

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Nafiye PERKER

**KARİDESLERDE (*Litopenaeus vannamei*) STOKLAMA
YOĞUNLUĞUNUN STRES İNDİKATÖRÜ OLARAK
HEMOLENF BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİ VE ISI
ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARİDESLERDE (*Litopenaeus vannamei*) STOKLAMA YOĞUNLUĞU-
NUN STRES İNDİKATÖRÜ OLARAK HEMOLEN BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERİ VE ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Nafiye PERKER

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

Bu Tez / / 2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Metin KUMLU
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Mahmut YANAR
ÜYE

.....
Prof. Dr. Mevlüt AKTAŞ
ÜYE

.....
Prof. Dr. Mehmet KIR
ÜYE

.....
Prof. Dr. O. Tufan EROLDOĞAN
ÜYE

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

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 215O006

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**KARİDESLERDE (*Litopenaeus vannamei*) STOKLAMA YOĞUNLUĞU-
NUN STRES İNDİKATÖRÜ OLARAK HEMOLENF BİYOKİMYASAL
PARAMETRELERİ VE ISI ŞOK PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Nafiye PERKER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Metin KUMLU
Yıl: 2018, Sayfa: 131
Jüri : Prof. Dr. Metin KUMLU
: Prof. Dr. Mahmut YANAR
: Prof. Dr. Mevlüt AKTAŞ
: Prof. Dr. Mehmet KIR
: Prof. Dr. O. Tufan EROLDOĞAN

Bu çalışmada iki ayrı deneme yürütülmüştür. I. Denemede; ön-büyütme döneminde, yüksek stoklama yoğunluklarının (200, 400 ve 800 adet/m²) karides yavrularında büyüme, yem tüketimi, farklı dokularda ısı şok proteinlerinin (HSP) gen ekspresyon seviyeleri (HSP70 ve HSP90) ve stres dayanıklılık toleransları (formalin, tuzluluk) üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular *Litopenaeus vannamei* yavrularının üç stoklama yoğunluğunda, sırasıyla, %77, %78 ve %82 yaşama oranları oranı ile 1.35, 1.09 ve 1.12 grama ulaştığını göstermiştir. Dayanıklılık stres testleri yüksek stoklamanın karideslerde hassasiyete neden olduğunu ortaya koymuştur. HSP70 ve HSP90 seviyeleri stoklama yoğunluğunun artışıyla yükselmiş, ancak 1-2 gün içerisinde regüle edilerek normal düzeye inmiştir. II. denemede ise; büyütme döneminde, resirküle sistemde (RAS) farklı stoklama yoğunluklarının (40, 80 ve 160 adet/m²) karideslerde stres oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla; büyüme, yem tüketimi, bazı hemolenf ve immünolojik parametreler ile ısı şok proteinlerindeki değişim araştırılmıştır. Tanklarda dört ay sürdürülen deneme sonunda, karideslerde yaşama oranlarının %62.0 ile %77.50 ve ağırlıklarının ise 18.31 ile 22.15 g arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışma yüksek stoklama yoğunluklarının 2. ay serum toplam protein ve trigliserit değerlerini etkilediğini, ancak 4. ayda bu etkinin ortadan kalktığını; 2. ve 4. aylarda immünolojik parametrelerin anlamlı bir fark göstermediğini; 2. ayda alınan hemolenf örneklerinde fagositik ve lizozim aktivitelerinin farklılık göstermediğini; HSP bulguları 2 kg/m² (4.74 kg/m³) biyomas seviyesinin karideslerde kronik stres yarattığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Pasifik beyaz karidesi, Stres, Lizozim, Fagositik aktivite, Isı şok proteini

ABSTRACT

Phd THESIS

THE EFFECTS OF STOCKING DENSITY ON HEMOLYMPH BIO-CHEMICAL PARAMETERS AND HEAT SHOCK PROTEINS AS STRESS INDICATOR IN SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Nafiye PERKER

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF AQUACULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Metin KUMLU
Year: 2018, Pages: 131
Jurry : Prof. Dr. Metin KUMLU
: Prof. Dr. Mahmut YANAR
: Prof. Dr. Mevlüt AKTAŞ
: Prof. Dr. Mehmet KIR
: Prof. Dr. O. Tufan EROLDOĞAN

Two separate experiments were conducted in this study. In the 1st experiment; at nursery stage, the effects of high stocking densities (200, 400 and 800 pcs per m²) on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) growth, feed consumption, gene expression levels of heat shock proteins (HSP) in different tissues (HSP70 and HSP90) and stress tolerance (formalin, salinity) were investigated. The results showed that shrimp post-larvae reached 1.35, 1.09 and 1.12 grams with 77%, 78% and 82% survival rates, respectively. Salinity and formalin stress tests have shown that high stocking leads to susceptibility in shrimp. HSP70 and HSP90 levels increased with the increase in stocking density, but were regulated to normal levels within 1-2 days. At grow-out stage, in order to determine whether different stocking densities (40, 80 and 160 pcs per m²) create stress in shrimps; growth, feed consumption, some hemolymph and immunological parameters and heat shock proteins were investigated in the 2nd experiment. At the end of the four month trial, it was determined that survival rate of the shrimp ranged from 62.0% to 77.50% and weights between 18.31 and 22.15 g. It was observed that high stocking densities affected serum total protein and triglyceride levels at 2 months, but this effect disappeared at 4 months. Immunological parameters did not show any significant difference at 2 or 4 months. In the hemolymph samples taken at 2 months, phagocytic and lysozyme activities did not differ. HSP70 and HSP90 findings revealed that biomass level of 2 kg/m² (4.74 kg/m³) caused chronic stress in shrimps.

Keywords: *Pacific white shrimp*, Stress, Lysozyme, Phagocytic activity, Heat shock protein

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu tezde, karideslerin yüksek stoklama yoğunluklarında bağışıklık sistemlerinin nasıl etkilendiğine dair yetiştiricilik parametreleri, formalin ve tuzluluk testleri, bazı biyokimyasal ve immünolojik parametreler ve ilaveten de farklı dokularda ısı şok protein (HSP) genlerinin görünüm seviyeleri (HSP70 ve HSP90) ayrıntılı olarak ele alınmış ve incelenmiştir. Tez iki ayrı deneme halinde kurgulanmış ve yürütülmüştür.

Birinci denemede, ortalama 0.65 g ağırlığında ön-büyütme aşamasında 30 gün süreyle üç farklı stoklama yoğunluklarında (200, 400 ve 800 adet/m²) yetiştirilen Pasifik beyaz karidesi (*L. vannamei*) yavrularında deneme sonu yaşama oranları, sırasıyla, %77, %78 ve %82 ve ortalama ağırlıklar ise 1.35, 1.09 ve 1.12 g olarak elde edilmiştir ($P>0.05$). Deneme sonunda uygulanan tuzluluk ve formalin stres testleri stoklama yoğunluğunun artışı ile yaşama oranlarının düştüğünü, diğer bir ifadeyle, yüksek stoklama koşullarında yetiştirilen karideslerde çevresel koşullara hassasiyetin arttığını ortaya koymuştur ($P<0.05$). İlk örneklemede (0. gün) HSP70 değeri 1.13 olarak belirlenmiş, 1 gün sonra tüm stoklama gruplarında bu değer sırasıyla, 1.44, 1.96 ve 1.88 seviyelerine yükselmiştir ($P>0.05$). Denemenin 3., 7. ve en son 30. günlerinde alınan örneklerde ise stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte HSP70 verilerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. HSP90 analizlerinde 0. gün örneklemede belirlenen 1.51'lik seviye, 1. günde stoklama yoğunluğundaki artışa paralel olarak artış göstermiş ve bu artış özellikle 800 adet/m² stok yoğunluğunda, 200 adet/m² stok yoğunluğuna kıyasla, 9-10 kat daha yüksek olarak gerçekleşmiştir ($P<0.05$). İlk günde, 400 adet/m² stoklama yoğunluğunda da, 200 adet/m² grubuna kıyasla, HSP90 seviyesi yaklaşık 2.5 kat yükselmiş, ancak istatistik bir farklılık belirlenememiştir ($P>0.05$). Gruplar arasındaki bu anlamlı farklılık 3. günde daha az belirgin hale gelmiş, ve 7. günde artan stoklama yoğunluğuna paralel bir artış görülmüş olsa da, gruplar arasında istatistiki bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). Denemenin 30. gününde

alınan üç farklı doku örneklerinin hiçbirinde de stoklama yoğunluğuyla ilintili bir eğilim belirlenememiştir. Bulgularımız hem HSP70 hem de HSP90 gen görünüm analiz sonuçlarının stoklama yoğunluklarıyla ilintili olarak artış gösterdiklerini, ancak özellikle HSP90'nın daha fazla etkilendiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, ön-büyütme döneminde 800 adet/m² (1-1.5 g boyutlarında) gibi test ettiğimiz en yüksek stoklama yoğunluğunun karideslerde HSP70 ve özellikle de HSP90 gen görünüm seviyelerini uyararak yükselttiği, ancak bu uyarımın 1-2 gün içerisinde azalarak seviyelerin tekrar normale dönerek regüle edilebildiği belirlenmiştir.

Tezin ikinci denemesinde, ortalama 1.06 g ile başlayan ve üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) 4 ay süreyle büyütülen karideslerde büyüme ve yem tüketim performans parametreleri araştırılmış ve ayrıca denemenin 2. ve 4. aylarında alınan doku örneklerinde (hepatopankreas, solungaç ve kas) HSP70 ve HSP90 gen görünüm seviyeleri ve ilaveten de alınan hemolenf örneklerinde bazı plazma biyokimyasal ve immünolojik parametreler incelenmiştir. Deneme sonunda; stok gruplarında yaşama oranları sırasıyla %77.50, %76.50 ve %62.00, deneme sonu ortalama karides ağırlıkları 22.15, 18.31 ve 19.93 g (P<0.05) ve SBO değerleri ise %2.55/gün, %2.39/gün ve %2.43/gün olarak hesaplanmıştır (P<0.05).

Denemenin 2. ayında gruplar bazında en yüksek serum toplam protein değeri 40 adet/m² stok grubunda belirlenmiş, bunu 80 adet/m² grubu ve ardından da 160 adet/m² grubu takip etmiştir ancak gruplar arasında istatistiki bir farklılık bulunamamıştır (P>0.05). Bu parametre 4. ayda yürütülen analizlerde istatistiksel farklılıklar göstermiş olmakla birlikte, bu farklılığın stoklama yoğunluğuyla ilişkili olmadığı görülmüştür (P<0.05). Stoklama grupları arasında 2. ayda belirlenen en yüksek serum trigliserit değeri 40 adet/m² grubunda belirlenmiş, bu grubu 80 adet/m² ve ardından da 160 adet/m² grubu izlemiştir (P<0.05). Diğer yandan, 4. ay analizlerinde en yüksek trigliserit değeri 160 adet/m² grubunda, en düşük değer ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir (P<0.05). 2. ay serum total protein ve trigliserit değerleri bu dönemde yüksek stoklama yoğunluklarının bu parametreleri etkilediğini, ancak 4. ayda bu etkinin ortadan kalktığını göstermiştir. Çalışmamızda

stoklama yoğunluğunun artışının tersine, 2. ayda protein ve trigliserit değerlerinin plazmada belirgin bir şekilde azalış göstermesi, bu besin kaynağının muhtemelen stresin giderilmesi amacıyla o dönemlerde tüketildiğini ortaya koymuştur. 4. ayda ölçülen total protein ve trigliserit değerleri arasında anlamlı farklılıkların çıkmamasının nedeninin uzun süreli stres koşullarına karideslerin adaptasyonu olduğu düşünülmüştür. Bulgularımız laktat değerlerinin bir stres kaynağı olarak kronik stoklama yoğunluğu ile anlamlı bir ilişki içerisinde olmadığını göstermiştir. Denemenin 2. ve 4. aylarında alınan örneklerde yapılan analizler ALP, AST ve ALT değerlerinin stoklama oranının artışı ile anlamlı bir ilişki göstermediğini veya gruplar arasında istatistiki farklar bulunmadığını göstermiştir ($P>0.05$). Elde edilen sonuçlardan, *L. vannamei*'de kronik stres faktörü olarak test edilen stoklama yoğunluklarının bu enzimler üzerinde önemli etkiler yaratmadığı sonucuna varılmıştır. Denemenizde elde ettiğimiz verilerden, karideslerin hemolenf toplam hemosit sayısı değerlerinin iki ay gibi uzun bir süreç içerisinde dengelenmiş olması itibarıyla kronik bir stres parametresi olarak değerlendirilemeyeceği anlaşılmıştır. Denemede iki ay süren stoklama yoğunluğu baskısı altında yetiştirilen Pasifik beyaz karideslerinde yapılan fagositik aktivite analizlerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiş, ancak fagositik indeks değerlerinde 160 adet/m^2 stoklama yoğunluğunda istatistik olarak düşük bir değer elde edilmiştir ($P<0.05$). Test ettiğimiz 160 adet/m^2 stoklama oranında karideslerin belirgin bir şekilde zayıf fagositik indeks göstermesi, bu grubun stres altında olduğunu ortaya koymuştur. Denemenin 2. ayında ölçülen hemolenf lizozim aktiviteleri yine büyük olasılıkla uzun süren deneme protokolünden kaynaklı olarak gruplar arasında bir farklılık göstermemiştir ($P>0.05$).

Denemenin 2. ve 4. ayında alınan doku örneklerinde HSP70 seviyesi için, yapılan analizler göstermiştir ki; 2. ayda hiçbir dokuda HSP70 seviyeleri, stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte anlamlı bir değişim göstermemiştir. Denemenin 4. ayında da bu durum değişmemiş, kas dokuda yapılan analizler haricinde, diğer dokularda HSP70 gen görünüm seviyeleri benzer bulunmuştur ($P>0.05$). Ancak, 4.

ay kas örneklerinde HSP70 seviyesi 40 adet/m² stok grubunda 0.78 iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.82, 160 adet/m² grubunda ise yaklaşık 3 katlık bir artış ile 2.59 seviyesine çıkmıştır (P<0.05). En yüksek stok grubunda görülen bu yükseliş HSP70 geninin muhtemelen artan karides biyoması (2 kg/m² veya 4.74 kg/m³) tarafından stres yaratmaya başladığı için indüklendiğini göstermiştir. Denemede sonuna kadar 160 adet/m² grubunda gerçekleşen biyomas artışının 40 adet/m² grubundan 2.87 kat ve 80 adet/m² grubundan ise 1.77 kat daha yüksek olduğu hesaplanmıştır.

Denemenin 2. ayında yapılan HSP90 analizlerinde sadece hepatopankreasta (HP) anlamlı bir değişim gerçekleşmiş ve bu dokuda stoklama yoğunluğunun artışına paralel olacak şekilde istatistiksel olarak belirgin bir artış belirlenmiştir (P<0.05). Bu noktada, 40 adet/m² stok grubunda HSP90 seviyesi 0.06 olarak hesaplanmış iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.62 ve ardından da 160 adet/m² grubunda ise 1.13 olarak ölçülmüştür. Buna göre en yüksek stok yoğunluğunda karideslerin HP dokusunda indüklenen HSP90 artışı, diğer gruplara kıyasla, 1.82 ile 18.83 kat daha yüksek çıkmıştır. 4. ay analizlerinde HP'deki HSP90 indüklenmesinin ortadan kalktığı, bunun yerine, sadece kasta stoklama yoğunluğu ile HSP90 gen görünüm seviyeleri arasında anlamlı bir ilişkinin bulunduğu fark edilmiştir. Deneme süresince karides biyomasının en üst noktaya çıktığı bu dönemde 40 adet/m² grubunda kas doku HSP90 seviyesi 0.16 olarak ölçülmüş iken, bu seviye 80 adet/m² grubunda 5.21'e (32.56 kat) ve 160 adet/m² grubunda ise 7.90 seviyesine çıkmıştır (49.38 kat, P<0.05). Genel olarak gerek HSP70 gerekse HSP90 analiz sonuçlarından, denememiz koşullarında test edilen en yüksek stoklama grubunda (160 adet/m²) elde edilen 2 kg/m² veya 4.74 kg/m³ biyomas koşullarında Pasifik beyaz karideslerinin stres yaşamaya başladıkları ve böyle yüksek stoklama koşullarında yetiştiricilik yapılmasının karideslerde bağışıklık sisteminde artan hassasiyet nedeniyle hastalıklarla karşılaşma riskini yükseltebileceği öngörülmüştür.

