmektedir. Bakteriyel hastalıkları önlemek ve yem dönüşümünü artırmak için geniş spekturumlu antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında yoğun olarak kullanımı, antibiyotiklerin dokularda birikmesine ve bağırsaktaki faydalı mikrobiyal populasyonun azalması gibi normal bağırsak florasının dengesinin bozulmasına, antibiyotiklere dirençli bakteri generasyonlarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu tür direnç, diğer türlere de geçebilmekte, mevcut genomun değişimine yol açmakta ya da plazmidler veya bakteriyofajlar aracılığıyla genetik materyalin hücreler arası transferine neden olmaktadır (1, 2).

Akuakültürde patojenlerden ileri gelen hastalıkların sayıca artış gösterdiği görülmektedir. Bu durumu düzeltmek için; daha iyi besleme, su kalitesinin iyileştirilmesi, düşük stoklama yoğunluğu, immünoestimülant kullanımı ve aşı uygulamaları gündeme gelmiştir. Juvenil balıklar tam olarak immünokompetent değildir ve her zaman aşıya cevap vermemektedir. Ayrıca enjeksiyon yöntemiyle aşılamanın küçük ve fazla sayıdaki balığa uygulanması pratik değildir. Bu nedenle larva bakım tanklarında sağlıklı mikrobiyal ortam oluşturmak amacıyla alternatif yöntemler gereklidir. Endüstride kabul gören bu tür yöntemlerden biri potansiyel patojenlerin kontrolü için probiyotik bakteri kullanımıdır (2, 3, 4, 5).

### Balıkların Mikroflorası

Balık ve diğer su ürünleri, günümüzde tüketilen proteinli yiyeceklerden önemli bir grubu oluşturur. Yapılan kimyasal analizler ve denemeler proteinin yanı sıra balıkta önemli miktarda vitamin ve mineral madde bulunduğunu ve bu ürünlerin besleme değerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Yağ miktarı balık etlerine göre değişiklik göstermektedir. Karbonhidrat ise hemen hemen hiç bulunmaz. Protein yüzdesi oldukça yüksektir (6).

<sup>1</sup> Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 'nda Prof. Dr. Ömer Esendal 'ın danışmanlığı altında Fatma Yaman tarafından hazırlanan aynı adlı doktora semineridir.

<sup>2</sup> Doktora öğrencisi, Uzman Ziraat Y. Mühendisi,

<sup>3</sup> Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD, Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-Posta adresi [esendal@veterinary.ankara.edu.tr](mailto:esendal@veterinary.ankara.edu.tr)

İnsan gıdası olarak tüketilen balıklarda dominant bakterileri tanımlamak suretiyle, bu besinlerin bakteriyolojik kalitesini belirlemek, aynı zamanda da bozulma nedenlerini ortaya koymak mümkündür. Bu amaçla deniz ve tatlı su balıklarının deri, solungaç ve bağırsak florası incelenmiştir. Balıkların bağırsak florası üzerindeki çalışmalar; balık bozulmaları, balık hastalıkları ve bunlardan kaynaklanan insan veya hayvan hastalıkları konusuna önemli bir bakış açısı oluşturmuştur. Ayrıca balığın bağırsak florası balığın fizyolojisini belirlemek için de önemlidir. Çünkü mikrobiyal flora balığın cinsine göre farklılık göstermektedir (2, 3, 6).

Balıklar avlandıkları çevrenin mikrobiyal popülasyonuna ve yoğunluğuna bağlı olarak belli düzeylerde mikroorganizma içerir. Balığın mikroflorası soğuk, sıcak ve tatlı suların mikroflorasına bağlı olarak değişir. Soğuk suda yaşayan balıklar daha çok psikrofilik bakterileri içermektedir. Balıkların mikrobiyal florası mevsimsel değişikliklerden de etkilenmekte olup aynalı sazan üzerinde yapılan bir çalışmada ilkbaharda, deride genel aerob, yazın fekal *Streptococcus*, kışın maya, küf, koliform ve proteolitik mikroorganizmaların en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, bağırsak florasının yalnız mevsimsel değil aylara göre de değiştiği tespit edilmiş yaşam döngüsünün de bu değişiklikte etkili olduğu gözlemlenmiştir (6).

Tablo 1. Tatlı su ve deniz balıklarının deri, solungaç ve bağırsak bakteriyel florası (6).

| Tatlı su balıklarının deri mikroflorası | Deniz balıklarının deri mikroflorası | Deniz balıklarının solungaç mikroflorası | Tatlı su balıklarının bağırsak mikroflorası |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Acinetobacter</i> spp.               | <i>Acinetobacter</i> spp.            | <i>Alcaligenes</i> spp.                  | <i>Acinetobacter</i> spp.                   |
| <i>Alcaligenes</i> spp.                 | <i>Alcaligenes faecalis</i>          | <i>Flavobacterium</i> spp.               | <i>Enterobacter</i> spp.                    |
| <i>Escherichia coli</i>                 | <i>Escherichia coli</i>              | <i>Micrococcus</i> spp.                  | <i>Escherichia coli</i>                     |
| <i>Flexibacter</i> spp.                 | <i>Cytophaga</i> spp.                | <i>Bacillus</i> spp.                     | <i>Klebsiella</i> spp.                      |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>          | <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | <i>Achromobacter</i> spp.                | <i>Proteus</i> spp.                         |
| <i>Vibrio fluvialis</i>                 | <i>Pseudomonas marina</i>            |                                          | <i>Serratia</i> spp.                        |
|                                         | <i>Vibrio</i> spp.                   |                                          | <i>Aeromonas</i> spp.                       |
|                                         | <i>Bacillus cereus</i>               |                                          | <i>Flexibacter</i> spp.                     |
|                                         | <i>Bacillus firmus</i>               |                                          | <i>Pseudomonas</i> spp.                     |
|                                         | <i>Coulobacter</i> spp.              |                                          |                                             |
|                                         | <i>Coryneform</i> spp.               |                                          |                                             |
|                                         | <i>Hyphomicrobium vulgare</i>        |                                          |                                             |
|                                         | <i>Lucibacterium harveyi</i>         |                                          |                                             |
|                                         | <i>Photobacterium angustum</i>       |                                          |                                             |
|                                         | <i>Prostecomicrobium</i> spp.        |                                          |                                             |

Tatlı su balıklarının üzerini örten mukus tabakasında *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium* cinsi bakteriler tespit edilirken, bağırsak içeriğinde ise *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* ve *Escherichia* cinsi bakteriler saptanmıştır (6).

Kalkan balığının iç organlarındaki mikrobiyal değişiklikler yıllık olarak incelenmiş, %80' lik bir oranla *Vibrio* ve *Pseudomonas* 'ın predominant bakteriler olduğu tespit edilmiştir (6, 7).

Kültür koşullarında yetiştirilen alabalıkların mide-bağırsak bakteriyel floralarının çevre (su ve yem) ile ilişkili olduğu izole edilen mikroorganizmalarla da kanıtlanmıştır. Bazı

araştırmacılar kültür balıklarının bağırsak mikroflorasının yaban balıklarınıninkinden farklı olduğunu ve daha az bakteri türünün bulunduğunu belirtmiştir (8).

*Salmo alpinus* 'un bağırsak sisteminde yaklaşık olarak  $10^5$  g<sup>-1</sup> bakteri tespit edilmiş ve mevcut bakteri yoğunluğu iki farklı diyet uygulanarak tekrar incelenmiştir. Buna göre ticari yemlerle beslenenlerde *Aeromonas* ve *Pseudomonas* bakterileri dominant olarak bulunurken balık yumurtalarıyla beslenenlerde Enterobacteriaceae grubu baskın bulunmuştur. Bu da balık florasının beslenmeyle değişebildiğini göstermiştir (6, 13).

*Salmo alpinus* 'un karın içeriğinde dominant olarak *Pseudomonas* ve *Agrobacterium* bulunurken, balık kromik oksitle zenginleştirilmiş yemle beslendiğinde *Lactobacillus* ve *Streptococcus* spp.'nin sindirim sisteminde yoğun olduğu tespit edilmiştir (6).

Hayvanların sindirim sisteminde bulunan bazı yararlı bakterilerin mevcudiyetinin, sistemi zararlı bakterilerin üremesini engelleyerek koruduğu düşünülmektedir. Buna karşın balıkların gastrointestinal sistemindeki mikrofloranın rolü tam olarak belirlenememiştir. Ancak balığın beslenme, büyüme ve hastalıklara karşı dayanıklılığında gastrointestinal floranın etkili olduğu bildirilmiştir (7).