TEŞEKKÜR

Doktora öğreniminin her aşamasında sonsuz destek, anlayış ve yardımlarını esirgemeyen, denemenin planlaması ve kurgulanmasında sonsuz katkılarda bulunan danışmanım sayın Prof. Dr. Metin KUMLU'ya, denemeler boyunca yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. O.Tufan EROLDOĞAN'a, Doç. Dr. Hüseyin SEVGİLİ'ye, Doç. Dr. Mahir KANYILMAZ'a, Dr. H. Asuman YILMAZ'a ve Assist. Prof. Dr. Prapansak SRİSAPOOME'ye, Dr. Asuman BEKSARI'ya, Ar. Gör. Ece EVLİYAOĞLU'na, Ar. Gör. Miray ETYEMEZ BÜYÜKDEVECİ'ye, Ar. Gör. Merve SARIİPEK'e, Enes KINAY'a ve Derya DAĞDANAŞAR'a ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim ile oğluma, öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez TÜBİTAK tarafından 215O006 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
2.1. Penaeid Karideslerin İmmün Sistemi.....	9
2.2. Krustaselerde Stresörlerin Etkileri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	12
2.3. Krustaselerde Stoklama Yoğunluğunun Etkileri Üzerine Yapılan Çalışmalar	26
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Materyal	33
3.2. Metot.....	33
3.2.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının <i>Litopenaeus vannamei</i> 'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri.....	33
3.2.1.1. Deneme Dizaynı ve Yönetimi.....	34
3.2.1.2. Dayanıklılık Testleri	37
3.2.1.2.(1). Formalin Testi	37
3.2.1.2.(2). Tuzluluk Testi.....	37
3.2.1.3. Büyüme ve Yem Tüketimi.....	38
3.2.1.4. Isı Şok Proteinleri (HSP) Analizi	38

3.2.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi.....	41
3.2.2.1. Deneme Dizaynı ve Yönetimi.....	41
3.2.2.2. Su Kalitesi.....	43
3.2.2.3. Performans Ölçümü	43
3.2.2.4. Hemolenf Alımı ve Hemosit Sayımı.....	46
3.2.2.5. Analizler.....	47
3.2.2.5.(1). Biyokimyasal Analizler	47
3.2.2.5.(2). Fagositik Aktivite	48
3.2.2.5.(3). Lizozim Aktivitesi.....	49
3.2.2.5.(4). Isı Şok Proteinleri (HSP) Analizi	50
3.2.2.6. İstatistik Analizler	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1. Bulgular.....	53
4.1.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının <i>Litopenaeus vannamei</i> 'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri	53
4.1.1.1. Büyüme Performansı.....	53
4.1.1.2. Stres Testleri	55
4.1.1.2.(1). Formalin Testi	55
4.1.1.2.(2). Tuzluluk Testi.....	56
4.1.1.3. Isı Şok Proteinleri.....	58
4.1.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi.....	61
4.1.2.1. Su Kalite Parametreleri	61
4.1.2.2. Stoklama ve Yemleme	61
4.1.2.3. Biyokimyasal Parametreler	68

4.1.2.4. Bazı İmmünolojik Parametreler	75
4.1.2.5. Isı Şok Proteinlerinin Gen Ekspresyon Analizleri	76
4.2. Tartışma	84
4.2.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının <i>Litopenaeus</i> <i>vannamei</i> 'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri	84
4.2.1.1. Büyüme Performansı ve Yem Tüketimi	84
4.2.1.2. Stres Testleri	85
4.2.1.3. Isı Şok Proteinleri (HSP70 - HSP90)	86
4.2.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi	89
4.2.2.1. Büyüme Performansı ve Yem Tüketimi	89
4.2.2.2. Biyokimyasal ve İmmün Parametreler	92
4.2.2.3. Isı Şok Proteinleri (HSP70 - HSP90)	101
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	107
5.1. I. Deneme;	107
5.2. II. Deneme;	109
KAYNAKLAR	113
ÖZGEŞMİŞ	131



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	II. Denemede kullanılan yem formülasyonu.....	42
Çizelge 4.1.	Üç farklı stoklama yoğunluğunda dört hafta süreyle yetiştirilen karideslerin (<i>Litopenaeus vannamei</i>) deneme sonu performans değerleri.	55
Çizelge 4.2.	Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen tuzluluk ve formalin stres testlerinin neticesinde elde edilen yaşama oranları.....	58
Çizelge 4.3.	Denemenin farklı dönemlerinde örneklenen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) 0, 1, 3, 7 ve 30. günlerdeki HSP70 gen ekspresyon seviyeleri.	59
Çizelge 4.4.	Denemenin farklı dönemlerinde örneklenen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) 0, 1, 3, 7 ve 30. günlerdeki HSP90 gen ekspresyon seviyeleri.	60
Çizelge 4.5.	Katlı sistemde 4 ay süren deneme boyunca ölçülen ortalama aylık su parametre değerleri.....	61
Çizelge 4.6.	Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (<i>Litopenaeus vannamei</i>) deneme sonu performans değerleri.	68
Çizelge 4.7.	Üç farklı stok yoğunluğunda katlı tank sisteminde yetiştirilen karideslerde 2. ve 4. aylarda örneklenen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) bazı biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri.....	70

Çizelge 4.8. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) 2. ayda örneklenen karideslerin hemolenflerinde belirlenen lizozim aktivitesi (Unit/Protein), toplam hemosit sayısı ($\times 10^6$ hücre/mL), fagositik aktivite (%) ve fagositik indeks verileri.....	76
Çizelge 4.9. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m ²) yetiştirilen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) denemenin 2. ve 4. aylarında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri.....	77
Çizelge 4.10. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m ²) yetiştirilen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) denemenin 2. ve 4. aylarında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri.....	81

Şekil 3.1.	Farklı stoklama yoğunluklarında stoklanan Pasifik beyaz karidesinde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) büyüme, yem tüketimi, stres testleri ile stres parametrelerinden ısı şok proteinlerinin gen görünümünün analizlerinin yapılabilmesi için yürütülen denemenin kurulum aşaması.	35
Şekil 3.2.	Karides yavrularında yüksek stoklama çalışmasının (I. Deneme) yürütüldüğü ünite.....	36
Şekil 3.3.	Formalin ve tuzluluk testinden görüntüler.	38
Şekil 3.4.	Doku örneklemeşi.....	39
Şekil 3.5.	Projenin II. Denemesinin yürütülmesinde kullanılan ve iki katlı tank sisteminden oluşan deneme ünitesi. A: Rezervuar, ve Dalgıç Pompa, B: Otomatik Filtre, C: Biyofiltreler, D: Isı-pompası, E: Geri Dönüş Hattı Su Girişi, F: Katlı Sistemlerde Bulunan Karides Yetiştiricilik Tankları, H: Çökeltme Tankları, G: Katlı Sistemler Arası Yürüme Platformu	44
Şekil 3.6.	Katlı tank sistemlerinin yan profilden görünümü.....	44
Şekil 3.7.	II. Denemede kurulan ve RAS olarak kullanılan katlı tank sistemi.....	45
Şekil 3.8.	Katlı sistemde kullanılan tankların su ile doldurulması ve denemeye hazır hale getirilmesi.	45
Şekil 3.9.	Hemolenf alımı.....	47
Şekil 3.10.	Elisa okumaları için hazırlık aşamalarından görüntüler.	50
Şekil 4.1.	Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (<i>Litopenaeus vannamei</i>) deneme sonuna kadar elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır (n = 3 tank). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir (P > 0.05).....	53

- Şekil 4.2. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonuna kadar elde edilen ortalama ağırlık değerleri. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır (n = 3 tank). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$).54
- Şekil 4.3. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonuna kadar tüketilen grup ortalama günlük yem tüketim değerleri. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır (n = 3 tank). Farklı harflerle işaretlenen gruplar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).54
- Şekil 4.4. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen formalin stres testi esnasında elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır.56
- Şekil 4.5. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen tuzluluk stres testi esnasında elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır.57
- Şekil 4.6. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda elde edilen yaşama oranı (%). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).62

- Şekil 4.7. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda ortalama ağırlıkları (g/karides). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).63
- Şekil 4.8. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tank su seviyeleri düşürülürken çekilen görüntüleri.64
- Şekil 4.9. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda hasat edilirken çekilen görüntüleri.64
- Şekil 4.10. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tanktan elde edilen ortalama ürün miktarı (kg/tank). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).65
- Şekil 4.11 Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tankların her m²'sinden elde edilen ortalama ürün miktarı (kg/m²). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).65

- Şekil 4.12. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda her m³ su hacminde üretilen ortalama ürün miktarı (kg/m³). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).66
- Şekil 4.13. Hasat esnasında kepçede ve ele alınan karideslerin görüntüleri.....67
- Şekil 4.14. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonu YÇO değerleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$).67
- Şekil 4.15. Katlı sistemde yetiştirilen karideslerin hasat edildikten hemen sonra çekilen görüntüsü.....69
- Şekil 4.16. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 2. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen protein (g/dL), trigliserit (mg/dL) ve laktat (mmol/L) seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 6$ karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$).71
- Şekil 4.17. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 4. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen protein (g/dL), trigliserit (mg/dL) ve laktat (mmol/L) seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 6$ karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$).72

- Şekil 4.18. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (Litopenaeus vannamei) 2. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen ALP, AST ve ALT seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 6$ karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$)..... 73
- Şekil 4.19. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (Litopenaeus vannamei) 4. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen ALP, AST ve ALT seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 6$ karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$)..... 74
- Şekil 4.20. Üç farklı stok yoğunluğunda katlı RAS sisteminde büyütülen karideslerde 2. ayda alınan örneklerde belirlenen plazma lizozim aktivitesi. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 8$ karides). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$). 75
- Şekil 4.21. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (Litopenaeus vannamei) denemenin 2. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir ($n = 3$). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır..... 78

- Şekil 4.22. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 4. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır..... 79
- Şekil 4.23. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 2. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır..... 82
- Şekil 4.24. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 4. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır..... 83

SİMGELER VE KISALTMALAR

RAS	: Kapalı Devre / Resirküle Sistem
HSP (HSP70 - HSP90)	: Isı Şok Proteini
ALP	: Alkalın Fosfataz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
THS	: Toplam Hemosit Sayımı
WSSV	: Beyaz Benek Sendromu Virüsü
PO	: Fenoloksidaz Aktivitesi
SOL	: Solungaç
KAS	: Kas Dokusu
HP	: Hepatopankreas
TP	: Toplam Protein
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
SBO	: Spesifik Büyüme Oranı
PL	: Postlarva
YÇO	: Yem Çevrim Oranını
GBO	: Günlük Büyüme Oranı
CAK	: Canlı Ağırlık Kazancı
RNA	: Ribonükleik Asit
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
GYT	: Günlük Yem Tüketimi
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PA	: Fagositik Aktivite
PI	: Fagositik İndeks



1. GİRİŞ

Karides yetiştiricilik sektörü dünyada hızla büyümeye devam etmektedir. Günümüzde Dünya’da 60’ın üzerinde ülkede yetiştirilen karides miktarının 3.4 milyon tonun üzerine çıktığı ve üretimin ekonomik değerinin 13-15 milyar ABD Doları’nı bulduğu bildirilmektedir. Ülkemizde üretimi yapılan balıkların aksine, karidesler 3.5-4 ay gibi kısa bir sürede hızla büyüyerek pazarlama boyutlarına (20-25 g) kadar ulaşabilen su ürünleridir. Ancak, tropik kökenli olmaları itibarıyla bu canlıların kış ayları süresince soğuklarda üretimlerine devam edilebilmesi veya kışlatılabilmeleri için sera altında ekonomik ısıtma sistemleri (solar enerji, rüzgar enerjisi vb.) veya yeraltı ılık su veya jeotermal enerji kaynakları kullanılarak en ekonomik şekilde üretilibilmeleri büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle ülkemizde ticari ölçekte üretimlerine girilmeden önce karideslerin bu tip sistemlerde yüksek stoklama yoğunluklarında ve resirküle sistemler kullanılarak büyütülmeleri, bu esnada beslenmelerinde kullanılacak olan endüstriyel pelet yemlerin yüksek stabilitede ve düşük maliyetli hammaddelerle üretilmiş olması şarttır.

Karides yetiştiriciliği Dünya’da ağırlıklı olarak tropik ülkelerde (Tayland, Vietnam, Endonezya, Hindistan vb.) ve açık sistemler olarak tanımlanan akışkanlığı olan (flow-through) büyük toprak havuzlarda ve daha çok yarı entansif veya entansif stoklama koşullarında yürütülmektedir. Ancak, daha ılıman (ABD, Çin, Japonya, İspanya, İtalya ve Yunanistan) ve hatta soğuk ülkelerde (Almanya, Hollanda, Belçika vb.) üretim çok daha küçük sera/kapalı binalar (indoor) içerisinde resirküle (kapalı devre: RAS) sistemler kullanılarak yapılmaktadır. Bu tip yetiştiricilik sistemlerinde ticari olarak başarıyla kullanılabilen tek karides türü Pasifik beyaz karidesi olarak bilinen *Litopenaeus (Penaeus) vannamei*’dir.

Geleneksel olarak büyük toprak havuzlarda yapılan karides yetiştiriciliği için deniz kenarında büyük arazilere ihtiyaç duyulmaktadır. Oysa ülkemizin Akdeniz ve Ege kıyılarında özellikle çok hızlı gelişen turizm sektörü ve Doğu

Akdeniz'deki doğal hayatı koruma alanları nedeniyle karides yetiştiriciliği için geniş araziler bulmak neredeyse imkansız hale gelmiştir. Temelde kıyısal bölgeler için diğer sektörlerle (örneğin turizm) yaşanan sıkıntılar ve buna ilaveten ağırlığını her geçen yıl hissettiğimiz küresel ısınmayla birlikte önemi daha da artacak olan su kaynaklarının kullanımı ve yönetimi, yetiştiricilik modellerimizi çok daha az su kullanımına olanak sağlayan resirküle sistemlere doğru kaymaya zorlamaktadır. Diğer taraftan, geleneksel üretim metotlarının çevresel kirliliğe neden oldukları da dikkate alındığında, daha az su tüketerek akışkan havuz sistemlerine göre 100 kat daha az deşarj suyu vermeleri (Blancheton, 2000), ayrıca yetiştiricilik su kalite kriterleri üzerinde de tam kontrol imkanı sağlamaları RAS sistemlerinin avantajları arasındadır. Yapılan hesaplamalarda geleneksel olarak toprak havuzlarda yapılan entansif karides yetiştiriciliğinde 1 kg karides için yaklaşık olarak 20 ton deniz suyu kullanılması ve eğer arıtım işlemi yapılmaz ise bu miktar deşarj edilen kirli suyun doğaya bırakılması gerekmektedir (Losordo ve Simmons, 1994). Oysa bazı entansif karides yetiştiricilik sistemlerinde günlük %1-3'ten daha az su değişkenliği gerekmekte, hatta bazen sıfır su değişkenliği ile üretim yapılabilmektedir. Ancak bu sistemlerde yem kalitesinin yüksek olması ve yemlemenin doğru tekniklerle yapılması, yeterli havalandırma ve su sirkülasyonuna ilaveten doğal prodüktivite ve besin olarak nitrojen döngüsünün dikkatli bir şekilde yönetilmesi gerekmektedir. Doğru işletilen entansif sistemlerde 1 m³ havuz hacminden tek üründe 4 kg'ın (Cohen ve ark, 2005; Krummenauer ve ark, 2011) üzerinde hatta bazen 10-11 kg'a kadar (Reid ve Arnold, 1992; Davis ve Arnold, 1998) ürün (*P. vannamei*) alabilmek mümkün olmaktadır. Birim yetiştiricilik havuz alanından yüksek ürünlerin alınabilmesi için, karidesin hangi yoğunluklara kadar akut veya kronik stres yaşamadıklarını belirlemek üst stoklama limitinin anlaşılabilmesi açısından önem arz etmektedir.

Karides yetiştiriciliğindeki başarı temelde birim alandan elde edilecek üretimin arttırılmasına yönelik teknolojik gelişmeler ve havuz su kalitesinin sürdürülebilirliğine bağlıdır. Bina içi veya sera içi süper entansif üretim sistemleri

özellikle ılıman iklim kuşağında (ülkemiz gibi) yüksek stok yoğunluklarında ve mevsimlere bağlı kalmadan yıl boyu üretim yapabilme şansı verebilmektedir. Bu çeşit sistemlerde çoğu zaman hastalık bulaşma riski çok düşük olup, özellikle yararlı bakterilerin (probiyotikler) kullanımı ve atıkların kontrol altında tutulmasıyla önemli başarılar elde edilebilmektedir (Schock ve ark, 2013). Akdeniz'in Çukurova Bölgesi'nde düşük tuzlulukta ve 21-24 °C sıcaklıkta çıkan yer altı suları karides yetiştiriciliği için (özellikle de sera altında bulunan toprak veya beton havuzlarda) mükemmel fırsatlar sunmaktadır. Bu bölgede yapılan araştırmalarda yeşil kaplan karidesinin (*Penaeus semisulcatus*) yüksek stoklama yoğunluklarında iyi bir büyüme performansı göstermediği belirlenmiştir (Kumlu ve ark, 2003; 2010; Türkmen, 2007a,b). Bunun sebebinin ne olduğu net olarak henüz belirlenememiş olmasına rağmen elde edilen bulgular çerçevesinde bunun türsel bir özellik olduğu düşünülmektedir.

Uzunca yıllar ıslah edilmiş, hızlı büyüyen ve hastalıklara dirençli (spesifik pathogen-free; SPF) varyeteleri geliştirilmiş olan Pasifik beyaz karidesi dünyada yetiştiriciliği yapılmakta olan en önemli karides türüdür. Tatlı suda yetiştirilen karideslerde dahil olmak üzere, bu karides türünün global ölçekte gerçekleştirilen üretimdeki payı 2016 yılında %75 ve 2017-2018 yıllarında ise %76-77'yi bulmakta olup, üretim tonajı 3 milyon tonun altına inmemektedir (FAO, 2016). Son yıllarda penaeid karideslerin su ürünleri yetiştiriciliğindeki ekonomik önemi nedeniyle, birim alandan elde edilebilecek ürün miktarının arttırılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmış olup, bunun başarılabilmesi doğrudan stok yoğunluğuna bağlıdır. Bilindiği üzere, stok yoğunluğu büyüme ve hayatta kalma oranını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (Suriya ve ark, 2016). En uygun stoklama yoğunluğu, yetiştiricilik sistemi ve yönetim uygulamalarına bağlı olarak değişmekte (Ravuru ve Mude, 2014) ve ayrıca karides türlerinin yüksek stok yoğunluklarına verdikleri tepkiler de farklılıklar göstermektedir.

Literatürde farklı karides türlerinin farklı stoklama yoğunluklarının büyüme ve yem tüketim performansları araştırılmış (Rouse ve Davis, 2004;

Herrera ve ark, 2006; Gunalan ve ark, 2010; Kumlu ve ark, 2010; Balakrishnan ve ark, 2011; Sookying ve ark, 2011; Gaber ve ark, 2012; Shakir ve ark, 2014; Ravuru ve ark, 2014; Suriya ve ark, 2016), ancak bu stresörün plazma biyokimyasal ve immünolojik parametreler üzerine etkilerine daha az ilgi gösterilmiştir (Lin ve ark, 2015; Li ve Wang, 2016). Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalardan birinde Lin ve ark (2015), farklı stok yoğunluklarında (2, 10, 20, 30 ve 40 karides/L) yetiştirilen Pasifik beyaz karideslerinde *Vibrio alginolyticus* enfeksiyonu neticesinde hemosit sayımı, fenoloksidaz aktivitesi (PO), süperoksit dismutaz ve lizozim aktiviteleri ile hemolenf proteini de dahil olmak üzere tüm immün parametrelerin stok yoğunluğu ve zamanla negatif olarak ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Diğer bir araştırmada, Li ve Wang (2016), Çin karidesinde (*Fenneropenaeus chinensis*) çözünmüş oksijen seviyesi ve stok yoğunluğunun (50, 200 ve 600 adet/m³) büyüme ve spesifik olmayan (doğal) bağışıklık parametreleri üzerine olan etkilerini araştırmışlar ve neticede süperoksit dismutaz, peroksidaz, antibakteriyel aktivite, lizozim ve hemolizin aktivitelerinin çözünmüş oksijen seviyelerinden önemli ölçüde etkilendiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar karideslerde stok yoğunluğunun artmasıyla birlikte büyüme, hayatta kalma oranı, yem çevrim etkinliği ve PO enzim aktivitesinin azaldığını, bunun aksine yem tüketimi ve peroksidaz enzim aktivitesinin arttığını ifade etmişlerdir. Dolayısıyla, üstte belirtildiği gibi, bir stresör olarak stoklama yoğunluğunun *L. vannamei*'nin plazma biyokimyasal ve immünolojik parametreleri üzerine olan etkileri ilk kez bu tezde bu kadar kapsamlı olarak ele alınmıştır.