*Lactobacillus* 'ların, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila* gibi balık patojenlerinin gelişmesini inhibe eden maddeler üretebildiği ve bundan dolayı balık sağlığı için çok önemli olduğu gösterilmiştir (9, 2, 6).

Diyetlerinde laktik asit bakterisi ile beslenen balıkların mide-bağırsak sisteminin istenildiği gibi düzenlenebileceği gösterilmiştir. Araştırmacılar *Cornabacterium* spp.'nin gökkuşağı alabalığının bağırsak bölgesinde yaşayabildiğini ve intestinal mukus içinde ve yüzeyinde hızla çoğaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca *V. anguillarum* ve *A. salmonicida* 'ya karşı antimikrobiyal madde üreten laktik asit bakterileri de tespit edilmiştir (6).

Hayvan yetiştiriciliğinde laktik asit bakterileri gibi probiyotiklerin kullanımı hem hastalıklara karşı direncin artırılmasında hem de hayvan büyümesini desteklemede pozitif sonuçlar vermektedir. Laktik asit bakterileri, ürettikleri ve diğer bakterilerin üremesini inhibe eden bileşikler sayesinde intestinal kas tabakasında hızla çoğalarak patojenik bakterilere karşı ilk savunma bariyerini oluştururlar. *L. plantarum* gibi laktik asit bakterilerinin bazı türleri *P. virens* ve *S. salar* gibi balıklarda bağırsak florasının bir bölümünü oluşturur. Salmonun bağırsak sisteminden izole edilen laktik asit bakterilerinin *V. anguillarum* ve *A. salmonicida* 'nın büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir. Sonuç olarak araştırmacılar, laktik asit bakterileri ile destekli diyetler kullanıldığında bağırsakta bakteriyel çoğalmanın önlenebileceğini bildirmişlerdir (6, 10).

Bilim adamları hayvan besinlerinde antibiyotik yerine bağırsak florasını dengeleyici, yararlı etki yapan canlı mikrobiyal besinlerin kullanılmasının daha faydalı olacağını belirterek probiyotik canlıların kullanılmasını tavsiye etmektedir (2).

*Lactobacillus* 'lar ve *Streptococcus* 'lar probiyotik üretiminde kullanılan en yaygın bakteri cinsleridir. *Lactobacillus* 'ların kullanıldığı çalışmalarda, larva çıkışını takiben

bağırsak florasında *Lactobacillus* 'ların sayısının arttığı, diğer bakterilerin sayısının azaldığı görülmüştür (6, 10).

## Probiyotiklerin Tanımı

Probiyotiklerin keşfinden uzun süre önce, mikroorganizmalar gıdaların korunması için kullanılmıştır. Ve bu deneysel yöntemler insan sağlığını geliştirmeye katkı sağlamıştır. Bu yüzyılın başlarında laktik asit bakterisi, diğer mikroorganizmaların zararlı etkisini baskıladığı görüşüyle insan bağırsağına implante edilmiştir. Probiyotiklerin modern kavramı sadece 25 yıl önce formüle edilmiştir. Probiyotik tanımı farklı şekillerde kullanılmıştır ve ilk olarak "Bir protozoan tarafından üretilen ve diğerinin üremesini düzenleyen maddeleri" tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Parker 1974 yılında probiyotikleri "Bağırsak mikrobiyal dengesine katkı sağlayan organizma ve maddeler" olarak ifade etmiştir. Ancak bu tanımlama antibiyotikler ve kısa zincirli yağ asitlerini de içerdiğinden daha kesin bir tanımlama getirilerek "Konakçı hayvanın sindirim sisteminin mikrobiyal dengesini geliştirerek onu yararlı bir biçimde etkileyen canlı mikrobiyal yem takviyesi" olarak sınırlandırılmıştır. Tannock 1997 yılında bağırsağın mikrobiyal dengesi üzerindeki etkinin birçok durumda gösterilmediğini tespit ederek "Sağlığı geliştirmek amacıyla diyet takviyesi olarak verilen mikrobiyal hücreler" olarak kabul etmiştir. Gatesoupe probiyotikleri "Sağlığı geliştirmek amacı ile mikrobiyal hücrelerin sindirim sistemine girebilecek ve canlı kalabilecek şekilde düzenlenmesi" olarak tanımlamıştır. Gram ve ark. tanımlamayı "Konakçı hayvanın mikrobiyal dengesini olumlu yönde etkileyen canlı mikrobiyal takviye" olarak değiştirmiştir. Bu tanımlamalar başlangıçta çiftlik hayvanları ve insanlara uyarlanmıştır. Günümüzde probiyotikler akuakültürde de kullanıldığı için bu tanımlamaların modifiye edilmesi gerekmektedir (2, 6, 11, 12).

Balığın ekosisteminde bulunan mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki grupta incelenir. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup denge halinde olup, faydalı mikroorganizmalar baskın florayı oluşturmaktadır. Mide-bağırsak sisteminde bulunan ve faydalı olarak nitelendirilen bu bakterilerin, yemlerin sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, bağırsak florasını düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan mikroorganizmalar "Probiyotik" olarak tanımlanmaktadır (13).

## Akuatik Hayvanların Sindirim Sisteminin Probiyotiklere Uygunluğu

İnsan ve kara hayvanlarının embriyonik gelişimi amnionda gerçekleşirken birçok balık ve kabuklunun larva hali ilk ontogenetik evrede dış ortama bırakılır. Bu larvalar, yüksek düzeyde sindirim sistemi mikroflorasındaki düzensizliklere maruz kalır. Çünkü bu larvalar sindirim sistemleri ve immün sistemleri tam anlamıyla gelişmediği halde yem almaya başlarlar. Bu nedenle probiyotik uygulamaları özellikle larva döneminde tercih edilmelidir (11).

İnsan ve çiftlik hayvanlarının sindirim sistemi mikroflorasında zorunlu veya fakültatif anaerob Gram pozitif bakteriler dominanttır. İnsan dışkısında ana bakteriyel gruplar; *Bacterioides*, Gram pozitif anaerobik koklar, *Eubacterium* ve *Bifidobacterium* iken

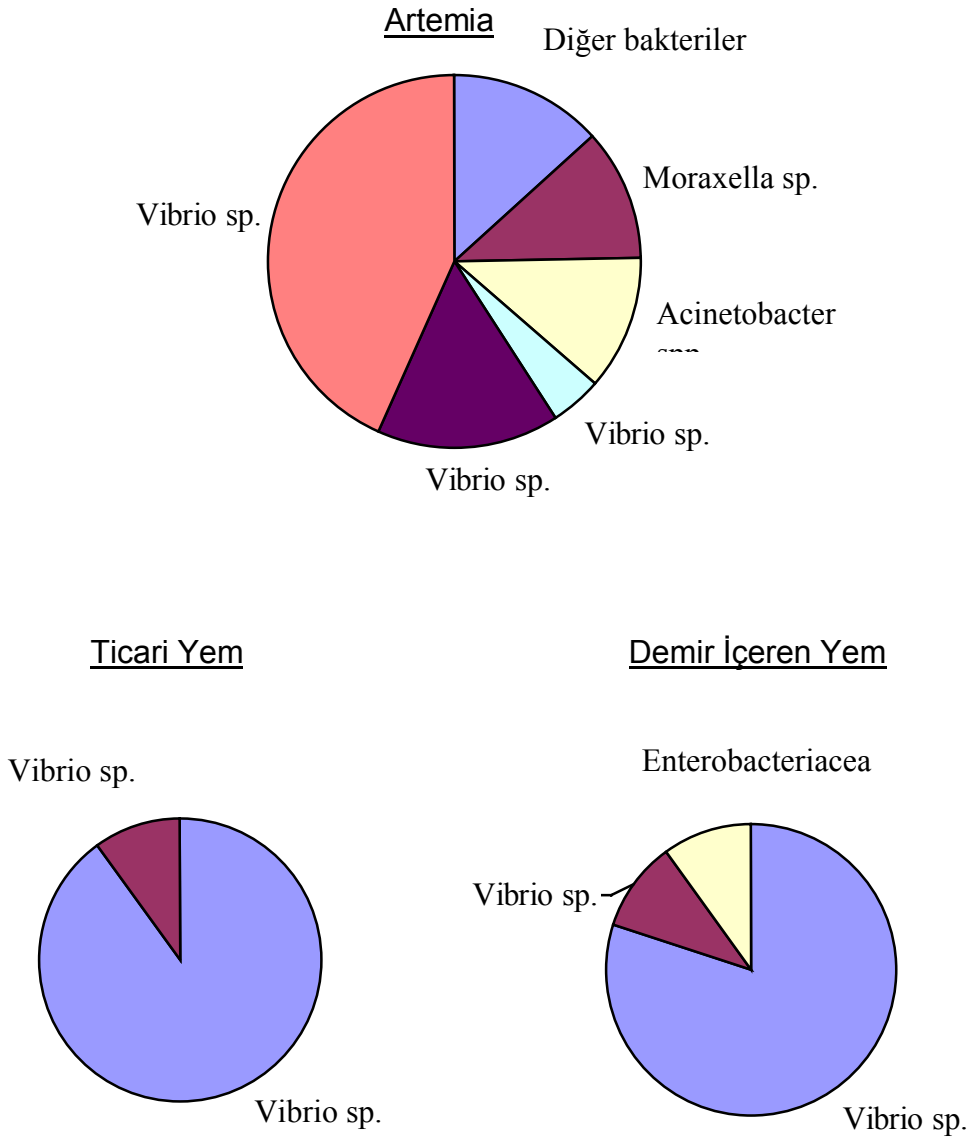
domuz dışkısında öncelikle *Streptococcus* ve *Lactobacillus* 'lar yer almaktadır. Bu mikroflorada dominant veya sub-dominant probiyont türleri arasında *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* bulunmaktadır. Bazı otçul tropik balıkların posterior bağırsağında simbiyotik anaerob bakteriler dominant iken, kabukluların ve diğer balıkların sindirim sisteminde Gram negatif fakültatif anaerob bakteriler dominanttır. Crustacea 'larda, deniz balıklarında ve çift kabuklularda en bilinen tür *Vibrio* ve *Pseudomonas* 'tır. Akuatik mikrofloranın özelliğinin bir sonucu olarak akuakültür için en etkili probiyotikler karasal türlerinden farklı olmalıdır (14).

Akuatik hayvanlar poikilotermiktir ve mikroflora ısı değişiklikleri ile değişebilir. Tuzluluk düzeyinin değişmesi de mikroflorayı etkileyebilir. Deniz balıkları vücutlarındaki su kaybını önlemek için sürekli su içmek zorundadır. Bu sürekli su akışı onu çevreleyen ortamın etkisini artırır ve bu çift kabuklu, karides larvası ve canlı yem organizmaları gibi filtre ederek yem yiyenlerde gözlenen su akışı gibidir. Bu etki gastrik bariyer olmadığından özellikle larvalarda önemlidir. Bu nedenle akuatik hayvanların bağırsak mikroflorası yem ve sudan gelen mikroorganizmaların alınması ile hızla değişebilir. Çift kabuklularda bulunan mikroflora deniz suyu ve sedimentte bulunanlara çok benzemektedir. Larva ve yavru balıklarda yemin etkisi açıkça gösterilmiştir. Canlı yemlerle alınan bakterinin etkisi özellikle ilk yemleme sırasında önemlidir. Bağırsak mikrobiyal florasındaki dominant türler yemleme rejimine bağlı olarak değişmektedir (11).

Bağırsak mikroflorasındaki bakteriyel yoğunluk ve dominant türler yemleme rejimine göre değişim göstermektedir. Levrek larvalarında 10. günden 20. güne kadar yapılan denemede; ticari diyetler kullanıldığında  $10^9$  kob/g (vücut ağırlığı), artemia kullanıldığında  $10^7$  kob/g, az miktarda demir içeren diyetler kullanıldığında  $3 \times 10^8$  kob/g bakteriyel yoğunluk tespit edilmiş olup dominant türler bu üç grupta farklılık göstermiştir. Bu gruplardaki bakteriyel türler şekil 1'de gösterilmiştir (8).

Larval ve juvenil aşamadaki balıkların bağırsak florası, yetiştirme suyunun ve diyetlerin mikroflorası ile ilişkili olarak değişim gösterir. Kırmızı ve siyah çipura balığının bağırsağındaki toplam bakteri sayısı  $7,4 \times 10^4$  ve  $3,4 \times 10^4$  kob/balık olarak belirlenmiştir. Yetiştirme suyunda  $3,1 \times 10^4$  kob/ml, canlı yemlerde (rotifer ve artemia)  $2,1 \times 10^7$  kob/g, ticari diyetlerde ise  $1,2 \times 10^4$  kob/g bakteriyel yük tespit edilmiştir. Yetiştirme suyunda *Pseudomonas* (% 22) ve *Moraxella* (% 29), canlı yemlerde *Pseudomonas* (% 48) dominant grubu oluşturmaktadır. Su ve canlı yemlerde *Vibrio* ise % 7 ile % 11 civarında tespit edilmiştir (8, 7).

Bazı hayvanların bağırsaklarındaki mikrobiyal topluluk hastalıklara karşı belirli düzeyde koruma sağlar. Balıkların bağırsaklarındaki mikroflora sudaki çevrenin doğal yansıması olabilir. Ancak yoğun suni larva kültüründe dezenfekte su, mikroalg, artemia, rotifer ve antibakteriyellerin kullanımı ile bu denge değişebilir. Bunun sonucu olarak ne ortamda ne de larvanın sindirim sisteminde koruyucu mikrobiyal yoğunluk gelişemeyebilir. Nispeten steril bir çevrede üretilen postlarva bakım ve büyütme havuzları karmaşık mikrobiyal yoğunluğa maruz bırakıldığında iyi bir büyüme göstermemekte ve canlı kalma düzeyi düşük olmaktadır. Bu larvalar, potansiyel patojenik mikroorganizmalara ve çevresel strese maruz bırakıldığında hastalıklara karşı duyarlı olmaktadır (2).



Şekil 1. Yemleme rejimine bağlı olarak görülen dominant bakteriyel türler

## Karasal Hayvan Probiyotiklerinin Balıklarda Kullanımı

Akuakültür yemlerinde probiyotiklerin kullanımıyla ilgili ilk denemelerde karasal hayvanlara yönelik üretilen ticari preparatlar kullanılmıştır. Toprakta izole edilen *Bacillus toyoi* sporları, *Edwardsiella* spp. ile enfekte olan Japon yılan balığının ölüm oranını azaltmıştır. Aynı yem katkısı sarıkuyruk balığının büyüme oranını artırmıştır. Bu sporlar yemle kolayca karıştırılabilmesine rağmen bunların balığın sindirim sistemindeki akibeti bilinmemektedir. Aynı *Bacillus toyoi* türü rotifer kültürü üzerine ilave edilmiş ve bu bakteri sporlarının rotiferler tarafından filtre edilmesi sağlanmıştır. Bu rotiferler ile yemlenen alabalık larvalarında büyüme oranında artış tespit edilmiştir. *Vibrio* spp.'ye karşı *Bacillus* türlerinin antibakteriyel etki gösterdikleri belirtilmiştir (11). Birçok basil antibiyotik üretir. Bu özellik sporlanma ile ilgilidir ve bazı antibiyotikler vejetatif hücrelerin proteolizi ile gerçekleşmektedir. Rotiferler sporlar ile beslendiğinde Vibrionaceae grubundaki bakterilerde azalma olduğu belirtilmiştir (11).

Canlı laktik asit bakterisiyle hazırlanan ticari preparatlar, yassı balık larvalarına verilen canlı yem ortamına ilave edilmiştir. Bu uygulama rotifer, yassı balık, kalkan balığı ve japon dil balığının büyüme performansını artırmıştır. Laktik asit bakterisi ile hazırlanan bazı preparatlar rotiferlerde bakterinin çoğalmasını etkilemektedir. Ancak laktik asit bakterisinin akibeti bu deneylerde araştırılmamıştır. *Streptococcus faecium* 'un diğer ticari preparatları İsrail sazanlarının yem dönüşümünü ve büyüme oranını artırmıştır. Probiyotik uygulamasından 14 gün sonra sazan balığının bağırsak mikroflorasında *E. coli* tespit edilememiştir. Ayrıca *S. faecium* 'un sindirim sistemi epiteline yüksek düzeyde tutunma yeteneğine sahip olduğu ifade edilmiştir (11).

Laktik asit bakterisi *Pediococcus acidilactici* ve *Saccharomyces cerevisiae* türü mayayı içeren karasal hayvan preparatları balıklarda denenmiştir. Bu mikroorganizmalar bakteriosin üretebilmekte, tuzlu suda uzun süre canlı kalabilmektedir. Antoktan olmayan *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin Avrupa levrek balığının bağırsağında kolonize olabildiği bildirilmiştir. Laktik asit bakterisi ve mayanın sinerjistik özelliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. *Lactobacillus coagulans* ve *Saccharomyces cerevisiae* ile hazırlanmış ticari preparatların tatlı su balık larvaları ve yavrularının büyüme oranındaki artışta etkisi olduğu belirtilmiştir (15).