Sıcaklık veya diğer çevresel stres kaynaklarının herhangi birinde ani bir artış spesifik bazı proteinlerin sentezlenmesine neden olur ki bunlara ısı şok proteinleri (HSP) denmektedir. HSP'lerin iyi bir stres indikatörü olarak kullanılabileceği bilinmektedir (Sanders, 1993). HSP ailesinden en çok çalışılan ısı şok proteininin HSP70 olduğu ve bu proteinin sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride protein taşınımına katıldığı; stres altındaki proteinleri koruduğu ve protein katlanmasında rol aldığı (Ojima, 2005); HSP90'nın ise

endoplazmik retikulumda en fazla bulunan ısı şok proteini olduğu ve sinyal yollarında, proteinlerin katlanmasında ve tümör yayılımının engellenmesinde görev aldığı (Lindquist ve Craig, 1988) ve ayrıca HSP70 ile birlikte hücre ölümü, farklılaşması ve hücre homeostasisinin devamlılığı konusunda rol aldığı bildirilmektedir (Bukau ve ark, 2005; Mayer ve Bukau 2005).

Stoklama yoğunluğu doğrudan sucul canlıların yaşam konforunu ve üreticinin birim alandan elde edeceği ürün miktarını etkileyen önemli parametrelerdendir. Optimal stok yoğunluğu sucul canlılarda iyi bir büyüme oranının ekonomik olarak sürdürülebildiği ve aynı zamanda su kalite kriterlerini olumsuz etkilemeyen yoğunluk olarak tanımlanmaktadır. Aşırı stoklamada büyüme çoğu zaman düşer ve ayrıca karideslerin davranışları ve bağışıklık sistemi de bu faktörden olumsuz etkilenebilir. Son zamanlarda Pasifik beyaz karidesinde termal stres, pH dayanıklılık testi, ağır metal testi (Qian ve ark, 2012) ve bakteriyel dayanıklılık testi (Zhou ve ark, 2010) neticesinde, bu çevresel stres faktörlerinin akut etkilerinin veya uzun açlık periyodu ve ardından yeniden beslemenin (Lin ve ark, 2012) farklı HSP gen ekspresyonlarına (HSP60 ve HSP70) etkileri çalışılmıştır. Yüksek stoklama yoğunluklarında karideslerin strese girdiği ve bunun da gerek yaşama oranı gerekse büyüme performansına etki ettiği düşünülmektedir. Ancak, karideslerde stoklama yoğunluğunun stres oluşturduğuna (akut veya kronik) ve bunun farklı dokularda (et, solungaç ve hepatopankreas) HSP'lerin sentezlenmesine yol açtığına dair bugüne kadar son derece sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca, yine karideslerin bağışıklık sistemlerinin yüksek stok yoğunluklarında nasıl etkilendiğine dair stres testleri ile hemolenf ve immünolojik parametreler üzerine etkileri de henüz karideslerde çalışılmamıştır. Bu tez ile ekonomik değeri yüksek olan ve yetiştiricilikte tercih edilen *L. vannamei*'nin üstte belirtilen stoklama yoğunluğu ile bunun neden olduğu stres arasındaki ilişkisi konusundaki eksiklikleri gidermeyi ve ülkemizde resirküle sistemlerde karides yetiştiricilik potansiyelinin daha da net bir şekilde ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

Entansif stok koşulları gibi uzun süreli stres (kronik) durumlarında fizyolojik denge kurulamaz (en azından uzunca bir süre için) ve hastalıklara direnç azalır; üreme ve büyüme de bundan olumsuz etkilenir (Van Weerd ve Komen, 1998). Yüksek stoklama koşullarında su kalitesinde gerçekleşen düşüşlerin de su canlılarında büyümeyi olumsuz etkilediği, yem alımını ve yemden yararlanmayı düşürdüğü bilinmektedir. Kronik stresin giderilmesi, su canlılarının sağlık durumu ve büyüme performansı açısından su ürünleri yetiştiriciliğinde (akvakültürde) büyük önem taşımaktadır. Stres durumunda yüksek enerji ihtiyacı nedeniyle oksijen taşıma kapasitesinin artmasından dolayı kırmızı kan hücreleri ve hematokrit düzeyleri artış gösterir (Montero ve ark, 1999). Yapılan çalışmalarda, artan stok yoğunluğunun balıklarda metabolik ve antioksidan enzimlerinin miktarını azalttığı ve aksine stres ile ilintili proteinlerden HSP70'i yükselttiği belirlenmiştir (Aksakal ve ark, 2011). Bu araştırmacılar gökkuşağı alabalığı ile yaptıkları bir çalışmada, 15, 20, 25 ve 30 kg/m³ stok yoğunluklarını test etmiş ve en yüksek stok yoğunluklarında HSP70'in ekspresyon seviyesinin yükseldiğini ve dolayısıyla kas dokuda ölçülen bu değerlerinin balıkta ciddi bir stres yaşandığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Dil balığı (*Solea senegalensis*) juvenillerinde yapılan bir çalışmada yüksek stoklama yoğunluklarında HSP70 ve HSP90 gen ekspresyonlarına bakılmış, denemede balıkların yeterli bir büyüme gösterdiği, ancak bu koşullarda ölçülen plazma kortizol seviyesinin stoklama ile ilgili stresten kaynaklanabileceği ve bunun da bazı genlerin ekspresyonlarını olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (Salas Leiton ve ark, 2010). Karides türlerinin, stoklama yoğunluğu ile HSP gen görünüm seviyeleri arasındaki ilişkisi konusu oldukça az sayıda bilimsel çalışmaya konu edinilmiştir.

Yukarıda verilen bilgiler çerçevesinde, bu doktora tez çalışması ilk kez bu kadar detaylı bir şekilde *L. vannamei*'de bir stres kaynağı olarak stoklama yoğunluğu ile plazma biyokimyasal ve immünolojik parametreler ile farklı dokularda indüklenen HSP gen görünümleri arasındaki ilişki üzerine odaklanmış

ve üstte belirtilen eksilikleri gidermek amacıyla, aşağıda belirtildiği şekilde, iki deneme halinde kurgulanmış ve yürütülmüştür.

I. Denemede; yavru büyüme döneminde (önbüyütme) farklı stok yoğunluklarında karideslerde (*L. vannamei*) büyüme ve yem tüketim performanslarının yanı sıra 0. 1. 4. 7. ve 30. günlerde alınan örneklerde, tüm vücut/kas dokuda ısı şok proteinleri (HSP70 ve HSP90) seviyelerine bakılmış ve ayrıca deneme sonunda formalin ve tuzluluk dayanıklılık testleri ile yavruların dirençleri araştırılmıştır.

II. Denemede ise; farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen karideslerde büyüme ve yem tüketim performansları, ısı şok proteinleri (HSP70 ve HSP90) ve bazı biyokimyasal ve immün parametrelerin analizleri [(total protein, laktat, trigliserit, lizozim aktivitesi, fagositik aktivite, alkalın fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST) ile alanin aminotransferaz (ALT)] araştırılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada Pasifik beyaz karidesinde stres kaynağı olarak (stresör) stoklama yoğunluğunun büyüme, yem tüketimi, dayanıklılık testleri (formalin, tuzluluk) ve bazı fizyolojik ve immünolojik hemolenf parametreleriyle birlikte ısı şok proteinlerinin görünümleri üzerine etkileri araştırıldı. İçin, tezin bu bölümünde, yürütülmüş olan bilimsel araştırmalar üç alt başlık halinde özetlenmiştir.

2.1. Penaeid Karideslerin İmmün Sistemi

İmmün sistem doğal ve edinsel immünite olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Omurgalılarından farklı olarak karidesler sadece doğal immüniteye sahip olan sucul canlılardır. Omurgasızlar olarak karideslerin doğal immünitesi, patojenlere karşı hızlı ve etkili bir savunma mekanizması görevi görmektedir. Karideslerin immün sistem hemositleri (enkapsülasyon, nodül oluşumu ve fagositoz), çeşitli plazma bileşenlerini (antimikrobiyal peptitler, histonlar, lizozomal enzimler, lipopolisakkaritler, β -1,3-glukan bağlanma proteinleri ve tanıma molekülleri) ve multimerik sistemleri (pıhtılaşma protein kaskadı, profenoloksidaz sistemi) içermektedir (Aguirre-Guzman ve ark, 2009). Karideslerin doğal immünitesini fiziksel bariyerler, hücresel immün sistem ve humoral immün sistem olmak üzere üç başlık altında incelemek mümkündür.

a) Fiziksel Bariyerler: Karides üzerindeki ilk savunma hattını oluşturmakta, yaralanma ve mikrobiyal saldırılardan koruyan sert bir dış iskeletten oluşmaktadır. Ekzoskeleton (dış kabuk), kalsiyum karbonat, karbonhidratlar ve proteinlerden oluşmakta ve bağışıklık tepkisi ile ilişkili fizyolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır (Mylonakis ve Aballay, 2005).

b) Hücresel İmmün Sistem: Karidesler mavi-yeşil renkli hemolenf ile açık bir dolaşım sistemine sahiptir. Hematopoez, konakçı savunma ve homeostaz üzerindeki rolleri gösteren doğuştan gelen bağışıklık sistemi için olgun efektör

hücrelerinin kaynağıdır. Kan hücresi oluşumu, belirli alt akış sinyalleşme kaskadlarının aktivasyonu ile sonuçlanan ekstra ve hücre içi belirtiler ile düzenlenir. Kabuklularda hematopoetik doku, midenin dorsal ve dorsolateral taraflarında, anten arterine yakın ve maksillipedlerin tabanında yer alan geniş paketlenmiş bir lobul ağdır. Hemositler bu tübüllerin duvarları içinde üretilir ve damar lümenlerine salınır (Soderhäll ve ark, 2003). *Penaeus monodon* ve diğer penaeid karideslerin hematopoetik dokuları farklı bölgelerdeki mide, maksilliped ve antennal bezlerdedir. Penaeid karides hemositleri (granül, yarı granül ve hiyalin kan hücreleri) omurgalı makrofaj, granül ve doğal öldürücü hücreler ile aynı biyolojik özelliklere ve fonksiyonlara sahiptirler (Van de Braak, 2002). Bu hücreler fagositoz, enkapsülasyon, nodül oluşumu, yara onarımı, pıhtılaşma ve profenoloksidaz aktivasyonuna katılırlar. Ayrıca adezyon moleküllerinin, aglutininlerin ve antimikrobiyal peptitlerin üretimine de yardımcı olurlar (Destoumieux ve ark, 1997; Bachere ve ark, 2000). Hemositler ayrıca proteolitik kaskadı düzenlemek için gerekli olan inhibitör enzimlere sahip olmakla birlikte, aşırı uyarım ve sonuçta meydana gelen doku hasarını önlerken, aynı zamanda lizozim, fosfataz, esteraz, fosfolipaz, peroksidaz, proteaz gibi sitotoksik moleküller üretmektedir (Van de Braak, 2002; Johansson ve ark, 2000).

Karides hemolenfinde hiyalinosit, granülosit ve yarı granülosit olmak üzere üç adet hemosit sınıfı vardır. Hiyalinositler, küçük ve geri dönüşsüz, sitoplazmalarına göre küçük bir çekirdeğe ve çok az sitoplazmik granüle sahip olan veya hiç sitoplazmik granüle sahip olmayan hücrelerdir. Bu hücrelerin başlıca rolü pıhtılaşma ve fagositoz ile ilgilidir (Zhang ve ark, 2006). Granülositler en küçük çekirdeğe ve çok sayıda sitoplazmik granüle sahiptir. Bu hücreler profenoloksidaz enzimini depolar ve fagositik aktivite gösterirler. Granülositler, ekzositozu ve enzim salınımını provoke etmek için β -1,3-glukanlar, peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler ile uyarılabilir. Fonksiyonları profenoloksidaz kaskadı ve fagositozu başlatan enkapsülasyondur (Zhang ve ark., 2006). Yarı-granülositler, omurgalı granülositlerine benzer çok sayıda küçük granüllere sahiptir. Bu hücreler,

β -1,3-glukan reseptörlerine sahip olup başlıca işlevleri fagositoz, enkapsülasyon ve pıhtılaşmadır (Martin ve Graves, 2005; Zhang ve ark, 2006).

c) Humoral İmmün Sistem: Karideslerde humoral immün yanıt, karideslerin savunma sisteminin önemli bir parçası olup, patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Tassanakajon ve ark, 2018). Omurgasızlarda bağışıklık yanıtı sırasında hücreler arası iletişim sistemi hakkında çok az bilgi vardır (Nappi ve Ottaviani, 2000). Humoral immün yanıtta hemolenf içindeki makromoleküller aracılık eder. Karideslerde humoral immün sistem tanıma molekülleri, antimikrobiyal peptitler ve lizozomal enzimlerden oluşmaktadır. Tanıma molekülleri lektinler [profenoloksidaz sisteminin aktivasyonunu teşvik eden karbonhidratları tespit edebilen, ilkel tanıma molekülleri olarak kabul edilir (Wang ve ark, 2001)], patern tanıma proteini [biyolojik işlevleri bir protein kaskadı ve / veya savunma mekanizmalarının sinyalizasyon yollarının başlatılması ve hemolenf sistemi istilacılarının ortadan kaldırılmasını sağlar (Aguirre-Guzman ve ark, 2009)], lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve toll benzeri reseptörlerden (doğuştan gelen bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan protein sınıfı) oluşmaktadır. Antimikrobiyal peptitler, omurgasızların patojenlerine karşı önemli bir unsurdur. Bu peptitler, bakterilerin, mantarların, parazitlerin, zarflı virüslerin ve hatta kanser hücrelerinin hücre zarlarında gözenekler oluşturarak kararsız iyonları ve enerjiyi provoke eder (Hancock, 1998; Bulet ve ark, 1999; Lehrer ve Ganz, 1999). Lizozomal enzimler, doğuştan gelen bağışıklık ve fizyolojik aktivitelerde önemli rol oynayan, omurgasız hayvanların doğal bağışıklık sistemlerinde bakteriyel patojen invazyonuna karşı direnmek için bir engel olarak işlev gören ilk sıra savunucu bir proteindir. Bu enzimler bakteri ve bakteriyofajlardan funguslara, bitkilere ve hayvanlara kadar çeşitli organizma gruplarının ürettiği bakteriyolitik bir enzimdir (Bathige ve ark, 2013).

2.2. Krustaselerde Stresörlerin Etkileri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Hall ve Ham (1998), çalışmalarında siyah kaplan karidesinde (*P. monodon*) farklı stres türlerinin hemolenf glukozuna etkisini 4 hafta süreyle 9, 23, 36 ve 50 karides/m² stok yoğunluğundaki tanklarda araştırmışlardır. Denemede ortalama kan glukoz konsantrasyonlarının 1.1 ile 1.3 mmol/L arasında değiştiğini ve bu değerlerin başlangıçtaki glukoz seviyelerinden önemli ölçüde farklı olmadığını kaydetmişlerdir. Araştırmacılar, karidesleri 10 dakika su dışında beklettikten sonra veya çözünmüş oksijenin 6.5 mg/L'den 2.1 mg/L'ye düşürdüklerinde ise hemolenf glukoz seviyelerinin önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Karbondioksit ile suyun pH'sının 8.5'tan 5.9'a düşürülmesi, çözünmüş oksijenin 6.6 mg/L'den 5.9 mg/L'ye azaltılması ile glukoz düzeylerinde 1.1'den 2.3 mmol/L'ye hızlı ve belirgin artışlar elde etmişlerdir. Buna karşılık, sülfürik asit ile su pH'sının 8.3'den 5.9'a düşürülmesiyle glukoz seviyelerinde önemli bir değişiklik meydana gelmediği sonucuna varmışlardır.

Song ve ark (2003), Pasifik beyaz karidesinde (*L. vannamei*), karides immün tepkilerini ve yaşama oranını değerlendirmek için Taura sendromu virüsünü enjekte etmişler ve bu muameleye karideslerin verdiği bazı fizyolojik tepkileri araştırmışlardır. Taura sendromu virüsü ile enfekte olan karideslerde, THS, hiyalinosit ve granülosit hücre sayıları, total plazma proteini ve hemosiyanin oranının kontrol grubuna göre sırasıyla, %21, %24, %17, %56 ve %67'ye kadar düştüğünü kaydetmişlerdir. Taura sendromu virüsü ile enfekte olan karideslerde plazma PO aktivitesinin önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir.

Pan ve ark (2003), astaksantin ilave edilmiş yem ile besledikleri siyah kaplan karidesi (*P. monodon*) juvenillerinin amonyak stresine karşı direncini araştırmışlardır. Karideslerin antioksidan kapasite parametrelerini hemolenfosit total antioksidan ve süperoksit dismutaz olarak, kimyasal stres direncini hayatta kalma oranı, AST ve ALT ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 8 hafta boyunca astaksantin ile besledikleri karidesleri 0.02, 0.2, 2.0 ve 20 mg/L amonyak değerlerine 72 saat süresince maruz bırakmışlardır. Astaksantin ile beslenen

karideslerin hayatta kalma oranının, 20 mg/L dozu dışında, her amonyak seviyesi için kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Astaksantin ile beslenenlerde 0.02 mg/L'den daha yüksek amonyak seviyelerinde daha yüksek total antioksidan ve tüm amonyak seviyelerinde de daha düşük süperoksit dismutaz seviyeleri belirlemişlerdir. Muamele grubunda AST'nin amonyak stresinin tüm seviyelerinde kontrol karideslerine göre düşük olduğunu ALT'nin ise düşük veya eşit olduğunu bildirmişlerdir.

Chien ve ark (2003), astaksantin ilave edilmiş yem ile besledikleri siyah kaplan karidesi (*P. monodon*) juvenillerinin fiziksel strese karşı direncini araştırmışlar; antioksidan kapasite parametrelerini total antioksidan ve süperoksit dismutaz aktivitesi ile termal ve ozmotik stres direncini stres sonrası yaşama oranı (recovery rate), AST ve ALT ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 8 hafta boyunca 0 ve 80 mg/kg ile desteklenmiş yemle besledikleri karides juvenillerini 5 dakika boyunca ani sıcaklık (27°C'den 0°C'ye) ve tuzluluk (%32'den %0'a) değişikliklerine maruz bırakmışlardır. Astaksantin katkılı yemlerle beslenen karideslerde (%56) kontrol grubuna (%48) kıyasla daha yüksek yaşama oranı ve daha yüksek termal ve ozmotik stres direnci tespit etmişlerdir. Ayrıca, yemde astaksantin varlığı ile total antioksidanın düzeldiğini ve süperoksit dismutazın azaldığını tespit etmişlerdir. Kontrol grubundaki karideslerde hemolenf AST değerinin, test gruplarındakinden önemli derecede daha yüksek olduğunu, karides hepatopankreas fonksiyonlarının yemdeki astaksantin ile iyileşmiş olabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte karidesteki hemolenf AST ve ALT içeriğinin sırasıyla termal ve ozmotik stresleri takiben karides sağlığının iyileşmesini yansıtmadığı sonucuna varmışlardır.