BioSolv AB, İsveç Stockholm firması tarafından üretilen yeni bir ticari karışımdır. Karışım; Rhodospirillaceae familyasına ait dört değişik Gram negatif bakteri türünden oluşmaktadır. Bunlar fototropik ve genelde “purple non sulfur” bakterisi olarak tanınırlar. Karışım canlı *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas viridis*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Rhodomicrobium vannielli* 'den oluşmaktadır. Bu türlerden *Rhodospirillum rubrum* önemli miktarda B<sub>12</sub> vitamini üretmektedir. B<sub>12</sub> vitamini balığın sindirim sisteminde gerçekleşen bazı fonksiyonlar için önemli bir vitamindir. *Rhodospirillum* ve *Rhodopseudomonas* kirli suya uygulandığında su kalite parametreleri üzerinde pozitif etkiler oluşturmuştur. Bu nedenle bu karışımın balığa olduğu gibi yaşadığı su ortamının gelişimine de etkisi olduğu belirtilmiştir. Karışımın, balığın sindirim sisteminde *Aeromonas* spp.'nin üremesini engellediği belirtilmiştir (8).

Karasal hayvanlar için hazırlanmış ticari preparatlarla yapılan bu deneyler akuakültür yemlerindeki bakteriyel takviyenin etkisini göstermek açısından önemlidir ancak bu mikroorganizmaların akuatik hayvanların sindirim sisteminde canlı kalma düzeylerinin farklı olduğu unutulmamalıdır.

## Probiyotik Bakteri Seçimi

Probiyotik bakteri seçimi genellikle sınırlı bilimsel kanıta dayalı tahmini bir işlemdir. Probiyotik araştırmalarındaki yetersizlikler, uygun olmayan mikroorganizmaların seçiminden kaynaklanabilir. Seçim aşamaları tanımlanmıştır ancak bunların değişik konakçı ve ortama adapte edilmesi gerekmektedir. Probiyotik faaliyetlerinin mekanizmasını anlamak ve potansiyel probiyotiklerin seçim kriterlerini belirlemek gerekmektedir. Genel seçim kriteri çoğunlukla biyolojik emniyet şartları dikkate alınarak; üretim yöntemleri, probiyotik kullanım yöntemi ve mikroorganizmanın vücuttaki hedeflenen yeri ile belirlenir. Akuakültür hayvanların larva kültüründe kullanılacak probiyotik bakterilerin seçim yöntemleri aşağıdaki aşamaları içermelidir (8).

1. Geçmiş bilgilerin toplanması
2. Probiyotik bakterinin kazanımı
3. Probiyotik bakteri ile mücadele eden patojenik türleri değerlendirme imkanı
4. Probiyotik bakterinin patojenitesinin tespiti
5. Larvada probiyotik bakterinin etkisinin değerlendirilmesi
6. Ekonomik maliyet ve kar analizi

Probiyotik mikroorganizmalar patojenik olmamalı ve balıklara uygulandığında istenmeyen yan etkilerinden kaçınmak amacıyla toksik olmamalıdır.

Probiyotiklerin pratik kullanımı mikroorganizmaların depolama şartları altında olduğu gibi, arazi şartlarında da canlı kalma özelliğine sahip olmasını gerekli kılar. Ancak, canlı olmayan bakterinin de canlı kalmadan doku kültür hücrelerine yapışabildiği belgelenmiştir. Probiyotik bakteri için yerleşme ilk şart olduğundan önemli seçim kriterlerinden biridir (11).

Probiyotik kullanımının başlangıçtaki ana amacı; balığın deri, deri mukusu veya bağırsak florasını oluşturan faydalı ve patojenik mikroorganizmalar arasında tercih edilen bir ilişkinin düzenlenmesi veya yeniden oluşturulmasıdır. Başarılı bir probiyotikten faydalı etki sağlanması adına bazı spesifik özelliklere sahip olması beklenir. Bir probiyotik bakterinin bu tür özelliklerinden biri patojenlere karşı antagonizmdir. Antagonizm işaretlerinden biri organik asitler, hidrojen peroksit veya siderofor gibi antimikrobiyal maddelerin üretilmesidir. Büyümenin teşviki veya balığı patojenlere karşı koruma şeklinde faydalı bir etkiye sahip olmak adına türlerin adhezyon ile balıkta yerleşme kapasitesine sahip olması ve vitaminler gibi önemli maddeleri üretebilme yeteneği olması gereklidir. Örneğin sindirim sistemde *Lactobacillus* 'lar yerleşme bölgesi ve maddelerin kullanımı açısından diğer bakterilerle rekabet edebilir. Ancak bu bakterilerin önemli özelliği organik asit, hidrojen peroksit ve diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyecek bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddeler üretmesidir (6).

İyi bir probiyotiğin özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1. Hayvan üzerinde yararlı bir etki gösterecek yeteneğe sahip olmalıdır
2. Patojen olmaması ve toksik madde üretmemesi
3. Kolay ve hızlı üreyebilmesi
4. Değişik pH ve organik asitlere dirençli olması
5. Depolama ve ürün eldesi sırasında uzun süre canlılığını koruyabilmesi ve bozulmamasıdır (6, 13).

## **Probiyotiklerin Etki Mekanizması**

Konakçısının sağlığını geliştirici aday olarak kullanılacak mikroorganizmalar da temel özellikler araştırılmıştır. Bunlar;

1. Patojenlerin antagonizmi birçok durumda in vitro gösterilmiştir
2. Bazı aday probiyontların kolonizasyon potansiyeli araştırılmıştır
3. Bazı türlerin konakçıdaki hastalıklara karşı dayanıklılığı artırdığı bildirilmiştir.



Probiyotiklerden bir çok faydalı etki beklenilmektedir. Örneğin; besinler için patojenlerle veya adhezyon bölgeler için savaşması ve immün sistemin uyarımıdır (2).

## Antagonistik Aktivite

Deniz bakterileri arasında antagonizm yaygın olarak görülmektedir. Örneğin; Zooplanktonlardan izole edilen bakterilerin % 60 'ından fazlası bakteriolitiktir. Asalaklardan izole edilenlerin % 75 kadarı antibakteriyel bileşenler üretirler. Patojenik bir vibrio türü, ilk kez yemlenen Hippoglossus larvalarından izole edilen bakteri tarafından % 0-100 oranında inhibe edilmiştir. Deniz antagonistik türleri, *Pseudomonas*, *Alteromonas* ve *Vibrio* cinslerinin üyeleridir. Antibakteriyel aktivite tatlı su biyotasında da mevcuttur. *C. divergens*, *Lactobacillus* spp. gibi bazı laktik asit bakterileri balık patojenlerine antagonistik etki gösterir. *Vibrio* ve *Aeromonas* 'ın patojenik türleri in vitro deneylerin çoğunda hedef alınmıştır. Bunların dışında *Edwardsiella tarda*, *E. seriolicida*, *P. piscicida*, *Y. ruckeri* 'de test edilmiştir. Bazı bakteriler virüslara karşı etkili olup viral hastalıkların biyokontrolünde kullanılmaktadır. Bu etkinin sadece antibiyotikler tarafından düzenlenmediğini bilmek önemlidir. Burada organik asitler, hidrojen peroksit ve sideroforlar gibi bir çok engelleyici madde mevcuttur. Bu tür bileşenler nedeniyle inhibisyon büyük ölçüde deneysel şartlara bağlıdır. Bunlar in vivo ve in vitro ortamda farklılık göstermektedir. Bu nedenle in vitro da görülen muhalefet, aday probiyotik seçimi için yeterli bir kriter olmadığı gibi türleri çıkarmak için de muhalefetin olmaması yeterli değildir (16).

Laktik asit üreten bakteriler, balığın sindirim sistemine kolonizasyonu ile bu bölgedeki patojenik mikroorganizmaların proliferasyonunu engelleyebilir. Böylece proteolitik bakteriler tarafından meydana getirilen toksinlerin neden olduğu hastalıklardan konakçı korunmuş olur. *Lactobacillus* 'lar mikroorganizmaların üremesini engelleyebilecek bileşikler üretebilir. Bu bileşikler hidrojen peroksit, organik asitler ve özel bileşikler olan bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler bakterilere karşı aktif olan bakterisidal veya bakteriyostatik peptidlerdir. Bazı *L. lactis* türleri tarafından üretilen nisin şimdiye kadar en iyi bilinen ve en çok araştırılanıdır. Bakteriyosinler, *Listeria monocytogenes*, *A. hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* gibi bazı patojenleri inhibe edebilir (16).