Zhenyu ve ark (2004), farklı stres kaynaklarının (sıcak veya soğuk şoku ile *Vibrio anguillarum* ile WSSV uygulaması) Çin karidesinde (*Fenneropenaeus chinensis*) ilk kez farklı dokularda ısı şok protein (HSP70) görünümünü etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, sıcaklık şoku ve WSSV stres uygulamaları ile HSP70'in hepatopankreas ve solungaçlarda belirgin olarak indüklendiğini, ancak kas, gözsapı ve hemolenfte ise gözlemlenmediğini kaydet-

mişlerdir. Soğuk şok ve WSSV muamelesinin, inceledikleri tüm dokularda HSP70 seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varmışlardır. HSP70 indüksiyonunun karideslerde, ortam sıcaklığının 10°C akut olarak arttırıldığı durumlarda ve uygulamadan 2 saat sonra en yüksek değere çıktığını belirtmişlerdir.

Yıldız ve Benli (2004), sublethal (ölümcül düzeyin altında) nitrit konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları kerevitlerde (*Astacus leptodactylus*) hemolenf nitrit, THS ve glukoz seviyelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar nitrite maruz bıraktıkları kerevitlerde hemolenf nitrit seviyesinin doğrudan arttığını, sonrasında nitrit içermeyen suya aktarıldıklarında ise hemolenfteki nitritin azaldığını kaydetmişlerdir. Nitrite ek olarak, klorüre maruz bıraktıkları kerevitlerde, hemolenfte nitrit birikiminin sadece nitrite maruz bıraktıkları karideslerle kıyaslandığında nispeten daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. THS'lerin, nitrit muamelesine tepki olarak azaldığını ve genel olarak nitrit içermeyen suya maruz bıraktıklarında arttığını kaydetmişlerdir. Klorür ve nitrit uygulamaları sonrasında kerevitlerde düzelme sonucunda THS'lerin ve nitrit uygulamasını takiben hemolenf glukoz seviyelerinin yükseldiğini belirlemişlerdir.

Alsen (2005), tatlısu kerevitlerinde (*Astacus leptodactylus*) serotonin (5-HT) etkisinin stres üzerine etkilerini çalışmış ve bu hormonun dolaşımdaki glukoz seviyesinin yükselmesine, ancak hemosit hücrelerinde önemli bir artışa sebep olmadığına dair bulgular bildirmiştir.

Qing ve ark (2005), tuzluluk ve pH'nın, Pasifik beyaz karideste bağışıklık tepkisi üzerine etkisini 12-15 gün boyunca incelemişler ve çalışmada %5-30 arasında olan tuzluluk ve yaklaşık 7.0-9.5 pH değerlerinin hemosit sayımı, PO aktivitesi, bakteriyolojik aktivite ve antibakteriyel aktiviteyi etkilediği sonucuna varmışlardır. PO aktivitesi 12. saatte zirve yaparken, bakteriyolojik aktivite ve antibakteriyel aktivitenin ise düşük olduğunu kaydetmişlerdir. Tuzluluk testinin 6. günden 15. gününe kadar, her tuzluluğa ait hemosit sayısının sabit, ancak kontrol grubundan önemli ölçüde düşük olduğunu; aynı dönemde PO'nun, bakteriyolojik

ve antibakteriyel aktivitenin belirgin değişiklikler gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Karidesler pH değişkenliklerine maruz bırakıldıktan sonra hemosit sayısının ve antibakteriyel aktivitenin yavaş yavaş azaldığını, PO'nun 12. saatte zirveye ulaştığını, ancak bakteriyolojik aktivitenin düştüğünü kaydetmişlerdir.

Wang ve Chen (2005), Pasifik beyaz karideslerin bağışıklık yanıtını ve farklı tuzluluk düzeylerinde *Vibrio alginolyticus*'a duyarlılığını incelemişler; %25 tuzlulukta deniz suyunda bulunan karideslere *V. alginolyticus* (1×10^4 cfu/karides) enjekte etmişler ve sonra %5, 15, 25 (kontrol) ve 35 tuzlulukta sulara nakletmişlerdir. 24-96 saat süresince, bakteri enjekte ettikleri karideslerin %5 ve 15 tuzlulukta ölüm oranının %25 ve %35 tuzlulukta tutulan karideslere göre önemli derecede yüksek olduğunu, en yüksek ölüm oranının ise %5 tuzlulukta görüldüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmacılar %25 tuzlulukta tuttıkları karidesleri %5, 15, 25 (kontrol) ve %35 tuzlulukta sulara transfer etmişler ve 12-72 saat sonra THS, PO, süperoksit dismutaz aktivitesi, fagositik aktivite ve bakteriye karşı temizlenme etkinliği açısından incelemişlerdir. %5 ve %15 tuzluluğa transfer ettikleri karideslerde 12 saat sonra THS'nin, PO ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin, fagositik aktivitenin ve temizlenme etkinliğinin önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar %25 ve daha düşük tuzluluk seviyelerine (%5 ve %15) transfer edildiklerinde, karideslerin bağışıklık yeteneğinin *V. alginolyticus* enfeksiyonuna karşı direnci azalttığı sonucuna varmışlardır.

Cheng ve ark (2005), dopaminin Pasifik beyaz karideste bağışıklık sistemi üzerine etkisini araştırmış; bu amaçla, karideslere farklı dozlarda (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} mol/karides) dopamin enjekte etmişlerdir. 10^{-7} ve 10^{-6} mol/karides doz gruplarında 4 saat sonra THS %25 ve %39 oranında azalmış, fagositik aktivite de 2 saat sonra önemli ölçüde azalmıştır. Araştırmacılar karideslerde THS'nin 16 saat, fagositik aktivitenin ise 4 saat sonra normal değerlere geri döndüğünü tespit etmişlerdir.

Mercier ve ark (2006), tekrarlanan strese maruz bıraktıkları Pasifik beyaz karidesinde metabolik yanıtlarını (glukoz, laktat, toplam protein, kolesterol,

trigliserit, toplam lipit, hemosiyanin ve karotenoid) ve bağışıklık yanıtlarını (THS, süperoksit anyon üretimi ve süperoksit dismutaz aktivitesi) kontrol grubu (stressiz) karideslerle karşılaştırmışlardır. Beton havuzlarda strese maruz bıraktıkları karideslerin hemolenflerinde toplam protein, trigliserit ve toplam lipit konsantrasyonlarının önemli ölçüde düştüğünü ve kas içerisindeki karbonhidrat konsantrasyonlarının da önemli ölçüde daha düşük seviyede bulunduğunu belirtmişlerdir. Plastik tanklarda stres altındaki karideslerin hemolenflerinde daha yüksek konsantrasyonlarda glukoz ve toplam lipit olduğunu, ancak hepatopankreastaki karbonhidrat seviyelerinin daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Denemede ortaya çıkan stresli ve stressiz karidesler arasında bağışıklık yanıtlarında anlamlı bir fark bulamamışlar ve tekrarlanan stresin hemolenfteki toplam protein seviyesinin düşük olması haricinde bağışıklık tepkisi kapasitesini baskılamadığı sonucuna varmışlardır.

Mugnier ve ark (2006), mavi karidesleri (*Litopenaeus stylirostris*) 48 saat boyunca gölet sedimentine maruz bırakmışlar ve fizyolojik yanıtı kabuk değiştirme safhalarıyla ilişkili olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar hemolenfte hipo-osmoregülasyon kapasitesini, magnezyum iyonlarını, glukozu ve toplam proteini incelemişlerdir. Gölette merkeze yakın muhafaza ettikleri karideslerin kabuk değiştirme evrelerinde kısa süreli stres tepkisi olduğunu ve Magnezyum iyonu konsantrasyonunda %370 ila %500, glukoz konsantrasyonunda %200 ila %266 oranında artma, hipoosmoregülasyonda azalma olduğunu gözlemlemişlerdir.

Cheng ve ark (2006), farklı dozlarda noradrenalin (10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} mol/karides) enjekte ettikleri Pasifik beyaz karideste bağışık modülasyonunu incelemişlerdir. THS'nin 2 saat sonra sırasıyla %15, %21 ve %32 oranında, fagositik aktivitenin de 2 saat sonra her dozda önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Karideslerde THS'nin 4 saat, fagositik aktivitenin ise 16 saat sonra normal değerlere geri döndüğünü tespit etmişlerdir.

Wang ve Chen (2006), %25 tuzluluk ve 26°C sıcaklıkta tuttıkları siyah kaplan karidesine (*P. monodon*) *Photobacterium damsela* enjekte etmişler ve

karidesleri 22, 26 °C'den (kontrol), 30 ve 34°C su sıcaklıklarına naklederek sıcaklık stresi altındaki karideslerin immün yanıtlarını incelemişlerdir. Bakteri enjeksiyonu yaptıkları karideslerin 24-96 saat süresince ölüm oranının 22-34°C sıcaklıklarda, 26-30°C sıcaklıklarda bulunan karideslere kıyasla, önemli ölçüde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Karideslerde THS, PO, süperoksit dismutaz aktivitesi, fagositik aktivite ve bakteriye karşı temizlenme etkinliğinin 24-96 saat sonra 22 ve 34°C su sıcaklıklarında önemli ölçüde düşük olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar *P. monodon*'u 26°C'den 22 ve 34°C su sıcaklıklarına transfer ettiklerinde karideslerin *P. damsela*e enfeksiyonuna karşı direncinin azaldığı sonucuna varmışlardır.

Joseph ve Philip (2007), siyah kaplan karidesinde (*Penaeus monodon*) akut tuzluluk stresinin immünolojik ve fizyolojik tepkisinin beyaz benek sendromu virüsü (WSSV) enfeksiyonuna etkisini araştırdıkları çalışmalarında; %15 tuzlulukta muhafaza ettikleri karidesleri 7 saatte %0 ve %35 akut tuzluluk değişikliklerine maruz bırakmışlar, ardından oral yoldan WSSV vermişlerdir. Bağışıklık değişkenleri olarak; denemenin 2. ve 5. günlerinde, toplam hemosit sayısı, fenoloksidaz aktivitesi (PO), alkalın fosfataz aktivitesi (ALP), asit fosfataz aktivitesi ve metabolik değişkenler olarak da toplam protein, toplam karbonhidrat, toplam serbest amino asit, toplam lipit, glukoz ve kolesterol seviyelerini ölçmüşlerdir. Karideslerde akut tuzluluk değişiminin %35 tuzlulukta, toplam serbest amino asit dışındaki, tüm diğer metabolik değişkenlerin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. %35 tuzluluk stresine maruz bıraktıkları karideslerde, ALP ve PO haricinde, bağışıklık değişkenlerinin önemli ölçüde azaldığını ve bu azalışın %0 tuzlulukta daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, %15 tuzlulukta metabolik ve bağışıklık parametrelerinin genel olarak değişmediğini ve tuzluluk stresine maruz kalanlara kıyasla enfeksiyondan sonra yaşama oranının daha yüksek olduğunu kaydetmişlerdir. Tuzluluk değişimine maruz bıraktıkları karideslerde stresin %0 tuzlulukta %35 tuzluluğa göre daha yüksek olduğunu, ayrıca bağışıklık yanıtı ve yaşama oranlarının da %35 tuzlulukta

daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar, karides hemolenfinde belirlenen plazma THS, ALP ve PO'nun sağlık göstergeleri olarak önerilebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, sonuç olarak karidesin maruz kaldığı akut tuzluluk stresinin hemolenfte metabolik ve bağışıklık parametrelerini etkilediği, özellikle düşük tuzluluk stres koşullarında WSSV'ye hassasiyeti arttırdığı sonucuna da varmışlardır.

Hsu ve Chen (2007), Pasifik beyaz karideste sülfite stresi altında *V. alginolyticus*'a karşı duyarlılığını ve bağışıklık yanıtını araştırmak için karidesleri bakteri enjeksiyonundan sonra farklı konsantrasyonlarda sülfite içeren (0 (kontrol), 48, 111, 492 ve 1026 µg/L) su içine yerleştirmişlerdir. 48-144 saat sonra, bakteri enjekte edilen karideslerden 490 µg/L sülfite maruz bırakılanların ölüm oranının, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir denemelerinde 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle 0, 49, 105, 488 ve 967 µg/L sülfür koşullarında *P. vannamei*'nin bağışıklık parametreleri, fagositik aktivite ve bakteri temizlenme etkinliğini incelemişlerdir. Karideslerin 24 saat süreyle 490 µg/L sülfite konsantrasyonlarında hiyalin hücre sayısı, THS, PO, fagositik aktivite ve bakteri temizlenme etkinliğinde azalma gözlemişler, buna karşın süperoksit dismutaz aktivitesinde belirgin bir artış belirlemişlerdir. Çalışmada sonuç olarak sülfür konsantrasyonunun >490 µg/L olmasının, *P. vannamei*'nin *V. alginolyticus* enfeksiyonuna karşı duyarlılığını arttırdığını ve bağışıklık kabiliyetini azalttığını tespit etmişlerdir.

Chiu ve ark (2007), *Lactobacillus plantarum* tarafından indüklenen Pasifik beyaz karideste bağışık yanıtlarını ve gen ekspresyonunu araştırmışlar; çalışmada karidesleri *L. plantarum* içeren yemlerle 48 ve 168 saat boyunca beslemişler [0 (kontrol), 10^7 ve 10^{10} cfu/kg yem)] ve ardından karideslerde THS, PO, süperoksit dismutaz aktivitesi, fagositik aktivite ve bunlara ek olarak profenoloksidaz, lipopolisakkarit ve β -1,3 glukan bağlayıcı protein, serin proteini ve peroksinektin mRNA transkripsiyonunu ve *V. alginolyticus*'a duyarlılığı incelemişlerdir. Araştırmacılar karideslerde PO aktivitesi, süperoksit dismutaz aktivitesi, bakteriye

karşı temizlenme etkinlik değerleri ve diğer bazı parametreleri incelemişlerdir. Çalışmada profenoloksidaz ve peroksinektin mRNA transkripsiyonu ve *V. alginolyticus* ile mücadele sonrası hayatta kalma oranının önemli ölçüde arttığını, ancak 168 saat boyunca 10^{10} cfu/kg yemle besledikleri karideslerin THS sayısının önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, farklı muameleler arasında karideslerin fagositik aktivitesi, β -1,3 glukan bağlayıcı protein veya serin proteini mRNA ekspresyonunda önemli farklılıklar gözlemlenmemişlerdir. Araştırmacılar 10^{10} cfu/kg içeren yemin *L. vannamei*'lerin bağışıklık kabiliyetini ve *V. alginolyticus* enfeksiyonuna direncini arttırdığı sonucuna varmışlardır.

Mugnier ve ark (2008), mavi karideslerde (*L. stylirostris*) amonyak ve hipoksinin (oksijen yetersizliği) kombine etkisinin kabuk değiştirme dönemleri ile ilişkili olarak hayatta kalma, fizyolojik ve immünolojik parametreler üzerine etkilerini araştırmışlardır. Hemolenf analizi için sadece intermolt ve premolt aşamalarındaki karideslerden örnekleme yapmışlar ve osmoregülasyon kapasitesi, magnezyum iyonu, kalsiyum iyonu, toplam protein, oksihemosiyanin, laktat, glukoz ve THS (toplam hemosit sayısı) seviyelerini belirlemişlerdir. Hipoksi ve hipoksi amonyak kombinasyonunda karideslerde plazma laktat seviyesinin arttığını ve THS'nin azaldığını; amonyak ve amonyak + hipoksi muamelelerinde toplam protein konsantrasyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Amonyak ve hipoksi kombinasyonunun, amonyak ve hipoksinin tek başına yapılan muamelelerine göre (oksihemosiyanin hariç) daha güçlü bir fizyolojik tepki verdiği sonucuna varmışlardır.

Tu ve ark (2008), çalışmalarında siyah kaplan karidesinin (*P. monodon*) hepatopankreas ve solungaçlarında enrofloksasinin (antibiyotik) oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştırmış ve denemelerini entansif (yoğun stoklama) ve ekstansif (düşük stoklama) kültür koşullarında gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar enrofloksasin ilacının karidesin oksidatif stres durumunda çok küçük değişikliklere neden olduğunu, bununla birlikte kültür sisteminin önemli bir etkide bulunduğunu belirtmişlerdir. Hepatopankreas lipid peroksidasyonunun bazal düzeyinin entansif

sistemde, ekstansif kültür sistemine göre daha yoğun olduğunu, glutatyon S-transferaz aktivitesinin ise entansif sistemde daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca entansif kültür sisteminden örneklenen karideslerde yüksek solungaç katalaz aktivitesi gözlemlenmiştir.

Li ve Chen (2008), Pasifik beyaz karideslerini bağışıklık yanıtını ve *Vibrio alginolyticus*'a duyarlılığını düşük ve yüksek pH stresi altında belirlemek amacıyla pH 8.2'de muhafaza ettikleri karidesleri pH 6.5, 8.2 (kontrol) ve 10.1'e transfer ettikten sonra 6, 12, 24, 72 ve 120 saat süreyle bağışıklık parametrelerini, fagositik aktiviteyi ve karideslerin bakteriye karşı temizlenme etkinliğini (clearance efficiency) incelemişlerdir. Denemede pH 6.5 ve 10.1'e transfer ettikleri karideslerin PO, süperoksit dismutaz aktivitesinin, fagositik aktivite ve temizlenme etkinliğinin 6-72 saatte önemli ölçüde azaldığını; 12-72 saat boyunca ise THS'nin azaldığını tespit etmişlerdir. pH 10.1'e aktardıkları karideslerin granüler hücre sayıları ve THS'nin 6 saat sonra, süperoksit dismutaz aktivitesinin 72 saat sonra önemli ölçüde azaldığını kaydetmişlerdir. 120 saat sonra pH 6.5 ve 10.1'e transfer ettikleri karideslerin bağışıklık parametrelerinin orijinal değerlerine geri döndüğünü gözlemlenmiştir. Bununla birlikte 6.5 pH'ya aktardıkları karideslerde daha düşük fagositik aktivite ve temizlenme etkinliği gözlemlenmişler, dahası pH 10.1'e transfer sonucunda da daha düşük temizlenme etkinliği tespit etmişlerdir. Araştırmacılar düşük ve yüksek pH stresinin *L. vannamei*'de *V. alginolyticus*'a karşı direnç ve bağışıklık tepkisini incelenen parametreler açısından azalttığı sonucuna varmışlardır.

Yao ve ark (2008), Çin karidesinde (*F. chinensis*) laminarin ve *V. Anguillarum* enjeksiyonunun kan hücrelerindeki lizozom ve lizozim aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Uygulamadan sonra hemositlerin lizozim aktivitesinin aynı anda orta seviyede bir artış gösterdiğini, laminarin enjeksiyonundan 3 saat sonra ise yarı granüler hücre sayımlarının en yüksek düzeye ulaştığını ve THS'nin arttığını tespit etmişlerdir. Hiyalin hücrelerinin yüzdesinin *V. anguillarum* enjeksiyonundan sonra net olarak artış gösterdiğini de

kaydetmişlerdir. Araştırmacılar lizozom membran stabilitesi ve lizozim aktivitesini kullanarak karideslerde immün durumunun değerlendirilebileceğini önermişlerdir.

Mercier ve ark (2009), çalışmalarında Pasifik beyaz karideslerini 38 gün süreyle düşük veya yüksek seviyede, HUFA'ca (yüksek doymamış yağ asitleri) zengin bir yemle beslemişler ve tutma/elleme (handling) stresine maruz bırakmışlardır. Araştırmacılar birinci denemede 30 gün boyunca karideslere günlük stres uygulamışlar ve ardından fizyolojik ve immünolojik değişkenleri ölçmüşler, ikinci denemede ise bir kez stres uygulamışlar ve stres uygulamasından 1 ve 24 saat sonra örnekleme yapmışlardır. 30 gün boyunca strese maruz kalan karideslerin hayatta kalma oranının, nihai ağırlığının ve yem tüketiminin, kontrol grubuna göre (stres uygulanmayan) önemli ölçüde düştüğünü kaydetmişlerdir. Hemolenfteki glukoz konsantrasyonunun uzun süreli strese maruz kalan karideslerde kontrol grubundan daha yüksek olduğunu; laktat seviyesinin ise yüksek HUFA yemiyle beslenen karideslerde belirgin olarak daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Hemolenfteki laktat ve glukoz seviyesinin stresten 1 saat sonra arttığını, 24 saat sonra ise normal seviyelere döndüğünü tespit etmişlerdir. Genel olarak, karideslerde 30 gün boyunca tekrarlanan tutma stres uygulamasının biyolojik performans üzerine olumsuz etkiye sahip olduğunu, bir kez stres uygulanan ve 1 ya da 24 s sonra yapılan ölçümlerde ise fizyolojik ve bağışık yanıtlarının daha belirgin görüldüğünü gözlemlemişlerdir. Sonuçta, bu çalışmada, HUFA'ca zengin yemle beslemenin elle stres uygulamasına verilen bağışıklık sistemi açısından yararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Suryavanshi ve ark (2009), çalışmalarında benekli karidesi (*Metapenaeus monoceros*) 23 gün süreyle iki farklı dozda (40 ve 60 ng/L) endosulfana maruz bırakmış ve ardından solungaç (SOL), hepatopankreas (HP) ve kaslarında (KAS) (metabolik olarak aktif dokularında) meydana gelen biyokimyasal değişimleri incelemişlerdir. Endosulfanın ölümcül düzeyin altındaki dozlarında karideslerde toplam protein (TP), toplam karbonhidrat (TK), glikojen (GL), toplam serbest şeker (TSS) ve toplam lipit (TL) seviyelerinin önemli ölçüde değişiklik

gösterdiğini gözlemişlerdir. Deneme sonunda farklı dokulardaki TP, TK, GL, TL ve TSŞ konsantrasyonlarındaki azalmanın, sırasıyla KAS>SL>HP, HP>SL>KAS, KAS>HP>SL, HP>KAS>SL ve KAS>SL>HP şeklinde olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalışmanın sonuçlarını ölümcül olmayan endosulfan dozlarının temel dokuların kompozisyonunu, özellikle de kas dokularındaki TP seviyelerini önemli ölçüde değiştirdiğini ve böylece ekonomik açıdan önemli olan bu karidesin besleyici değerini düşürdüğünü ortaya koymuşlardır.

Guo ve ark (2010), günlük sıcaklık dalgalanmasının (25°C sabit sıcaklık, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm 4^{\circ}\text{C}$) Pasifik beyaz karidesinin büyüme ve fizyolojik durumu ile ilgili etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, $25\pm 4^{\circ}\text{C}$ rejiminde büyümenin, 25°C 'lik sabit sıcaklıktaki karideslere göre, önemli ölçüde daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu grupta hemolenf glukoz içeriğinin en düşük, hepatopankreas piruvat kinaz aktivitesinin ise en yüksek olduğunu, dolayısıyla bu gruptaki karideslerin stres altında olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada, günlük sıcaklık dalgalanmasının HSP70 üzerinde önemli bir artış yaratmadığını, bunun nedeninin $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'lik dalgalanma baskısının HSP70 gen ekspresyonları üzerinde önemli bir değişiklik için yeterli bir stres yaratmamış olabileceğine bağlamışlardır.

Zhou ve ark (2010), çalışmalarında Pasifik beyaz karideslerinde bakteri yüklenmesine tepki olarak HSP60 ve HSP70'in ekspresyonunu incelemişler ve bu çalışmada LvHSP60 mRNA'nın hem yapısal hem de indüklenebilir olduğunu, hemositlerde, kas, mide, kalp, hepatopankreas ve solungaç dokusu dahil olmak üzere incelenen hemen hemen tüm dokularda (bağırsak hariç) yüksek oranda belirlenebildiğini ifade etmişlerdir. LvHSP60'ın solungaçlarda, hepatopankreaslarda ve hemositlerde bakteri yüklemesinden sonra belirgin olarak yukarıya doğru yükseldiğini, hemosit ve hepatopankreasta LvHSP70'in transkripsiyonunun da indüklendiğini kaydetmişlerdir.

Li ve ark (2010), %35 tuzlulukta yetiştirdikleri karideslerde (*L. vannamei*) *V. alginolyticus* enjeksiyonu ve düşük tuzluluk stresi kombinasyonunun doğal bağışıklığa etkisini araştırmışlardır. Çalışmada karidesleri %25, %20 ve %15

tuzluluktaki sulara transfer etmişler ve 1, 6, 12, 24, 72 ve 120 saat sonra hiyalin hücre sayımı, granüler hücre sayımı (yarı granüler hücre de dahil olmak üzere), THS, PO ve süperoksit dismutaz açısından incelemişlerdir. Düşük tuzluluk seviyelerine transfer ettikleri karideslerde THS, PO aktivitesi, oksidatif patlama (respiratory burst / oxidative burst) ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin sırasıyla 6, 6, 6 ve 1 saatte önemli ölçüde azalmaya başladığını ve en düşük seviyeye 12 saatte ulaşıldığını belirlemişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla ‰15 tuzluluğa transfer ettikleri ve enjeksiyon yapmadıkları karideslerde hiyalin hücre sayımı, granüler hücre sayımı, THS, PO aktivitesi ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin sırasıyla ‰41, ‰49, ‰68 ve ‰62 oranında azaldığını, enjeksiyon yaptıkları karideslerde bu değerlerin sırasıyla ‰79, ‰78, ‰79, ‰82 ve ‰72 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Bakteri enjeksiyonu ve düşük tuzluluk transferi kombine streslerine maruz bıraktıkları karideslerde doğal immünitenin zayıfladığı sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar karides yetiştiriciliğinde, düşük tuzluluk stresıyla beraber bir patojen tarafından enfekte olduklarında karidesin doğal bağışıklık parametrelerinin daha da kötüleşmesini önlemek adına karideslerin yetiştiriciliğinde sabit yüksek tuzlulukların tercih edilmesi gerektiğini önermişlerdir.

Klobucar ve ark (2012), kirli tatlı su ortamlarında kerevitlerin (*Astacus leptodactylus*) genotoksisitesini incelemişler ve biyolojik belirteç olarak fizyolojik (toplam protein konsantrasyonu) ve immünolojik (hemosit sayımı) hemolenf parametrelerini ölçmüşlerdir. Kirli ortamlardaki kerevitlerin toplam hemosit sayısı ve toplam protein içeriğinde artış gözlemlemişler ve böylece kirliliğe maruz kalmanın neden olduğu stresin de doğrulandığını ortaya koymuşlardır.

Fouzi ve ark (2012), çalışmalarında 10 gün boyunca farklı toplam amonyak seviyelerine (8.1, 3.8 ve 1.1 mg/L) ve beyaz spot sendromu virüsüne (WSSV) maruz bıraktıkları karideslerde (*P. monodon*) stres düzeyini alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz, toplam protein, glukoz ve elektrolit (Na^+ , Cl^- , K^+) ölçümleriyle belirlemeye çalışmışlardır. Denemenin 10. gününde 8.1 mg/L

amonyak seviyesine maruz bıraktıkları karideslerde hemolenf ALT, AST ve TP'nin önemli ölçüde yüksek olduğunu; 3.8 mg/L amonyak seviyesine maruz bıraktıkları karideslerde TP'nin önemli ölçüde düşük olduğunu saptamışlardır. WSSV enfekte ettikleri ve 10 gün boyunca amonyağa maruz bıraktıkları karideslerde stresin daha da arttığını tespit etmişlerdir. Bu grupta hemolenf TP seviyesinin 1.1, 3.8 ve 8.1 mg/L toplam amonyak seviyesi muamelelerindeki artış ile birlikte önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Kiruthika (2013) siyah kaplan karidesinde (*P. monodon*) tuzluluk stresinin neden olduğu biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikleri incelemiş; düşük (%3), yüksek (%55) ve kontrol grubu olarak orta seviyede (%28) tuzluluklarda tutulan karideslerde THS, toplam protein konsantrasyonu, fenoloksidaz aktivitesi, solunum ve ozmolaliteyi ölçmüştür. Yüksek tuzlulukta bulunan karideslerde THS, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli ölçüde düşük çıkmasına rağmen, kontrol ve düşük tuzluluk stresine maruz bırakılanlar arasında herhangi bir zaman aralığında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Bu araştırmacı, karideslerin osmolalite düzeylerinde, düşük tuzluluk stres grubunda 6 saatte belirgin azalma, yüksek tuzluluk stres grubunda ise 48'inci saatte maksimum artış tespit edilmiştir.

Loc ve ark (2013), karideslerde (*L. vannamei*) enfeksiyona karşı koruyan mekanizmaları daha iyi anlamak için postlarvalarda ölümcül olmayan bir ısı şokunun ardından HSP70 ve bağışıklık ile ilişkili protein profenoloksidaz, peroksinektin, penaeidin, crustin ve hemosiyanini kodlayan mRNA'ları incelemişlerdir. Çalışmada 30 dakika süreli ani ısı şokunun kontrol grubuna kıyasla HSP70 mRNA'sını arttırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar ısı şokundan sonra HSP70 üretiminin, geliştirilmiş HSP70 mRNA ile korelasyona girdiğini ortaya koymuşlardır. Ölümcül olmayan ısı şoku sonrasında profenoloksidaz ve hemosiyanin mRNA düzeylerinin arttığı, peroksinektin ve crustin mRNA düzeylerinin değişmediği sonucuna varmışlardır. Penaeidin mRNA'nın tüm ısı şoklarında da azaldığını kaydetmişlerdir.

Chen ve ark (2014), bir çalışmada, *Petalonia binghamiae* özütünü *in vitro* ve *in vivo* yöntemle Pasifik beyaz karideslerin bağışıklık tepkisini ve *V. alginolyticus*'a karşı direncini incelemişler ve bu amaçla 1 mg/mL ekstrakt ile inkübe ettikleri karides hemositlerinde ve PO'da artış tespit etmişlerdir. Karideslerde THS, PO ve oksidatif patlamanın 48, 96 ve 144 saat sonra, süperoksit dismutaz aktivitesinin ise 48 saat sonra 6 ve 10 µg/g ekstrakt dozunda önemli ölçüde yükseldiğini kaydetmişlerdir. 6 ve 10 µg/g ekstrakt alan karideslerin fagositik aktivitesi ve bakteriye karşı temizlenme etkinlik değerleri 24, 48, 96 ve 144 saat sonra salin ve kontrol gruplarına göre önemli ölçüde yüksek çıkmıştır.

Chen ve ark (2015a), *Gracilaria tenuistipitata* ekstraktı içeren deniz suyunda (%35) amonyak stresine maruz bıraktıkları Pasifik beyaz karideslerde HSP70'in transkript seviyesinin stres sonrası 24 saat regüle edilebildiğini kaydetmişlerdir. Araştırmacılar *Gracilaria tenuistipitata* ekstraktı içeren deniz suyuna maruz bıraktıkları karideslerin, yukarı regüle gen ekspresyonu ve erken bağışıklık parametrelerinin iyileşmesi durumu neticesinde, amonyak stresine karşı hücrel ve humoral bağışıklığı düzenleyerek homeostazı korumak için bir yetenek sergilediği sonucuna varmışlardır.

Chen ve ark (2015b), farklı tuzluluklara (%2.5, 5, 10, 15, 25 ve %35) maruz bıraktıkları juvenil Pasifik beyaz karideste büyüme ve immün parametrelerini incelemişlerdir. Karideslerin hayatta kalma oranlarının sırasıyla %20, %40, %77, %83, %90 ve %90 olduğunu tespit etmişlerdir. Yüksek tuzluluklara maruz bıraktıkları karideslerin (%25 ve %35) ağırlık ve uzunluklarının düşük tuzluluğa göre önemli ölçüde yüksek, spesifik büyüme oranlarının (SBO) düşük tuzlulukta (%2.5, %5, %10 ve %15) kıyasla %25 tuzlulukta önemli ölçüde yüksek olduğunu bulmuşlardır. Karideslerde %15, %25 ve %35 tuzlulukta yetiştirilenler, %2.5, %5 ve %10'da yetiştirilenler ile karşılaştırıldığında, daha fazla şeffaf ve granül hücreye, önemli ölçüde yüksek THS seviyesine, PO, süperoksit dismutaz ve lizozim aktivitelerine sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Ang-lu ve ark (2015), *Exopalaemon carinicauda*'daki ısı şok proteini (HSP) familyalarının (HSP70 ve HSP90) mRNA ekspresyonunu, akut sıcaklık stresini takiben araştırmışlar ve karideslerin 19, 23 ve 27°C sıcaklık stresine maruz bırakıldıklarında HSP70 mRNA ekspresyon seviyelerini 2 saat içinde arttırdıklarını ancak daha sonra denemenin sonuna (48 saat) kadar azalttıklarını, HSP90 mRNA ekspresyon seviyelerinin ise 2 saatte azaldığını ve denemenin sonuna doğru ise yükseldiğini belirlemişlerdir. Karidesin HSP70 ve HSP90 mRNA ekspresyonu arasındaki bu farklılığın ısı stresine gösterilen farklı rollerle ilişkili olabileceğini ve sonuçta bu her iki HSP genlerinin de karideslerin sıcaklığa dayanıklılıklarında çok önemli roller oynayabileceklerini ifade etmişlerdir.

Saeed ve ark (2015), çalışmalarında *L. vannamei*'nin tuzluluk stresinin kan parametreleri üzerine etkisini araştırmışlar; çalışmada %30 tuzluluğa kıyasla, %15 ve %45 tuzluluğun kan plazmasında hemosit hücrelerinde ve toplam protein değerlerinde belirgin bir düşüş oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar tuzluluğun artış veya azalmasından kaynaklanan stresin bağışıklık sistemindeki anormalliklerle ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır.

2.3. Krustaselerde Stoklama Yoğunluğunun Etkileri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Pasifik beyaz karidesinde yapılan bir çalışmada, üç farklı stok yoğunluğunun (25, 38, 65 adet/L) yetiştirme süresince (65 gün) büyüme ve hayatta kalma oranı üzerine etkileri araştırılmıştır. Karideslerde 25 ve 38 adet/L postlarva (PL) stok yoğunluklarının hayatta kalma ve büyümeye hiçbir etkisi olmadığı, 65 adet/L stok yoğunluğunun ise yemden daha etkin yararlanma oranı sayesinde önemli ölçüde yüksek bir biyomas (1.3 kg/m^3) ve daha yüksek hayatta kalma oranı (%61) sağlayabildiği belirlenmiştir (Rouse ve Davis, 2004).

Herrera ve ark (2006), çalışmalarında Pasifik beyaz karidesinde stok yoğunluğunun (50, 60 ve 70 karides/m²) toprak havuzlarda büyüme üzerine etkisini araştırmışlardır. Sonbahar-kış aylarında stoklama yoğunluğunun büyüme üzerinde

önemli ölçüde farklı etkiler göstermediğini, nihai ortalama ağırlıkların sırasıyla 12.77 g, 12.72 g ve 12.40 g, ve toplam veriminin ise 3.609 kg, 5.093 kg ve 5.681 kg/ha olduğunu kaydetmişlerdir. Buna karşılık, ilkbahar-yaz ayları boyunca ortalama büyüme ve nihai verim arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılıklar olduğunu, sırasıyla nihai ortalama ağırlıkların 18.63 g, 13.46 g ve 11.86 g ve verimin 7.243 kg, 7.307 kg ve 8.011 kg/ha olduğunu gözlemlemişlerdir. Kış aylarında düşük su sıcaklıklarının üretimi olumsuz etkilediğini, ilkbahar-yaz aylarının yüksek sıcaklıklarında ($\geq 23^{\circ}\text{C}$) daha yüksek performans elde edilebildiğini bildirmişlerdir.

Li ve ark (2006), Çin karidesinde (*F. chinensis*) çözünmüş oksijen seviyesi ve stok yoğunluğunun (50, 200 ve 600 adet/m³; ortalama 1.78 g) büyüme ve spesifik olmayan (doğal) bağışıklık parametreleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, karideslerin büyüme, hayatta kalma oranı, kabuk değiştirme, yem alımı ve yem çevrim etkinliğinin çözünmüş oksijen konsantrasyonu muameleleri arasında önemli ölçüde farklı olmadığını belirlemişlerdir. Karideslerde stok yoğunluğunun artmasıyla birlikte büyüme, hayatta kalma oranı, yem çevrim etkinliğinin ve PO enzim aktivitesinin azaldığını, bunun aksine yem tüketimi ve peroksidaz enzim aktivitesinin arttığını ifade etmişlerdir. Karideslerde çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve stoklama yoğunluğunun ağırlık artışı, kabuk değiştirme, O₂ tüketimi, yem alımı, Ua ve hemolizin aktivitelerinde interaktif bir etkiye sahip oldukları sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar bu sonuçlar neticesinde çözünmüş oksijen konsantrasyonu seviyesinin spesifik olmayan bağışıklık faktörleri (süperoksit dismutaz, peroksidaz enzim aktivitesi, Ua, Ul ve hemolizin) üzerinde etkili olduğunu, bununla birlikte stok yoğunluğunun ise daha çok yem alımı veya enzim (PO, peroksidaz enzim aktivitesinin ve hemolizin) aktiviteleri yoluyla karidesin büyüme performansını etkilediğini ve her iki faktörün (stok yoğunluğu ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu) interaktif etkilerinin karides yetiştiriciliğinde önemli roller oynadığını ortaya koymuştur.