## Bağırsak Kolonizasyonu ve Geçirgenliği

Probiyotikleri karakterize etmek için kolonizasyon potansiyeli de önemli bir kriterdir. Ancak hücreler yüksek dozda sürekli ya da kısmen sürekli olarak verildiğinde geçişken bakteri de etken olabilir. Bu nedenle pratikte bağırsakta probiyotiğin kalışını değerlendirmek gereklidir. *Carnobacterium* türlerinin konsantrasyonu, atlantik morina yavrularının bağırsağından çok pilorik sekasında yüksektir. Laktik asit bakterileri larva ve yavru balık bağırsağında bir kaç gün canlı kalabilmektedir. Vibrionaceae balıkta ve Pasifik istiridye larvasında, mayalar da özellikle Gökkuşluğu alabalığında günlerce veya haftalarca canlı kalabilmektedir. Bağırsak mukozasına adhezyon özelliğini araştırmak amacıyla yapılan in vitro denemelerde, bağırsak mukozasına *Carnobacterium* spp.'nin farklı bir biçimde tutunduğu tespit edilmiştir. *Carnobacterium* spp. kalkan balığının antoktan bağırsak bakterisi olup özellikle bağırsak mukozasına

tutunmaktadır. Gökkuşığı alabalığının bağırsak mukusunda maya özel adhezinlerinin katılımı da söz konusu olmaktadır. Bu nedenle mayanın balığın bağırsağında tutunma ve yerleşme potansiyeli yüksektir ve bunların probiyont olarak akuakültürde kullanılması önem taşımaktadır (11).

Aday probiyotiği seçmek için antagonizm, adhezyon veya değişim testleri gereklidir. Ancak, türün zararsız olduğu sonucuna varmak için bakım deneyleri de gerekmektedir. Probiyotiklerin koruyucu etkisi hastalık salgın hale geldiğinde gözlemlenebilmektedir.

## Kolonizasyon

Conway 'e göre çoğalma oranının atılma oranından daha yüksek olması nedeniyle burada uzun süre kalabilirlerse bir mikroorganizmanın bağırsak sistemine yerleşmesi mümkündür. Karasal hayvanların sindirim sistemine laktik asit bakterileri çok önce yerleşmiştir ve bunların dominant veya subdominant florasına aittirler. Balıktaki durum ise farklıdır (16).

Atlantik morina balığının yumurtalarına *Pseudomonas*, *Aeromonas* ve *Flavobacterium* yerleşmiştir. Kuluçkadan çıktıktan sonra larva bağırsağı yemlenmeden öncesine kadar aynı tür tarafından kolonize edilmiştir (*Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Flevibacter*). Morina bağırsağından izole edilip suya ilave edilen laktik asit bakterisi, larva bağırsak mikroflorasının % 70'ini oluşturmuştur. Başlangıçta *L. plantarum* olarak belirlenen tür, *C. divergens* olarak tekrar sınıflandırılmıştır. İlk yemlemeden sonra mikroflora *Vibrio* / *Aeromonas* grubu tarafından dominant hale gelmiştir. Bu aşamada rotiflerden (*Brachionus plicatilis*) izole edilen bir türün, zenginleştirme ortamına ilave edilmesiyle *Lactobacillus* / *Carnobacterium* 'un suni bir dominantını elde etmek mümkündür. Ticari diyetle bırakıldıktan sonra bu florada belirgin bir düşüş gözlemlenir. Direkt olarak ticari diyet ile beslenen Salmonid yavruları ve Atlantik salmon yavrularından izole edilen florada (*Pseudomonas*, Enterobacteriaceae ve Gram pozitif koklar) 1/10 düzeyine kadar azalma olur. Diyetlerine dondurularak kurutulmuş *C. divergens* ilave edilen balıklarda, bu bakteri türünün 10<sup>5</sup> kob/balık olduğu tespit edilmiştir. *Carnobacterium* gökkuşığı alabalık yavrularının bağırsağında en az 3 gün kalabilmektedir (16).

## Mukoza 'ya adhezyon

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların ilk işlevi mukozal yüzeylere tutunmaktır. Bu nedenle probiyotik preparatları için seçilen *Lactobacillus* 'un sindirim sistemi epiteline tutunabilmesi gereklidir. Laktik asit bakterilerinin endotermik hayvanlarda adhezyonu karmaşıktır. Çünkü bunlar sindirim sisteminde konakçı spesifitesi sergiler. Kemirgenlerden izole edilen laktik asit bakterisi, tavuğun epitel hücrelerinde tutunamamaktadır ve bunun aksi yönde uygulanması da aynıdır. Tannock konakçı spesifitesinin lektinlerin ya glikoproteinler ya da glikolipidler ile interaksiyonu sonucu olduğunu ifade etmiştir. Lektinler bakteriyel veya epitel hücrelerden yada konakçı diyetinden elde edilir. Daha sonra epitel hücreler veya *Lactobacillus* yüzeyindeki spesifik karbonhidratlara tutunurlar. Bu fenomen balığın sindirim sisteminde halen araştırılmamıştır ancak düşünülmesi gereken bir konudur. Balığın sindirim sistemindeki dokulara laktik asit bakterilerinin tutunması konusunda fazla bir şey bilinmemektedir. Ancak in-vitro testler *Carnobacterium* spp.'nin

gökkuşağı alabalığının sindirim mukozasına tutunabildiğini göstermiş fakat spesifik adhezyon mekanizması tespit edilememiştir. Adhezyon alıcıları için patojenler ile yarışma ilk probiyotik etki olabilir. *Lactobacillus* spp. *E. coli* 'nin domuz enterositlerine adhezyonunu engeller. Benzer bir etki in-vivo olarak gnotobiotik kuzularda da gözlemlenmiştir. Tavuğun sindirim epitel hücrelerine *Salmonella* spp.'nin tutunması *Lactobacillus* spp. tarafından azaltılır. Bu etkilerin sadece yarışarak dışarda bırakma nedeni ile olmadığı burada belirli engelleyicilerin bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Örneğin *Lactobacillus* spp. biosurfaktanları *E. faecalis* 'in cama adhezyonunu engellemektedir. Owehand ve Conway *L. fermentum* tarafından üretilen bir bileşiği izole edip karakterize etmiştir. Bu bileşik *E. coli* 'nin bağırsak mukozasına adhezyonunu engellemektedir (16).

Tablo 2. Probiyotik bakterilerin konakçıda kalma süreleri (11).

| Bakteri türü                    | Konakçı                                      | Konakçıda kalma süresi |
|---------------------------------|----------------------------------------------|------------------------|
| Bağırsak bakterisi              | Alabalık ( <i>Sc. maximus</i> ) (j)          | 7 gün (15 °C )         |
| <i>Aeromonas</i> spp.           | Alabalık ( <i>Sc. maximus</i> ) (l)          | 14 gün (15-20 °C )     |
| <i>Carnobacterium divergens</i> | Morina balığı ( <i>Gadus morhua</i> ) (j)    | —                      |
| <i>Carnobacterium divergens</i> | Morina balığı ( <i>Gadus morhua</i> ) (l)    | 9 gün (8 °C )          |
| <i>Carnobacterium divergens</i> | Alabalık ( <i>Sa. salar</i> ) (j)            | —                      |
| <i>Carnobacterium</i> spp.      | Alabalık ( <i>Sa. salar</i> ) (j)            | 4 gün (11 °C )         |
| <i>Carnobacterium</i> spp.      | Alabalık ( <i>Sc. maximus</i> ) (l)          | —                      |
| <i>Vibrio alginolyticus</i>     | Alabalık ( <i>Sa. salar</i> ) (j)            | 21 günde (15 °C )      |
| <i>Vibrio pelagius</i>          | Alabalık ( <i>Sc. maximus</i> ) (j)          | 14 günde (17-20 °C )   |
| <i>Vibrio</i> spp.              | Alabalık ( <i>Sc. maximus</i> ) (j)          | —                      |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>    | Gökkuşağı alabalığı ( <i>O. mykiss</i> ) (j) | 30 günde (15 °C )      |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>     | Gökkuşağı alabalığı ( <i>O. mykiss</i> ) (j) | 65 günde (8 °C )       |

J: juvenil, L: larva, —: tespit edilememiş

Balıktan izole edilen *Carnobacterium* spp. diğer laktik asit bakterilerine karşı etkili carnocin üretir. *C. piscicola* ve *C. divergens* 'den izole edilen diğer iki bakteriyosin *L. monocytogenes* üremesini engellemektedir. Laktik asit bakterilerinin Gram pozitif balık patojenlerine karşı antagonistik etkisini gösteren herhangi bir raporun bulunmamış olması ilginçtir. Yavru Atlantik salmon balığından izole edilen *C. divergens* 'in bir madde üreterek *V. anguillarum*, *V. salmonicida* ve *Proteus vulgaris* gibi balık patojenlerini engellediği tespit edilmiştir. *C. piscicola* carnocini de *A. hydrophila* 'ya *L. monocytogenes* 'e göre daha düşük düzeyde etkilidir. Larva morina balığında *C. divergens* tarafından dominant olan suni mikroflora sadece 9 günlük larvada  $10^2$  kob iken uygulamaya alınmamış larvada  $10^4$  kob sayılmıştır. *V. anguillarum*, steril dışkı özünde üretilen patojenik tür *Carnobacterium* spp. ile müşterek kültürde engellenmektedir (16).