Gunalan ve ark (2010), çalışmalarında farklı stok yoğunluklarının MBV *Monodon baculovirus* ile enfekte olan *Penaeus monodon* postlarvaları üzerindeki etkisini 3 farklı stoklama yoğunluklarında (6, 10 ve 15 PL/m²; D1, D2 ve D3) değerlendirmek için üç buçuk aylık bir çalışma yapmışlardır. En düşük stoklama grubu olan D1'de önemli ölçüde yüksek üretim ve hayatta kalma oranı belirlemişlerdir.

Kumlu ve ark (2010), yarı-tropik iklim şartlarında, kışlattıkları veya mevsim öncesinde ürettikleri yeşil kaplan karideslerinin (*P. semisulcatus*) yarı-entansif ve entansif sistemlerdeki havuz/tank kültür koşullarında büyüme performansını çalışmışlardır. A havuzunda, mevsim öncesinde üretilen postlarvaların 0.06 g günlük büyüme oranıyla (GBO), 140 günde, 0.2 g'dan 22.6 g'a kadar doğrusal bir şekilde büyüdüğünü kaydetmişlerdir. B havuzunda, kışlatılmış yavruların ilk 30 gün içerisinde 0.41 g GBO ile (14.42 g'lık canlı ağırlık kazancı; CAK) ve 30 ile 140. günler arasında ise 0.13 g GBO ile (14.32 g CAK) 3.8 g'dan 30.5 g'a kadar ulaştığını belirlemişlerdir. 30 adet/m² PL stok yoğunluğunda karidesler (0.2 g) 140 gün içerisinde, 13.7 g'a (GBO 0.10 g) ve 40-50 adet/m² PL yoğunluğunda ise 6.44-7.37 g'a (GBO 0.05 g) ulaştığını kaydetmişlerdir. Elde edilen ürün miktarını yarı-entansif havuzlarda 880-1.150 kg/ha, entansif havuzlarda ise 1.597-2.673 kg/ha olarak hesaplamışlardır. Beton havuzlarda büyüttükleri karideslerin daha da düşük bir performans gösterdiğini ve bu havuzlardan sadece 879 ile 793 kg/ha ürün alınabildiğini tespit etmişlerdir.

Sookying ve ark (2011), çalışmalarında açık havuz ve tank koşullarında kültüre alınan ve yüksek miktarda soya fasulyesi unu içeren yem ile beslenen Pasifik beyaz karideslerinde stok yoğunluğunun büyüme performansı ve ekonomik fizibilite üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Juvenil karidesleri (0.015 g başlangıç ağırlığı) 0.1 ha havuzlara 17, 26, 35 ve 45 adet/m² stok yoğunluklarında stoklamışlardır. Ayrıca yavru *L. vannamei*'leri de (2.8 g başlangıç ağırlığı) 24.800 L tanklara 15, 25, 35, 45, 55 ve 65 adet/m² olarak stoklayıp 10 hafta süreyle büyütmüşlerdir. Havuz çalışmasının sonucunda (14 hafta) stok

yoğunluğu ve büyüme arasında negatif bir korelasyon eğilimi olduğunu belirlemişlerdir. Karideslerin muameleler arasındaki ortalama ağırlığının 20.70-25.25 g arasında, hayatta kalma oranının %58.0 ile %65.1 arasında, YÇO değerinin ise 1.17 ile 1.54 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu farklılıkların, muameleler arasında önemli olmadığını, bununla birlikte yüksek stok yoğunluğunun önemli ölçüde daha fazla verim sağladığını belirlemişlerdir. Nihai üretimin 2660 ile 6149 kg/ha arasında değiştiğini kaydetmişlerdir. Açık hava koşullarında tank sisteminde de büyümenin stok yoğunluğuyla ters orantılı olduğunu ve ortalama nihai ağırlığın 13.42 ile 16.13 g arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Nihai biyomasın 286.15 ile 637.20 g/tank arasında, hayatta kalma oranının %93.4 ile %100.0 arasında değiştiğini, bununla birlikte stoklama yoğunluğunun hayatta kalma oranı üzerinde herhangi bir etki yaratmadığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bu çalışmada stok yoğunluğu ile YÇO arasında 1.15 ile 1.54 arasında değişen negatif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Balakrishnan ve ark (2011), çalışmalarında kültürü yapılan Pasifik beyaz karidesin, toprak havuzlarda (0.8-0.9 ha), farklı stok yoğunluklarında (50, 56.25, 51.25 ve 61.11 adet/m²) büyümesini 110 gün süreyle incelemişlerdir. Deneme sonunda ortalama ağırlıkların sırasıyla 21.2, 18.9, 19.6 ve 17.5 g olduğunu; hayatta kalma oranlarının %82, 92, 81 ve 80 olduğunu ve YÇO'ların 1.4, 1.34, 1.38 ve 1.35 olduğunu tespit etmişlerdir. Ortalama hasat edilen ürün miktarının sırasıyla 8750, 9813, 8138 ve 8591 kg/ha olduğunu kaydetmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada *L. vannamei*'lerde büyümenin doğrudan stok yoğunluğuyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Yeşil kaplan karidesi (*Penaeus semisulcatus*) için toprak havuzlarda yapılan bir çalışmada stok yoğunluğu ve su değişim oranının büyüme performansı üzerine etkisi belirlenmiştir. Çalışmada stok yoğunluklarının 5, 15 ve 25 PL/m³ ve su değişim oranının %10 ve %20 olduğu kaydedilmiştir. Su değişimi ile deneme sonu ortalama ağırlık (g), ağırlık artışı (g/PL), yüzde ağırlık artışı, SBO (%/gün), YÇO, su değişimi, yağ kazancı ve enerji kullanımı arasında önemli ölçüde fark

olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yeşil kaplan karidesinin ideal stoklama yoğunluğunun 15 PL/m² ve su değişim oranının %20 olabileceği sonucuna varılmıştır (Gaber ve ark 2012).

Ravuru ve ark (2014), karideslerin (*L. vannamei*) büyüme ve diğer üretim parametreleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla, her havuza 500 adet/m² postlarva stoklamışlar ve pelet yem ile yaklaşık 4 ay süreyle (120-126 gün) beslemişlerdir. Üretimin her bir havuz için sırasıyla 8337, 8932 ve 9450 kg olduğunu belirlemişler; yem çevrim oranını (YÇO) 1.78, 1.81 ve 1.82 olarak, hayatta kalma oranını ise %86, %88 ve %90 olarak hesaplamışlardır. Nihai ortalama ağırlığını çalışma sonunda, sırasıyla, 27.7, 29.0 ve 30.0 g olarak bulmuşlardır. Shakir ve ark (2014), siyah kaplan karideslerinde (*P. monodon*) stoklama yoğunluğunun (6 ve 12 PL/m³) hayatta kalma oranı ve büyüme performansı üzerine etkisini dört aylık süre boyunca araştırmışlardır. Düşük stoklamada karideslerin hayatta kalma oranlarının yüksek (%68.4), yüksek stoklamada düşük (%51.7) olduğunu ortaya koymuşlardır. Deneme sonu ortalama vücut ağırlığını düşük stoklanan grupta 27.8 g, yüksek stoklanan grupta ise 24.6 g olarak ölçmüşlerdir. Buna ek olarak düşük stoklanan grupta ortalama YÇO değerinin 1.8, yüksek stoklanan grupta ise 2.3 olduğunu kaydetmişlerdir.

Lin ve ark (2015), çalışmalarında farklı stok yoğunluklarında (2, 10, 20, 30 ve 40 karides/L) yetiştirilen Pasifik beyaz karideslerde (ortalama 12.2 g) *V. alginolyticus* enfeksiyonu ve WSSV direnci ile ilişkili olarak immün parametrelerini araştırmışlardır. Hemosit sayımı, PO, oksidatif patlama, süperoksit dismutaz aktivitesi, lizozim aktivitesi ve hemolenf proteini dahil tüm immün parametrelerin stok yoğunluğu ve zamanla negatif olarak ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar 12 saat enfeksiyon sonrasında 10 adet/L stok yoğunluğunda yetiştirilen karideslerin PO aktivitesi, süperoksit dismutaz aktivitesi ve lizozim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Bu immün parametrelerin proteinle ilişkili transkript seviyelerinin 12 saat sonra 20, 30 ve 40 adet/L stok yoğunluklarında azaldığını kaydetmişlerdir. Karideslerde *V.*

alginolyticus'a karşı fagositik aktivite ve temizlenme etkinliği değerlerinin 12 saat sonra 30 ve 40 adet/L stok yoğunluğunda önemli ölçüde düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Ölüm oranının 20 ve 40 adet/L stok yoğunluğunda 2 adet/L stok yoğunluğundan sırasıyla 12-144 ve 12-48 saat boyunca önemli ölçüde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar yüksek yoğunluklarda yetiştirdikleri karideslerin (>10 karides/L) bağışıklıkla ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerinin azalması ile birlikte bağışıklık parametrelerinin ve patojenlere karşı direncin azalmasının, bağışıklık sistemindeki bozulmaları belirttiğini ifade etmişlerdir.

Suriya ve ark (2016), *L. vannamei*'nin stok yoğunluğunun hayatta kalma ve büyüme performansı üzerine etkisini dört farklı karides çiftliğinde araştırmışlar ve stok yoğunluklarını 100 adet/m² ve 12 adet/m² olarak belirlemişlerdir. Karideslerin hayatta kalma oranını, sırasıyla %80 ila %90, YÇÖ değerlerini 1.39 ile 1.4, ortalama vücut ağırlığını 20 ila 34 g ve toplam üretimi ise 5861 ile 9500 kg olarak kaydetmişlerdir.

Gao ve ark (2017), juvenil karideslerde (*L. vannamei*) (ortalama 2 g) stoklama yoğunluğunun büyüme, oksidatif stres ve HSP70 üzerine etkisini araştırmak amacıyla kafeslere 188, 250 ve 313 adet/m² stoklamışlar ve 60 gün boyunca beslemişlerdir. Karideslerin hayatta kalma oranının stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte azaldığını (sırasıyla % 83.3, % 79.2 ve % 78.7) kaydetmişlerdir. Deneme sonunda spesifik büyüme oranının ve ağırlık kazancının 188 adet/m² grubunda 250 ve 313 adet/m² gruplarından; yem çevrim oranının 313 adet/m² grubunda 188, 250 adet/m² gruplarından önemli ölçüde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Karideslerin filan ağırlığının stoklama yoğunluğunun artışı ile azaldığını ve 313 adet/m² adet grubunda 188 adet/m² grubundan önemli ölçüde düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar karideslerde HSP70'in hepatopankreasta artan stoklama yoğunluğu ile önemli ölçüde arttığını, kasta 250 adet/m² grubunda 188 adet/m² grubundan önemli ölçüde yüksek olduğunu, hemolenfte ise gruplar arasında bir fark olmadığını kaydetmişlerdir. Antioksidan

özelliklerin (superoksit dismutaz, katalaz, malondialdehit ve glutatyon) ise karideslerde düşük stoklama yoğunluğunda hemolenf, hepatopankreas ve kasta daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar Pasifik beyaz karideslerin yüksek stoklama yoğunluğu altında yetiştiriciliği yapıldığında, büyüme, yem tüketimi, antioksidan özellik ve stres direnci kabiliyetinin azaldığını, yüksek stoklama yoğunluğunun karideslerin büyümesini ve refahını etkileyebileceği sonucuna varmışlardır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmalarda kullanılmak üzere gerekli olan Pasifik beyaz karidesi (*Litopenaeus vannamei*) postlarvaları (PL8-10) Tayland'dan ithal edilerek Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi'ne ait olan Deniz Ürünleri Ar-Ge Tesisine getirilmiş ve burada denemelerde kullanılana kadar iki adet 1x10x1 m beton tanklarda ‰20 tuzlulukta ve 28-30°C sıcaklıkta adaptasyon amacıyla bekletilmiştir.

Tüm deneme çalışmaları Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi'ne ait olan ve kampus alanında kurulu olan Deniz Ürünleri Ar-Ge Tesisinde yürütülmüştür.

3.2. Metot

Bu tezde iki deneme yürütülmüştür. Her bir denemenin dizaynı, kurulumu, alınan ölçüm ve analizler ayrı ayrı verilmiştir.

3.2.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının *Litopenaeus vannamei*'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri

Projenin I. Denemesinde karideslerde stoklama yoğunluğunun yaşama oranı, büyüme ve yem tüketimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada yüksek stok yoğunluğuna olan toleransı nedeniyle Pasifik beyaz karidesi tercih edilmiştir.

Tez çalışmasının bu denemesinde (Şekil 3.1 ve 3.2'de görülen deneme ünitesinde) her birinin taban alanı 0.2 m² (0.31x0.65x0.56 m) olan plastik dikdörtgen tanklarda (kops kutuları), ön büyüme (nursery) aşamasında yüksek stoklama yoğunluklarının (200, 400 ve 800 adet/m²) karideslerde büyüme ve yem tüketim performansları ve stres üzerine etkileri dayanıklılık testleri (formalin ve tuzluluk testleri) ile ve ayrıca ısı şok proteinleri (HSP70 ve HSP90) analizleri aracılığıyla incelenmiştir.

3.2.1.1. Deneme Dizaynı ve Yönetimi

Tezin I. denemesinde (Şekil 3.1 ve 3.2’de görülen deneme ünitesinde) her birinin taban alanı 0.2 m^2 ($0.31 \times 0.65 \times 0.56 \text{ m}$) olan plastik dikdörtgen tanklarda (kops kutuları), yüksek stoklama yoğunluklarının (200, 400 ve 800 adet/m^2) karideslerde yaşama oranı, büyüme ve yem tüketimi üzerine etkileri incelenmiştir.

Denemede ortalama ağırlıkları 0.65 g olan karides postlarvaları kullanılmıştır ve Pasifik beyaz karidesinin her stoklama grubu için 4 tank (tekerrür) kullanılmış ve çalışma 3 hafta adaptasyon periyodu ve ardından 4 hafta deneme olmak üzere toplamda 7 hafta sürmüştür. Adaptasyon periyodunda karides yavruları 3 hafta süreyle 1 adet 10 m^2 ($1 \times 10 \times 1 \text{ m}$) beton tank içerisinde 200 adet/m^2 stok yoğunluğunda bekletilmiş ve deneme tanklarına aktarım yapılmadan önce bu stok tankından 9 adet karides kepçelenerek derhal RNA Later solüsyonu içine alınmıştır (0. gün örneği). Denemede 0, 1, 4, 7, ve 30. günlerde HSP70 ve HSP90 analizleri için her gruptan, her örneklemede 9 adet karides alınmış (her tanktan 2-3 adet) ve bunlar doğrudan 1.5 mL plastik ependorf tüplere aktararak üzerlerine RNA Later solüsyonu eklenmiş ve derhal önce -20°C ’ye, 1 gün sonra ise -80°C ’de bir derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Denemenin ilk haftasında yapılan örneklemelede karidesler tüm vücut halinde her biri 1.5 mL ’lik mikrotest (ependorf) tüpe 3 adet karides olacak şekilde (toplam 3 tüp x 3 karides) yerleştirilmiştir. Son örneklemede ise, karidesler irileştikleri için, her bireyin kas, hepatopankreas ve solungaç dokuları disekte edildikten sonra, her bireyin organları bir tüp içerisine birlikte stoklanmıştır.

Çalışma esnasında günlük su değişimi statik yöntemle günde en düşük stoklama yoğunluğunda (200 adet/m^2) %20-30, orta seviye yoğunluktaki grupta (400 adet/m^2) %40-60 ve en yüksek stoklama grubunda ise (800 adet/m^2) %80-100 oranında yapılmıştır. Su sıcaklığı $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ve tuzluluk ise 20.02 ± 0.82 olarak ayarlanmıştır. Deneme süresince beslemede kullanılan yem miktarları düzenli olarak kaydedilmiş ve haftalık olarak su kalite parametreleri (oksijen, pH, toplam

amonyak, nitrit) ölçümü yapılmıştır. Deneme süresince test kitleriyle yapılan haftalık ölçümler neticesinde toplam amonyağın 1 ppm ve nitrit seviyesinin ise 0.5 ppm'den daha yüksek seviyelere çıkmadığı, oksijen seviyesinin >5 ppm ve pH'nın ise 8-8.2 arasında kaldığı anlaşılmıştır.



Şekil 3.1. Farklı stoklama yoğunluklarında stoklanan Pasifik beyaz karidesinde (*Litopenaeus vannamei*) büyüme, yem tüketimi, stres testleri ile stres parametrelerinden ısı şok proteinlerinin gen görünümünün analizlerinin yapılabilmesi için yürütülen denemenin kurulum aşaması.

Karidesler deneme süresince %48 protein ve %10 lipit içeren 0.8-1.2 mm yem ile günde 4 kez (09.00, 13.00, 17.00 ve 23.00 saatlerinde) tank biyomasının %7-8'i üzerinden, ancak ağırlıklı olarak bir sonraki yemleme zamanında tank tabanında tüketilmeyen yemlerin miktarına bakılarak yemlenmişlerdir. Günlük olarak verilmesi hesaplanan yem miktarının %60'ı eşit oranlarda olmak üzere saat 09.00, 13.00 ve 17.00'de verilirken, geri kalan %40'ı ise saat 23.00'de verilmiştir. Gece yemlemesi hariç, beslemeden 2 saat sonra tankların tabanında kalan yemlerin miktarına göre (sifonla dışarı alınan) bir sonraki yemleme oranı ayarlanmaya çalışılarak, karideslerin yemlerden maksimum

faaydalanmasına çalışılmıştır. Net yem tüketim değerleri verilen yem miktarı ile etüvde kurutulan yem miktarlarının farkından hesaplanmıştır. Tketilmeyen yemler sifonlama yoluyla toplanarak ve kurutularak günlük net yem tüketim miktarları tespit edilebilmiştir. Alınan rnekler etüvde 105°C’de 4-5 saat süreyle (sabit ağırlığa kadar) kurutulmuş ve ardından desikatörde oda sıcaklığına getirildikten sonra 0.01 g hassas terazide tartılmıştır.



şekil 3.2. Karides yavrularında yüksek stoklama çalışmasının (I. Deneme) yürütüldüğü nite.

Bu çalışmada son rneklemeye denemenin 30. gününde yapıldıktan sonra kalan tüm karideslerde bireysel olarak ağırlık ölçümleri yapılmış ve deneme süresince kaydedilen yem tüketim değerleri sayesinde gruplar arasında büyüme yem tüketim performans kıyaslamaları yapılmıştır. Ayrıca, deneme sonunda kalan karideslerde formalin ve tuzluluk dayanıklılık testleri de yapılarak stok yoğunluğunun karideslerde direnç üzerine etkileri ek verilerle desteklenmeye çalışılmıştır.