Balık patojenlerine karşı laktik asit bakterilerinin engelleyici etkisi sadece balıktan izole edilen türlerle sınırlı değildir. Birçok laktik asit bakterisinin *A. hydrophila* 'ya karşı engelleyici bileşenler ürettiği bildirilmiştir. Laktik asit bakterileri ile fermente edilen hububat taneleri rotiferlerin zenginleştirilmiş ortamında bakteriyel gelişmeyi sınırlandırmaktadır. Dondurarak kurutulmuş *L. plantarum* içeren ve karasal çiftlik hayvanları için kullanılan ticari bir probiyotiğin rotifer kültüründeki *A. salmonicida* oranını azalttığı bildirilmiştir (16).

Probiyotikler mide-duodenum bariyerlerinden geçerek dominant saprofitik mikrofloraya karşı antagonistik metabolitler üretilmelidir. Bu yetenekleri nedeniyle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi laktik asit bakterileri probiyotik olarak kullanılmaktadır (8).

Balığın bağırsak florasının *A. salmonicida*, *V. ordalii*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida* gibi patojenleri engelleyici etkisi diğer araştırmalarda incelenmiştir. Balığın bağırsak florasının patojenlere karşı engelleyici etkisi balığın sağlık durumu ile farklılık gösterir ve bu nedenle daha fazla araştırma gerektirmektedir.

## Probiyotik Olarak Kullanılan Türler

Akuakültürde, probiyotiklerle yapılan araştırmalar başlangıç evresindedir ve halen çok daha fazla araştırma gerekmektedir. Atlantik salmon balığı, Gökkuşaağı alabalığı, karides larvaları, kalkan balıkları, morina balığı, istiridye ve rotifer kültürlerinde probiontlar olarak test edilen ana gruplar Vibrionaceae, Pseudomonad, laktik asit bakterisi, *Bacillus* spp. ve maya türleridir (2).

Tablo 3. Balıklarda probiyotik olarak kullanılan bakteri türleri

| Bakteri türleri                 | Balık türleri     |
|---------------------------------|-------------------|
| <i>Bacillus toyoi</i> sporları  | Alabalık, rotifer |
| <i>Bacillus</i> spp. sporları   | Alabalık, rotifer |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>  | Alabalık, rotifer |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | Alabalık, artemia |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | Alabalık, artemia |
| <i>Vibrio pelagius</i>          | Alabalık          |

*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* ve *Bifidobacterium* türleri fizyolojik, biyokimyasal ve yaygın oldukları ekolojik ortamlar dikkate alındıklarında laktik asit bakterileri olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan *Bifidobacterium* cinsine ait türler genetik olarak düşük (< %50) G+C içerikleri nedeniyle diğerlerinden ayrılmasına rağmen, gerek fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri gerekse gastrointestinal bölgeler gibi yaygın olarak bulundukları doğal flora yönünden laktik asit bakteri grubunda değerlendirilmektedir. Laktik asit bakterilerinden probiyotik üretiminde kullanılanlar genellikle *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* cinsine ait türlerdir. Bu mikroorganizmaların ortak özellikleri kemoorganotrofik olmaları ve karbonhidratları fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların yüksek asitliğe ve safra tuzlarına dirençleri önemli seçim kriterlerindendir (13).

Bazı deneyler seçilen bakteri ilavesi ile balığın mikroflorasının niteliksel olarak kullanımını araştırmıştır. Yeni kuluçkadan çıkan kalkan larvalarının bakım suyuna yüksek sayıda *V. pelagius* ilave edilmiş ve bu bakterinin kolonize olarak larva bağırsağının büyük bir kısmının antoktan florası haline geldiği ortaya konulmuştur. Bu bağırsak florası kuluçka sonrası 16. güne kadar en az 10 gün için tanklarda *V. pelagius* görülmediğinde oluşmaktadır. Su içine probiyotik bakteri ilavesinin canlı yem vermeden önce yapılması gerektiği bildirilmiştir. Yoğun bir biçimde canlı yem kültürasyonu tuzlu su larvalarının ilk yemlenmesinde önemli bir patojen kaynağı

olabilir. Bu, yoğun besleme ve bakteriyel popülasyonun yüksek büyüme oranından kaynaklanmaktadır. Kalkan larvalarında ilk yemlemeye başladıktan sonraki hemolitik bakteri proliferasyonu ve yüksek larva ölümü arasındaki korelasyon bu durumu desteklemektedir. Canlı yem ile birlikte bakteri verilmesinin balık larvası için belirleyici olduğu belirtilmektedir. Balık larvasına belirleyici bakteri transferini azaltma çabaları veya bu belirleyici bakteriyel floranın değiştirilmesi deniz larva kültürünün daha ileriye doğru gelişmesi için önemlidir (2).

Balığın sindirim sisteminde *Carnobacterium* ve *Lactobacillus* gibi bakteriyel grupların artırılmasına yönelik bazı girişimlerde bulunulmuştur ki bu bakteriyel türlerin aktivitesini seçerek düzenleyen abiotik faktörler ile gerçekleştirilmiştir. Ancak bunlar bağırsak mikroflorasında normal olarak önemli bir kısmı teşkil ettiği halde balıkta laktik asit bakterilerinin probiyotik bir etki meydana getirmesi hayret vericidir. İlk yönelinen konu bağırsakta bunların zararsız kolonizasyon potansiyelidir. Sonra bunların mümkün olan faaliyet mekanizması dikkate alınır (10).

Atlantik salmon balıklarından izole edilen *Carnobacterium* spp. alabalıklar için potansiyel probiyotik olarak değerlendirilmektedir. In vitro çalışmalarda bu bakterinin *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela*, *Streptococcus milleri*, *V. anguillarum* ve *V. ordalii* 'ye karşı antagonistik etki göstermesine rağmen *Debaryomyces hansenii*, *Janthinobacterium lividum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* ve *Yersinia ruckerii* 'ye karşı antagonistik etki göstermediği belirtilmiştir (17).

Rotifer mikroflorası, kültürasyon ve zenginleştirme için kullanılan yem ve yöntemlere bağlıdır. *Cytophaga* ve *Flavobacterium* 'un dominant olduğu *Loliga vulgaris* unu ile bir gece zenginleştirmeden sonra *Pseudomonas* ve *Alcaligenens* dominantlığına kayma olmuştur. Flora kompozisyonu, flora ile kültür suyu arasındaki iyi bir uyumun göstergesidir. Bu *Branchionus plicatilis* tarafından bakteri alımının seçilebilir olmadığını göstermektedir. Bu nedenle rotifer kültüründe flora teşviki söz konusu olup, canlı yemin bakteriyel florası zararsız hatta yararlı bakteriyel flora ile değiştirilebilmektedir. Hem rotifer hem de artemia grazer bakterilerdir. Ve yoğun olarak probiyotik bakterilerin yenmesi ile canlı yemdeki belirleyici bakteriler değişebilmektedir. Probiyotik bakterinin canlı organizmalarla kontrollü olarak nakli söz konusu olabilmektedir (18).