3.2.1.2. Dayanıklılık Testleri**3.2.1.2.(1). Formalin Testi**

Bu test için uygun formalin dozunu belirlemek amacıyla ‰20 tuzlulukta deniz suyuna (28°C sıcaklık) 200 ppm formalin olacak şekilde ‰34.5'lik formaldehit (Merck) eklenmiş ve ardından solüsyon içerisine 20 adet karides yerleştirilerek karideslerde ölü bireyler 6 saat boyunca (0.5, 1, 3 ve 6 saat) gözlenmiştir. Bu testte herhangi bir ölüm görülmediği için, aynı işlem önce 400 ppm, ardından da 800 ppm formalin seviyesinde tekrarlanmıştır. En sonunda dozaj 1600 ppm seviyesine çıkartıldığında 0.5 saatte yüksek ölüm oranı (‰70) ile karşılaşıldığı için, testin 1200 ppm seviyesinde yapılmasına karar verilmiştir.

Buna göre, stoklama denemesi sonunda her stoklama yoğunluğu için 3 adet 24x34x15 cm (10 L hacim) boyutlarında dikdörtgen plastik kaplar kullanılmış (3 stoklama yoğunluğu için toplamda 9 adet) (Şekil 3.3) ve bunların içine 8 L olarak doldurulan deniz suyuna (‰20 tuzluluk, 28°C sıcaklık) 1200 ppm formalin eklenmiştir. Sürekli olarak havalandırılan tankların her birisine 10'ar adet karides tesadüfi olarak stoklanmış ve uygulamanın ardından 0.5, 1, 3 ve 6'ncı saatlerde ölü bireyler kaydedilmiştir.

3.2.1.2.(2). Tuzluluk Testi

Formalin testi tamamlandığında, yine aynı düzenek içerisinde üstte belirtilen teknikle tuzluluk stres testi yapılmıştır. Bunda da her stoklama yoğunluğu için 3 adet 24x34x15 cm (10 L hacim) boyutlarında plastik dikdörtgen kaplar kullanılmıştır (Şekil 3.3) (3 stoklama yoğunluğu için toplamda 9 kap). Bir tankta (1 tonluk) 28°C sıcaklığa gelinceye kadar ısıtılan tatlı su (kuyu suyu) 8 L olacak şekilde her kaba doldurulmuş ve havalandırma devreye sokulmuştur. Bu işlemlerin ardından, ‰20 tuzlulukta deniz suyunda bulunan karidesler kepçe ile alınarak doğrudan tatlısu içeren her kap içerisine 10'ar adet karides olacak şekilde tesadüfi

olarak stoklanmıştır. Uygulamanın ardından 0.5, 1, 3 ve 6'ncı saatlerde ölü bireyler kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. Formalin ve tuzluluk testinden görüntüler.

3.2.1.3. Büyüme ve Yem Tüketimi

Deneme sonunda her tanktan tesadüfi olarak 30-40 adet karides örneklenmiş ve bireysel olarak 0.01 g hassasiyette bir terazi ile bireysel ağırlıklar tartılmıştır. Formalin ve tuzluluk testleri sonucunda ölen ve hayatta kalan karideslerin tamamı da bireysel olarak tartılmış ve bunlar da büyüme hesaplamalarında kullanılmıştır.

3.2.1.4. Isı Şok Proteinleri (HSP) Analizi

Denemede 0, 1, 4, 7 ve 30. günlerde HSP70 ve HSP90 analizleri için her gruptan, her örneklemede 9 adet karides alınmış (her tanktan 2-3 adet) ve bunlar doğrudan 1.5 mL plastik ependorf tüplere aktarılıp üzerlerine RNA Later solüsyonu eklenmiş ve derhal önce -20°C'ye, 1 gün sonra ise -80°C'de bir derin dondurucuya yerleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Doku örnekleme.

Denemenin ilk haftasında yapılan örneklemelemlerde karidesler tüm vücut halinde her biri 1.5 mL’lik mikrottest (ependorf) tüpe 3 adet karides olacak şekilde (toplam 3 tüp x 3 karides) yerleştirilmiştir. Son örneklemede ise, karidesler irileştikleri için, her bireyin kas, hepatopankreas ve solungaç dokuları disekte edildikten sonra, her bireyin organları bir tüp içerisinde birlikte stoklanmıştır (Şekil 3.4). Bu örneklemede her bireyin organları bir tüp içerisinde birlikte korunmuştur. Kuru buz içerisinde Tayland’ın Kasetsart Üniversitesi’ne ulaştırılan örnekler aşağıda açıklanan tekniklerle toplam RNA ve cDNA sentezi ve ardından da Real

Time PCR Analizleri ile HSP70 ve HSP90 genlerinin görünüm analizleri bu üniversitenin Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarında yürütülmüştür.

a) Toplam RNA ve cDNA Sentezi: Toplam RNA ekstraksiyonunda, et doku örnekleri FastPrep®homojenizatör ile 40 sn süreyle homojenize edilmiş (MP Biomedicals, USA) ardından kloroform kullanarak faz ayrımı yapılmıştır. Toplam RNA'lar propanol ile çöktürülmüş ve %75'lik etilalkol ile yıkanmıştır. Ardından, RNA peletleri kurutulmuş ve NanoDropSpektrofotometre (NanoDrop 2000, ThermoScientific, USA) ile RNA seviyesi belirlenerek final yoğunluğunun 1 µg seviyesine ayarlanması sağlanmıştır. Üretici firmanın önerdiği protokol ile Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kitleri (Fermentas, USA) kullanılmış mRNA'ların cDNA'lara (firststrand) dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

b) Real time-PCR Analizleri: Üstte belirtilen 1 µg cDNA kullanılarak Quantitative real-time PCR (Brilliant®II SYBR®Green QPCR Master MixStratagene, USA) analizi yapılmış ve bunun için *L. vannamei*'nin HSP70 ve HSP90 spesifik primerleri kullanılmıştır. Ölçülen her gen Pasifik beyaz karidesinin beta-actin geninin spesifik primerleri kullanılarak beta-actin ekspresyon seviyeleri ile lateral olarak normalize edilmiştir. Realtime-PCR'da 10 dk süreyle 95°C'de bir döngü, ardından 30 sn süreyle 95°C'de, 30 sn süreyle 55°C'de ve 1 dk süreyle 72°C'de 40'ar döngü ve son olarak 1 dk süreyle 95°C'de, 30 sn süreyle 55°C'de ve 30 sn süreyle 95°C'de 1'er döngü tercih edilmiştir. Elde edilen sınır değerleri (CT) kaydedilerek, *L. vannamei*'nin test edilen her organındaki 5 hücrel stres ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. İlgili genlerin nispi ekspresyon oranları 2-ΔΔCT metodu ile hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Her reaksiyonun beta-actin mRNA, Her reaksiyonun HSP70, HSP90 ve beta-actin mRNA'ları arasındaki eşik çevrim değeri farkı (ΔCT), mRNA seviyesini normalleştirmek için kullanılmıştır. Farklı zaman dilimlerinde, karidesin test edilen tüm dokuları için HSP70 ve HSP90 mRNA'ların nispi kopya sayısı, ilk gündeki (0. Gün) gen ekspresyon düzeyi kalibratör olarak kullanılmak suretiyle hesaplanmıştır.

3.2.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasının II. denemesinde, resirküle sistemde farklı stoklama yoğunluklarının (40, 80 ve 160 adet/m²) karideslerde (*L. vannamei*) stres oluşturup oluşturmadığını belirlemek için; büyüme, yem tüketimi, bazı hemolenf (plazma laktat, total protein, trigliserit) ve immünolojik parametreler [alkalin fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)] ile ısı şok proteinlerindeki değişim 4 ay süreyle araştırılmıştır.

3.2.2.1. Deneme Dizaynı ve Yönetimi

Denemede kullanılacak olan karidesler (*L. vannamei*) bekleme tanklarından (2 adet 1x10x1 m beton tanklarda %20 tuzlulukta ve 28-30°C sıcaklıkta) deneme tanklarına alınmıştır. Deneme 6 kattan oluşan bir resirküle sistemde (RAS) 6 adet 2x6x0.5 m (en x boy x yükseklik) boyutunda fiberglas tanklarda üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) ve 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür (Şekil 3.5-3.6-3.7). Bu RAS sistemi 1 adet çökeltme tankı (beton), 1 adet otomatik filtre, 1 adet ısı pompası, 1 adet biyofiltre ve 1 adet su pompasından oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Sistemde su pompası (1 HP) ve hava motoru (blower, 1 HP) günün ışıklı zamanlarında tamamıyla solar enerji santralinden elde edilen elektrik ile beslenmiş gece saatlerinde ise şebeke elektriği kullanılmıştır.

Deneme 17 Mayıs 2017 tarihinde başlatılmış ve çalışmada ortalama ağırlıkları 1.06 g olan karidesler kullanılmıştır. Deneme süresince besleme günde 4 kez (09:00, 13:00, 18:00 ve 23:00) olacak şekilde yürütülmüştür. Besleme Kumlu (2001)'de belirtildiği şekilde biyomasa göre ve elle yapılmıştır. Her tanka verilen yem düzenli olarak kaydedilerek denemenin sonunda yem değerlendirme oranları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. II. Denemede kullanılan yem formülasyonu.

HAMMADDE	Bağlayıcı İçeren Deneme Yemleri (%)
¹ Balık Unu	30
² Soya Küspesi Unu	12.5
³ Mısır Glüten Unu	13.0
¹ Buğday Unu	36
¹ Balık Yağı	2.4
⁴ Soya Lesitini	2.0
¹ Vitamin Premiksi*	0.8
¹ Mineral Premiksi**	0.2
¹ Vitamin C	0.1
¹ Bağlayıcı Madde	3.0
HESAPLANAN BESİN İÇERİĞİ (%)	
Kuru Madde	90.53
Ham Protein	38.14
Lipit	9.13
Ham Kül	6.05
Ham Selüloz	1.53
Toplam Enerji (MJ/kg)	19.54

¹Sibal Su Ürünleri, Sinop, Türkiye²Doğalsan, Adana, Türkiye³Sunar Mısır Entegre Tesisleri San. ve Tic. A.Ş., Adana, Türkiye⁴Tito Soy lecithin, Germany, Tedarik: Smart Kimya Ticaret ve Danışmanlık Ltd. Şti, İzmir, Türkiye

*Vitamin Premiks (mg/kg): retinil asetat 2.58 mg, DL-kolekalsiferol 0.037 mg, DL-a tokoferil asetat 30 mg, menadion sodyum bisülfat 2.5 mg, tiamin 7.5 mg, riboflavin 15 mg, piridoksin 7.5 mg, nikotinik asit 87.5 mg, folik asit 2.5 mg, kalsiyum pantotenat 2.5 mg, vitamin B12 0.025 mg, askorbik asit 250 mg, inositol 500 mg, biyotin 1.25 mg ve kolin klorür 500 mg.

** Mineral Premiks (mg/kg): kalsiyum karbonat (%40 Ca) 2.15 g, magnezyum hidroksit (%60 Mg) 1.24 g, potasyum klorür 0.9 g, ferrik sitrat 0.2 g, potasyum iyodin 4 mg, sodyum klorür 0.4 g, kalsiyum hidrojen fosfat 50 g, bakır sülfat 0.3 g, çinko sülfat 40 g, kobalt sülfat 2 g, manganez sülfat 30 g, sodyum selenit 0.3 g.

Deneme süresince beslemede kullanılan %38 protein ve %9 lipit içeren yemler 1.0, 1.5 ve 2.0 mm çapında üç farklı boyutta denemenin yürütüldüğü Deniz Ürünleri Ar-Ge tesisinde üretilmiştir (Çizelge 3.1). Bu yemler pres peletleme

yapıldıktan sonra 30 dk süreyle 110°C sıcaklıkta bir basınçlı kapta pişirilmiştir. Bu sayede su stabiliteleri yükseltilecek yemler uzun süre (en az 7 saat) dağılmadan suda bütünlüğünü koruyabilmiştir. Böylece, RAS sisteminde besin kaybı olmadan peletlerin uzun bir süreçte tüketilebilmeleri mümkün olabilmis ve su kalitesi yüksek tutulabilmiştir.

Denemenin 2. ve 4. ayları sonunda her tanktan 6-8'er adet karides örneklenerek bunlardan hemolenf alınmış, ısı şok proteinleri analizleri (HSP70 ve HSP90) için ise 0, 60 ve 120. günlerin sonunda kas, hepatopankreas ve solungaç doku örneklemeleri yapılmıştır.

3.2.2.2. Su Kalitesi

Denemelerde kullanılan deniz suyu Yumurtalık Deniz Ürünleri Araştırma İstasyonu'ndan bir tankerle Adana'da bulunan kampus alanındaki Deniz Ürünleri Ar-Ge tesisine getirilmiş ve yer altı kuyu suyu (85 m derinlikte) ile karıştırılarak tuzluluk ‰20 civarına düşürülmüştür. Denemelerde pH, toplam amonyak, nitrit, nitrat, tuzluluk, alkalinite ve çözünmüş oksijen düzenli olarak (haftalık) ölçülmüştür. Bu amaçla tesislerimizde bulunan 1 adet pH-metre (Hanna), 1 adet refraktometre ve 1 adet oksijenmetre (YSI Model) kullanılmıştır. Diğer su parametrelerinin ölçülmesinde ise test kitleri tercih edilmiştir.

3.2.2.3. Performans Ölçümü

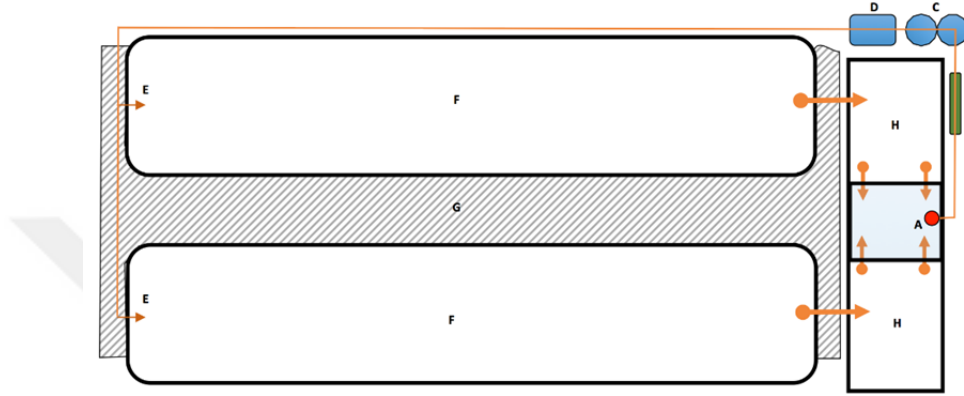
Deneme sonunda her tanktan en az 100 adet karides tesadüfi olarak örneklenmiş ve bunlardan bireysel ağırlık ölçümü yapılmıştır. Deneme gruplarının büyüme ve yemden yararlanma performansları aşağıdaki formüllerle belirlenmiştir;

Spesifik büyüme oranı (% / gün) = $[(\ln FA - \ln BA) / \text{gün}] \times 100$
(Company ve ark., 1999),

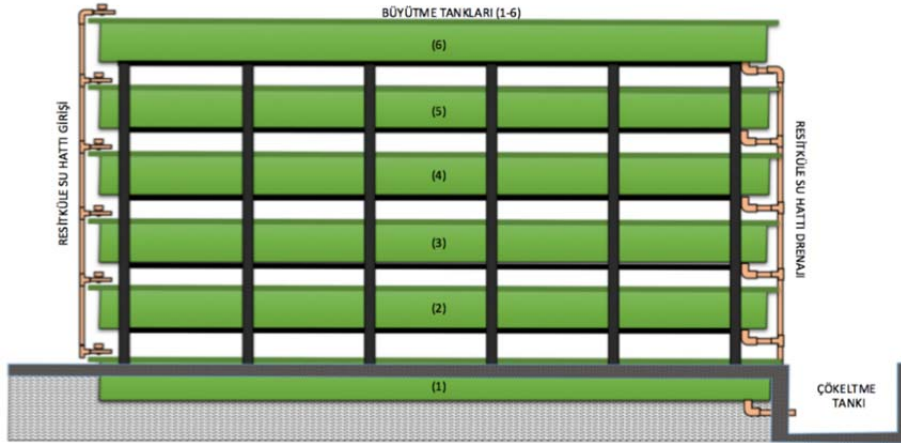
Yemden yararlanma oranı = $\text{Tüketilen yem (g)} / \text{canlı ağırlık artışı (g)}$ (Santinha ve ark., 1999),

Günlük yem tüketimi (GYT) (g / gün) = ortalama yem tüketimi / gün

Burada, BA deneme başı ağırlık, FA deneme sonu (final ağırlık) ağırlıktır.



Şekil 3.5. Projenin II. Denemesinin yürütülmesinde kullanılan ve iki katlı tank sisteminden oluşan deneme ünitesi. A: Rezervuar, ve Dalgıç Pompa, B: Otomatik Filtre, C: Biyofiltreler, D: Isı-pompası, E: Geri Dönüş Hattı Su Girişi, F: Katlı Sistemlerde Bulunan Karides Yetiştiricilik Tankları, H: Çökeltme Tankları, G: Katlı Sistemler Arası Yürüme Platformu



Şekil 3.6. Katlı tank sistemlerinin yan profilden görünümü.



Şekil 3.7. II. Denemede kurulan ve RAS olarak kullanılan katlı tank sistemi.



Şekil 3.8. Katlı sistemde kullanılan tankların su ile doldurulması ve denemeye hazır hale getirilmesi.

3.2.2.4. Hemolenf Alımı ve Hemosit Sayımı

Denemenin başlangıcında karidesler çok küçük olduklarından kan örneği alınamamış ve ilk örnekleme ancak denemenin 2. ayının sonunda ikinci örnekleme ise deneme sonunda (4. ayın sonu) yapılmıştır. Bu amaçla her tanktan 6-8 adet karides alınmış ve her bireyin ilk abdominal segmentinin ventralinde bulunan pleopodların kaidesinden içeriye doğru 1 mL'lik bir mikro-enjektör (ilk örneklemede 400 µL, ikinci örneklemede 500 µL antikoagülan ile tamponlanmış) batırılarak hemolenf çekilmiştir (Şekil 3.9). Her karidesten 300-500 µL kadar hemolenf alınabilmektedir. Antikoagülan olarak 30 mM trisodium citrate, 0.34 M sodium chloride, 10 mM EDTA ve 0.115 M glucose (Osmolaliteyi 780 mOsm/kg'a çıkarmak için) içeren ve pH'sı 7.55'e ayarlanmış bir solüsyon kullanılmıştır.