Laktik asit bakterisi kültüründe büyüyen rotiferlerle yemlenen kalkan larvaları ile yapılan in vivo deneylerde, patojenik vibrio ile mücadele testinde bu etkene karşı dayanıklılığın arttığı belirlenmiştir. Ancak testten alınan sonuçlar 48-72 saat sonra kaydedilmiştir. Hippoglossus larvası ile yapılan in vivo deneyde sağlıklı yumurta keseli larvada belirgin flora bakterisi izole edilmiş ve yeni kuluçkadan çıkan larvanın inkübasyon suyuna ilave edilmiştir. Değişik gruplar içinde larvanın canlı kalmasında ve büyümesinde bir artış sağlanmıştır. Hem larvanın ortalama performansını hem de büyüme artışını geliştirebilecek faktörler yeni türlerin ticari hale getirilmesi için gereklidir. Bu nedenle deniz larva kültüründe bakteri verilmesi mikrobiyal problemler ile mücadele etmek için iyi bir yaklaşımdır. Laboratuvar şartları altında izole edilen bakteri türlerinin subkültürasyon riskine karşı duyarlı olunmalıdır. Bu durum türün özelliklerini değiştirerek bunların probiyont olarak kullanımını uygun olmayan bir hale dönüştürebilir (18).

Bazı yararlı bakterilerin insan, domuz, sığır ve kanatlı besinine uygulanması ile faydalı bir etki çok iyi belgelenmiştir. Diğer yandan bu tür probiyotiklerin akuakültürde kullanımı nispeten yeni bir kavramdır. Faydalı bakteri adayları ile uygulamaya yönelik araştırmalar akuakültürde hızla artmaktadır. Bazı araştırmalar, istiridye larvalarının büyümesinin zenginleştirme ortamına ilave edilen bazı bakteri karışımlarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. Bağırsak mikroflorasının, balığın sağlığı ve iyi durumda olmasında çok önemli bir rol oynadığı açıklık kazanmıştır. Balığın bağırsak florasına, daha fazla yarar sağlayabilecek mikroorganizmaların yerleştirilmesi konusuna ilgi artmıştır. Balığın sağlığı ve büyümesi konusunda sınırlı bilgi mevcut olmasına rağmen yoğun üreticilikte probiyotiklerin uygulanabileceğini gösteren bazı sonuçlar bulunmaktadır. *V. alginolyticus*, Atlantik salmonlarında yaygın bir patojen olmasına rağmen *A. salmonicida* ve *V. anguillarum* 'un neden olduğu hastalıkları azalttığı belirlenmiştir. *Limanda limanda* 'nın bağırsak ve deri mukozasında görülen bakteri türleri araştırılmış ve bunların balık patojeni *V. anguillarum* 'un büyümesini baskıladığı belirlenmiştir (4).

Günümüzde çok sayıda bakteriyel karışım preparatları bulunmakta olup performans artırıcı olarak balık yemlerine ilave edilmektedir. *Streptococcus faecium* bakterisinin ticari preparatları yem ile verildiğinde İsrail sazanının yem dönüşümünde ve büyümede artış sağlamıştır. Son dönemde su ilavesi olarak bakteriyel karışımlar kullanılmaktadır. *Bacillus* spp. ile ticari olarak hazırlanmış bakteriyel karışım, kanal kedi balığının bakım suyuna ilave edildiğinde üretimde ve canlı kalma oranında artış sağlanmıştır (9).

Balığın sindirim sisteminde, çevrelendiği sudan çok daha fazla sayıda mikroorganizma bulunmakta ve bu sayı  $10^8$  hücre/g kadar olabilmektedir. Kuluçkadan sonra Atlantik morina larvasının sindirim sistemine yumurtada bulunan aynı bakteriyel tür yerleşmiştir. Bu türlerin en önemlileri *Pseudomonas*, *Cytophaga* ve *Flexibacter* 'dir. Soğuk su balıklarının yumurta keseli larva evresinde, ilk yemleme sonrasında da kalacak ön bağırsak mikroflorasının oluşumu gerçekleşir. Bu nedenle probiyotiğin kuluçkadan sonra mümkün olduğunca kısa sürede ilavesi önemlidir. Bu şekilde canlı yeme geçmeden önce larva bağırsağında etkin bir yerleşim sağlanmış olur (2).

Erişkin deniz kalkan balığı ve pisi balığı *V. anguillarum* 'un büyümesini baskılayabilecek bakteriler barındırmaktadır. Belki de su, bu tür patojenlere karşı probiyont olarak faaliyet göstermektedir. Bağırsaktaki bakteri ile larvanın canlı kalma oranında bir korelasyon olmamasına rağmen, bağırsak florası kalkan larvasının canlı kalmasını belirlemede önemli bir rol oynamaktadır (12).

Son dönemlerde *A. salmonicida* ve Atlantik salmonlarındaki iki patojenik vibrio türünün neden olduğu hastalığın azalmasında *V. alginolyticus* türünün etkin olduğu belirlenmiştir. Bu probiyontun kullanımı ile bazen % 82'lik bir iyileşme ile çok daha iyi canlı kalma oranı elde edilmiştir. Bu bakteri türü, ekvatordaki bir karides kuluçkahanesinden izole edilmiş olup ılıman sulardaki türlere karşı test edilmiştir. Gram pozitif probiyotik bakterisinin, deniz balığı larvalarının (noktalı deniz alabalığı, çizgili kefal) canlı kalma düzeyini, büyüme oranını artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca balığın iç ve dış bakteriyel çevresindeki *Vibrio* spp. dominantlığının diğer Gram negatif ve pozitif bakterilere kayma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. *Pseudomonas fluorescens* türünün, patojenik *V. anguillarum* türü ile enfekte edilen 49 g 'lık gökkuşağı

alabalığının ölüm oranını azalttığı bildirilmiştir. *G. morhus* 'un sindirim sisteminden izole edilen laktik asit bakterisini (*C. divergens*) içeren kurutulmuş dondurulmuş diyetler morina balığının yavrularına verilir *V. anguillarum* ile muamele edildiğinde belirli bir düzeyde dayanıklılık elde edilmiştir. Diğer yandan salmon balığının sindirim sisteminden izole edilen laktik asit bakterisi *A. salmonicida* 'ya karşı dayanıklılığı artıramamıştır (12).

Rotiferler, çoğunlukla balık larvalarının yetiştirilmesinde kullanılan canlı yemlerdir. Bu nedenle bazı araştırmalar bunların mikrobiyal kalitelerini geliştirme yönüne doğru eğilmiştir. Rotifer ile bir araya getirilen probiyotik bakterilerin kalkan yavrularına zararlı olduğu gösterilmiştir. Ancak dezenfekte rotiferle probiyotik bakteri inkübasyonu kalkan balığının büyüme oranını artırmaktadır. Sağlıklı rotiferlerin ve kalkan balığının üretildiği yerlerde *V. alginolyticus* belirlenmiş ve yüksek düzeyde ölüm olan tanklarda *Aeromonas* spp. dominant olarak saptanmıştır. *L. plantarum*, *L. helveticus* rotifer için yem ilavesi olarak kullanılmıştır. *L. plantarum* ilavesi rotiferin popülasyon yoğunluğunu artırmakta, aerobik bakteriyel yükleri azaltmakta ve rotiferin diyetsetel değeriini artırmakta olup, *A. salmonicida* 'nın inhibisyonu aynı zamanda gerçekleşmektedir. Diğer bir laktik asit bakterisi *Lactococcus lactis* rotiferin büyümesini artırmakta ve *V. anguillarum* 'a karşı engelleyici etkisi bulunmaktadır. Bacillus sporları kalkan balığının ortalama ağırlığında artışa neden olmakta ve rotifer kültüründe *Vibrio* spp. üremesini engellemektedir (8).

Gramında 10<sup>9</sup> kob *L. rhamnosus* içeren yemlerin, Gökkuşığı alabalıklarını *A. salmonicida* 'nın neden olduğu furunculosis hastalığına karşı koruduğu bildirilmiştir. Balıklarda kullanılan probiyotiklerin insan kökenli olması gerektiği belirtilerek *L. rhamnosus* seçilmiştir (5).

Rotiferlerden izole edilen *Lactobacillus* / *Carnobacterium* türü, kalkan larvasının patojenik *Vibrio* spp.'ye karşı dayanıklılığını artırmaktadır. Ticari diyetlere kurutulmuş dondurulmuş olan *C. divergens* ilavesi *A. hydrophila* 'ya karşı salmon yavrularında dayanıklılığı artırmamıştır. Ancak benzer diyet ilavesi *V. anguillarum* 'a karşı Atlantik morina balığında ölüm oranını azaltmaktadır. Ayrıca rotiferlerden izole edilmiş *Lactobacillus* cinsleri alabalıklarda büyüme oranını artırmıştır (5).

Bioenkapsüle laktik asit bakterisi kalkan larvalarına verildiğinde canlı kalma düzeylerinde belirgin bir gelişme görülmüştür. Rotiferlere ve artemia larvalarına canlı veya inaktive olup olmadığı dikkate alınmadan *S. lactis* ve *L. bulgaricus* bakterileri ilave edilmiştir. Larval büyümede uygulanan bakteri grupları arasında sonuçsal bir fark olmamasına rağmen kontrol grubuna göre altı kat daha yüksek larval canlı kalma oranı elde edilmiştir (18).

Gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarında *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinus*, *Saccromyces cerevisia* kolonize olmuştur. Bu yüksek mayalar aerobik bakterilerin sayılarının azalmasına neden olmuştur. Bakteriyel etkenlerden kaynaklanan hastalıklara karşı yoğun olarak antibiyotik kullanımı bağırsakta kolonize olan bakteriler üzerinde baskılayıcı etki yapmakta ve probiyotik olarak kabul edilen maya türlerini teşvik etmektedir (19).

Pisi balığının bağırsak içeriğinden toplam 199 mikroorganizma izole edilmiştir. Bu türler arasında *Weissella hellenica* probiyotik özelliğe sahiptir. Çünkü *Edwardsiella*

*tarda*, *Pasteurella piscicida*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio anguillarum* gibi balık patojenlerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Pisi balığında kullanılan *Weissella hellenica*, antibakteriyel aktiviteye sahip, safra tuzlarına ve aside dirençli özellikle de tuza dirençlidir. Bu özellikleri nedeniyle pisi balığında büyüme artışı sağlanmıştır (1).

Balık patojeni olan *V. anguillarum* 'a karşı antibakteriyel etki gösteren *P. fluorescens* türü balık çiftliklerinde probiyotik olarak kullanılmaktadır. Pseudomonadlar canlı balıkların solungaç, deri ve sindirim kanalının mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturmakta ve nadiren de balık patojeni olarak kaydedilmektedirler. Pseudomonadlar balık patojeni bakteriler ve mantarları da içeren mikroorganizmalara karşı antagonistik etki göstermektedir. *P. fluorescens* 'in demirin sınırlı bulunduğu ortamda antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiş olup bu inhibisyonun siderofor üretimiyle ilgili olduğu belirtilmiştir. Siderofor üretimi Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* ve *V. anguillarum* için virülens faktörüdür (20, 4).

Presmolt döneminde Atlantik salmonlarında *Aeromonas salmonicida* nedeniyle meydana gelen ölüm oranı *P. fluorescens* 'in kullanımı ile azalmıştır (4).

Balıklarda laktik asit bakterilerinin büyümeyi teşvik edici etkisi de araştırılmıştır. Ticari probiyotikler yassı balık larvaları için rotiferlerin besinsel değerini artırır gözükmemekte ancak bakterilerin her bir türünün etkisi belli olmamaktadır. Yavruların büyüme oranına etkisi sazan balığında araştırılmış olmasına rağmen çipura, Atlantik morina ve som balığında araştırılmamıştır. Sindirim sisteminde kullanılan probiyotik mikroorganizmaların patojenlerle rekabeti ve bağışıklık sisteminin uyarımı konusundaki rolleri araştırılmayı beklemektedir. Karasal hayvanların bağışıklık sisteminin laktik asit bakterileri ile düzenlenebileceği belirtilmiştir. Farelerde *L. casei* tarafından spesifik olmayan bir savunma gerçekleşmiştir (Örneğin lizozim enzimi aktivitesi ile uyarılan makrofaj aktivasyonu). IgA üretimi de fareyi *Salmonella typhimurium* 'a karşı korumuştur. Fermente edilen süt laktik asit bakterileri *V. cholerae* 'ya karşı aşılama adjuvant olarak kullanılabilir. Bakteri ve virüslere karşı aşı geliştirmek için veya karinomaya neden olan maddelerin toksik etkisini azaltmak için dikkatler balığa yönelmiştir. Örnek olarak *Bifidobacterium thermophilum* 'dan elde edilen peptidoglukanın ağız yolu ile alınmasıyla sarıkuyruk balıklarının *E. seriolocida* 'ya karşı dayanıklılığının arttığı bildirilmiştir (16).

## Sonuç

Larvaya yararlı mikrobiyal karışım içeren sağlıklı bir ortam hazırlamak önemlidir. Bakım tanklarında bakterilerin elimine edilmesi veya kontrolü amacı ile antimikrobiyel maddelerin kullanımı büyük problemlere yol açabilir. Bu nedenle probiontlar büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak akuakültürde probiyotiklerin kullanımı ile ilgili bir çok soru cevapsız kalmaktadır. Eğer etkili ise nasıl işlem görürler. Stresli bir ortamda ve larvalar güçsüzken probiyotikler nasıl bir rol üstlenir. Bunlar patojenik olabilir mi? Örneğin *V. alginolyticus* bir probiyant olarak kabul edilmekte ancak bu bakterinin diğer türleri karideslerde ve levrek balıklarında vibriosis'e neden olmaktadır. Bir probiyotik tür, potansiyel patojenik türden nasıl ayırt edilebilir. Bu sorulardan birçoğu probiyotikler için değil aynı zamanda kültür şartları altındaki organizmalarla birlikte görülen bakteri için de cevaplanmamıştır. Birçok bakteri türü akuatik organizmalar



için probiyotik olarak kullanılmaktadır. Ancak bunların seçimi bilimsel verilerden çok tahmini gözlemlere dayanmaktadır. Şimdiye kadar elde edilen sonuçlar birçok durumda Őüphelidir. Eğer probiyotik türlerin kolayca seçilebileceği bazı özellikler tespit edilirse çok faydalı olabilir.

Patojenik bakterinin neden olabileceği hastalıklar probiyotik kullanımı ile önlenebilir veya azaltılabilir ki, bu balığı çok daha dayanıklı kılar. Probiyotiklerin besin veya vitamin sağlayarak balıkta direkt olarak büyümeyi teşvik ettiği kabul edilir. Ayrıca deneysel olarak probiyotiklerin balık büyümesini artırdığı da gözlenmiŐtir (18).

Laktik asit bakterileri balığın normal sindirim mikroflorasında dominant değildir, ancak bazı türler bağırsağa yerleŐebilirler. Diğer yandan düzenli yem alımı ile suni laktik asit bakteri populasyonunu yüksek düzeyde tutmak mümkündür. Bu tür yöntemlerin uygulanması kültürdeki balığın sağlık ve kalitesini geliştirmek için dikkate alınmalıdır. Zararsız laktik asit bakterilerinin Gram pozitif patojenlere karşı bağışıklık düzenleyici kaynaklar olarak kullanımı üzerindeki çalışmalar artırılmalıdır.

## Kaynaklar

1. Cai, Y., Benno, Y., Nakase, T., Oh, TK. 1998. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. J. Gen. Appl. Microbiol., 44; 311-316.
2. Gomez, B., Roque, A., Turnbull, J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture, 191; 259-270.
3. Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y., Oh, T.K. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol., 43; 305-308.
4. Muroga, K., Higashi, M., Keitoku, H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture, 65; 79-88.
5. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. and Bylund, G. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture, 198; 229-236.
6. Katırcıoğlu, H. 2001. Gökkuşağı alabalığı ve aynalı sazandan izole edilen laktik asit bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
7. Schrijver R.D., Ollevier, F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture, 186; 107-116.
8. Reuter, G. 2001. Probiotics- possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 114; 409-410.
9. Ashraf, A. 2000. Probiotics in fish farming- Evaluation of a candidate bacterial mixture. Licentiate thesis, 19 p.
10. Apan, T.Z. 2000. Mikrobiyolojide probiyotikler ve prebiyotikler. İnfeksiyon dergisi, 14; 579-583.
11. Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 180; 147-165.

12. Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. App. Environ. Microbiol. 65; 969-971.
13. Çakmakçı, L., Karahan, A.G., Çakır, İ. 2002. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. Gıda mühendisliği dergisi, 12; 15-19.
14. Gram, L., Lovold, T., Nielsen, J., Melchiorson., Spanggaard, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. Aquaculture, 199; 1-11.
15. Gatesoupe, F.J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. Aquaculture, 171; 1-14.
16. Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture, 160; 177-203.
17. Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrels, C., Williams, P., Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture, 185; 235-243.
18. Skjermo, J., Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 177; 333-343.
19. Andlid, T., Blomberg, L., Gustafsson, L., Blomberg, A. 1999. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7764 isolated from rainbow trout intestine. System Appl. Microbiol., 22; 145-155.
20. Holmstrom, K., Gram, L. 2003. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. J. Bacteriol., 185; 831-842.