Hemolenf alımından hemen önce kullanılacak olan mikro-enjektörler 400-500 µL antikoagülan ile tamponlandıktan sonra ventral sinüsten hemolenf çekilmiştir. 25-30 µL kan/antikoagülan karışımı hemositometre üzerine damlatılmış ve total hemosit sayımı (Leica DMIL, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) hemositometrede (improved Neubauer) yapılmıştır. Her örnek için hemosit sayımı bir mikroskopta 40'lık büyütmede iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Biyokimyasal analizler, fagositik aktivite ve lizozim aktivitesi için mikrotest tüp içerisinde kalan kan/antikoagülan karışımı 25°C'de 20 dk süreyle 300 rpm'de santrifüj edilerek serum ayrıştırılmış, otomatik mikropipet ile ayıklanan pelet ve serum analizlerde kullanılmıştır. Biyokimyasal analizler için elde edilen serum örnekleri etiketlenmiş 1 mL'lik ependorf tüpler içerisinde analizler yapılncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.9. Hemolenf alımı

3.2.2.5. Analizler

3.2.2.5.(1). Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için elde edilen serum örnekleri daha öncede belirtildiği gibi etiketlenmiş 1 mL'lik ependorf tüpler içerisinde analizler yapıncaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Biyokimyasal analizlerden trigliserit, total protein, laktat, alkalın fosfataz, aspartat aminotransferaz ile alanin aminotransferaz seviyeleri ölçümü Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Beckman Coulter Unicel DxC 800 cihazında kemilüminesans (kimyasal ışıldama) ile tam otomatik otoanalizatörde belirlenmiştir.

3.2.2.5.(2). Fagositik Aktivite

Bu analiz için denemenin sadece 60. gününde, her stoklama grubundan 8 adet olmak üzere toplamda 24 karides örneklenmiştir. Bu karideslerden alınan hemolenf ve antikoagülant karışımı 20 dakika süreyle 300 rpm ile 25°C'de santrifüjlendikten sonra serum örneği ayrılmış ve kalan peletin üzerine 200 µL PBS (fosfat tampon çözeltisi, pH 7.4) solüsyonu eklenmiştir. Ardından 15 µL örnek hemositometreye koyularak hemosit sayımı yapılmış ve sayımda aşağıdaki formül kullanılarak 1 mL örnekteki hücre miktarı belirlenmiştir.

$$1 \text{ mL örnekte} = 0.2 \text{ mm bölmelerinde sayılan ortalama hücre sayısı} \times 0.25 \times 10^6 \text{ hücre}$$

Hemosit yoğunluğu $10^6/200 \mu\text{L}$ olacak şekilde PBS solüsyonu kullanılarak seyreltme yapılmış ve lateks mikrobuncuk (floresan sarı-yeşil renkte, Sigma Aldrich, USA) tanelerinin final yoğunluğu $10^7/200 \mu\text{L}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Boş petri kutularına hemolenf miktarlarına göre 1 ya da 2 adet lamel yerleştirilmiş ve lamellerin üzerine hemolenften 200 µL koyularak 2 saat boyunca yüzeye tutunması için beklenmiştir. Ardından PBS solüsyonu ile 3 kez yıkanarak yüzeye tutunamayan ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra lateks solüsyonu fagosit hücrelerinin üzerine damlatılmış ve 1.5 saat enkapsüle etmesi için beklenilmiştir. Fazla lateks taneleri ve tutunamamış hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla PBS solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Diff-Quick Staining boya seti ile 10 sn süreyle fikse edilmesinin ardından, ilk boyama ve ikinci boyama yapılmış ve distile su ile yıkama yapılarak kurumaya bırakılmıştır. Mikroskop altında sayım yapılmış Fagositik İndeks (PI) ve Fagositik aktivite (PA) değerleri aşağıdaki formüllerden yararlanılarak hesaplanmıştır (Puangkaew ve ark., 2004; Koenigsknecht ve Landreth, 2004).

$$PA = \frac{\text{Fagositik aktivite gösteren hücre sayısı}}{\text{Toplam sayılan hücre sayısı}}$$

$$PI = \frac{\text{Her hücredeki ortalama lateks tane sayısı}}{\text{Fagositik aktivite gösteren hücre sayısı}}$$

3.2.2.5.(3). Lizozim Aktivitesi

Üstte belirtilen her karidesin kan serum örneği (25 µL) 96-gözlü mikrolakaya (her karides için üç tekrür) yerleştirilmiştir (Şekil 3.10). Kasetart Üniversitesi'nden getirtilen *Micrococcus lysodeikticus* 0.2 mg/mL (Sigma-Aldriche, USA) (Na₂PO₄ buffer pH 6.2) yoğunlukta hazırlanmış, 200 µL/mikrolaka [175 µL (buffer + bakteri) + 25 µL (serum); kontrol: 175 µL (buffer + bakteri) + 25 µL (buffer)] olacak şekilde 96-gözlü plaka içine aktarılmıştır. Her örneğin kantitatif absorbens değerleri 450 nm'de 6.5 dk boyunca mikrolaka okuyucuda okutulmuştur. İlk okuma 30 saniye, ikinci okuma ise 5 dakika sonra yapılmıştır. Lizozim aktivitesi analizi için ELİSA (Medispec ESR 200, Germantown, Md., USA) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler sonunda 0.001'lik absorbens değerindeki azalma 1 ünite lizozime eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Her karides kan örneği için lizozim aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Ünite/mL enzim} = [(\Delta A_{450/6.5 \text{ dk Test}} - \Delta A_{450/6.5 \text{ dk Blank}}) (df)]$$

burada: 'df' kanın seyreltme faktörüdür.



Şekil 3.10. Elisa okumaları için hazırlık aşamalarından görüntüler.

3.2.2.5.(4). Isı Şok Proteinleri (HSP) Analizi

Denemede 0, 60 ve 120. günlerde HSP70 ve HSP90 analizleri için her gruptan 6 adet karides örneklenmiş ve bunlar doğrudan RNA Later solüsyonuna koyularak -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Denemenin ilk haftasında yapılan örneklemelerde karidesler tüm vücut halinde doğrudan 1.5 mL'lik mikrotest (ependorf) tüplerine yerleştirilmiş (her tanktan 3 adet 1 test tüpüne yerleştirilerek), son örneklemede ise, karidesler irileştikleri için, her bireyin kas, hepatopankreas ve solungaç dokuları disekte edildikten sonra tüplere yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Bu örneklemede her bireyin organları bir tüp içerisinde birlikte korunmuştur. Kuru buz içerisinde Tayland'ın Kasetsart Üniversitesi'ne ulaştırılan örnekler aşağıda açıklanan tekniklerle toplam RNA ve cDNA sentezi ve ardından da Real Time PCR Analizleri ile HSP70 ve HSP90 genlerinin görünüm analizleri bu üniversitenin Su Ürünleri Fakültesi'nin laboratuvarlarında yürütülmüştür.

a) Toplam RNA ve cDNA Sentezi: Toplam RNA ekstraksiyonunda, et doku örnekleri FastPrep®homojenizatör ile 40 sn süreyle homojenize edilmiş (MP Biomedicals, USA) ardından kloroform kullanarak faz ayrımı yapılmıştır. Toplam RNA'lar propanol ile çöktürülmüş ve %75'lik etilalkol ile yıkanmıştır. Ardından, RNA peletleri kurutulmuş ve NanoDropSpektrofotometre (NanoDrop 2000,

ThermoScientific, USA) ile RNA seviyesi belirlenerek final yoğunluğunun 1 µg seviyesine ayarlanması sağlanmıştır. Üretici firmanın önerdiği protokol ile Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kitleri (Fermentas, USA) kullanılmış mRNA'ların cDNA'lara (firststrand) dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

b) Real time-PCR Analizleri: Üstte belirtilen 1 µg cDNA kullanılarak Quantitative real time-PCR (Brilliant®II SYBR®Green QPCR Master MixStratagene, USA) analizi yapılmış ve bunun için *L. vannamei*'nin HSP70, HSP90 spesifik primerleri kullanılmıştır. Ölçülen her gen Pasifik beyaz karidesinin beta-actin geninin spesifik primerleri kullanılarak beta-actin ekspresyon seviyeleri ile lateral olarak normalize edilmiştir. Real time-PCR'da 10 dk süreyle 95°C'de bir döngü, ardından 30 sn süreyle 95°C'de, 30 sn süreyle 55°C'de ve 1 dk süreyle 72°C'de 40'ar döngü ve son olarak 1 dk süreyle 95°C'de, 30 sn süreyle 55°C'de ve 30 sn süreyle 95°C'de 1'er döngü tercih edilmiştir. Elde edilen sınır değerleri (CT) kaydedilerek, *L. vannamei*'nin test edilen her organındaki 5 hücrel stres ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. İlgili genlerin nispi ekspresyon oranları 2-ΔΔCT metodu ile hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Her reaksiyonun beta-actin mRNA, Her reaksiyonun HSP70, HSP90 ve beta-actin mRNA'ları arasındaki eşik çevrim değeri farkı (ΔCT), mRNA seviyesini normalleştirmek için kullanılmıştır. Farklı zaman dilimlerinde, karidesin test edilen tüm dokuları için HSP70 ve HSP90 mRNA'ların nispi kopya sayısı, ilk gündeki (0. gün) gen ekspresyon düzeyi kalibratör olarak kullanılmak suretiyle hesaplanmıştır.

3.2.2.6. İstatistik Analizler

Büyüme, yem tüketimi, dayanıklılık testleri, toplam hemosit sayımı, biyokimyasal analizler, fagositik aktivite, fagositik indeks, lizozim aktivitesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında kıyaslanmıştır ($P<0.05$). Farklı zaman dilimlerindeki HSP genlerinin nispi ekspresyon oranlarının analizinde de tek yönlü varyans analizi

(ANOVA) kullanılmıştır. İstatistik analizler SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



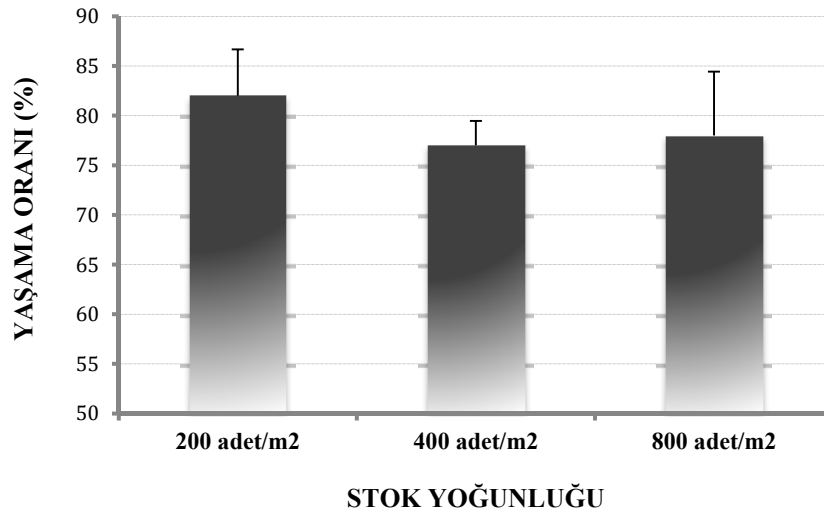
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

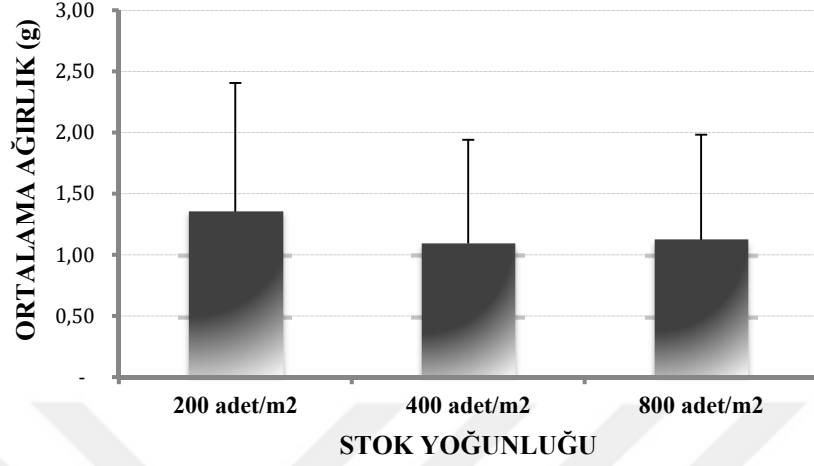
4.1.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının *Litopenaeus vannamei*'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri

4.1.1.1. Büyüme Performansı

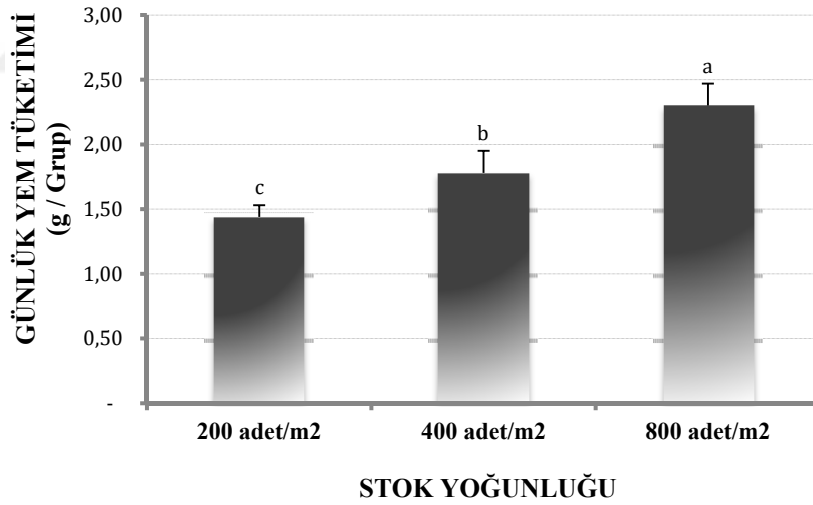
Üç farklı stoklama yoğunluğunda (200, 400 ve 800 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*L. vannamei*) elde edilen deneme sonu yaşama oranları sırasıyla %77, %78 ve %82 olarak gerçekleşmiştir ($P > 0.05$, Şekil 4.1). Deneme sonu karides ortalama ağırlık değerleri de 1.35, 1.09 ve 1.12 g olarak elde edilmiştir (Şekil 4.2, Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonuna kadar elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır ($n = 3$ tank). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$).



şekil 4.2. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütölen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonuna kadar elde edilen ortalama ağırlık değeri. Her değeri bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır (n = 3 tank). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir (P > 0.05).



şekil 4.3. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütölen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonuna kadar tüketilen grup ortalama günlük yem tüketim değeri. Her değeri bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır (n = 3 tank). Farklı harflerle işaretlenen gruplar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır (P < 0.05).

Deneme süresince tutulan yem kayıtlarından günlük yem tüketim değerlerinin stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte arttığını ve gruplardaki ortalama günlük yem tüketim değerlerinin 200 adet/m² stok yoğunluğunda 1.44 g, 400 adet/m²'de 1.78 g ve en yüksek stoklama grubu olan 800 adet/m²'de ise 2.30 g olarak gerçekleştiği hesaplanmıştır (Şekil 4.3, Çizelge 4.1). Gruplar arasında istatistiki olarak farklılıklar bulunmuştur (P<0.05).

Çizelge 4.1. Üç farklı stoklama yoğunluğunda dört hafta süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonu performans değerleri.

PERFORMANS PARAMETRELERİ	DENEME GRUPLARI		
	200 adet/m ²	400 adet/m ²	800 adet/m ²
Karides Başlangıç Ağırlığı (g)	0.65±0.05	0.65±0.05	0.65±0.05
Yaşama Oranı (%)	82.00±4.67 ^a	77.00±2.46 ^a	78.00±6.44 ^a
Deneme Sonu Ortalama Ağırlık (g)	1.35±1.05 ^a	1.09±0.85 ^a	1.12±0.86 ^a
Günlük Yem Tüketimi (g / Grup)	1.44±0.09 ^c	1.78±0.17 ^b	2.30±0.17 ^a

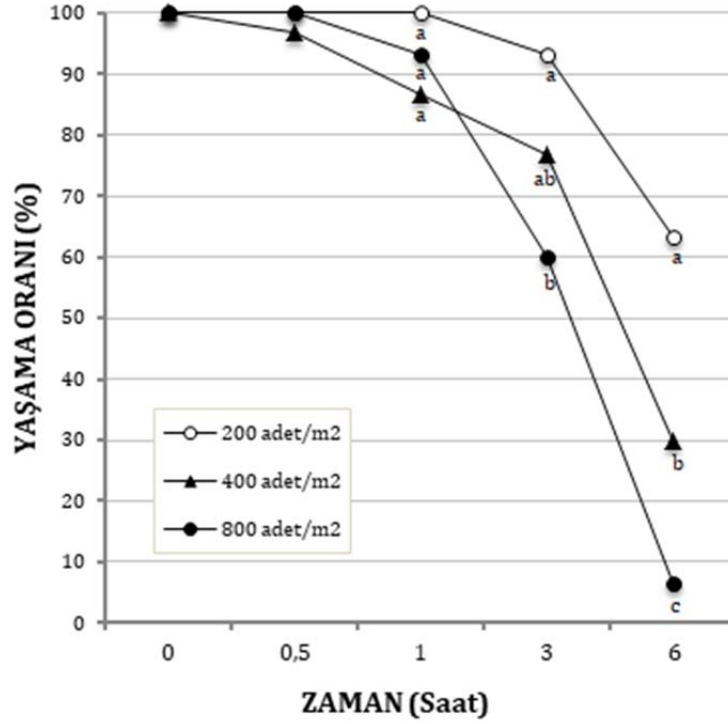
Her değer bir ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Her satırda yer alan ortalamalardan farklı harflerle işaretlenenler birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır (P < 0.05).

4.1.1.2. Stres Testleri

4.1.1.2.(1). Formalin Testi

Bu testte ilk ölümler düşük olsa da ilk ½ saatte görülmeye başlanmış, ancak gruplar arasında ilk farklılaşma testin 3. saatinde görülmüştür. Bu periyotta yüksek yoğunluklarda yetiştirilmiş olan karideslerde (400 ile 800 adet/m²) yaşama oranları %63.00-73.33'e kadar düşmüş, en düşük stoklama yoğunluğunda yetiştirilenlerde ise yaşama oranı %100 olarak kalmıştır (Şekil 4.5, Çizelge 4.2, P<0.05). Formalin testinin 6. saatinde 800 adet/m² grubunda yaşama oranı %6.67'ye kadar düşmüş, 400 adet/m² stok grubunda %30 olarak

gerçekleşmiş ve 200 adet/m² grubunda ise %63.33'te kalmıştır (P<0.05, Çizelge 4.2).

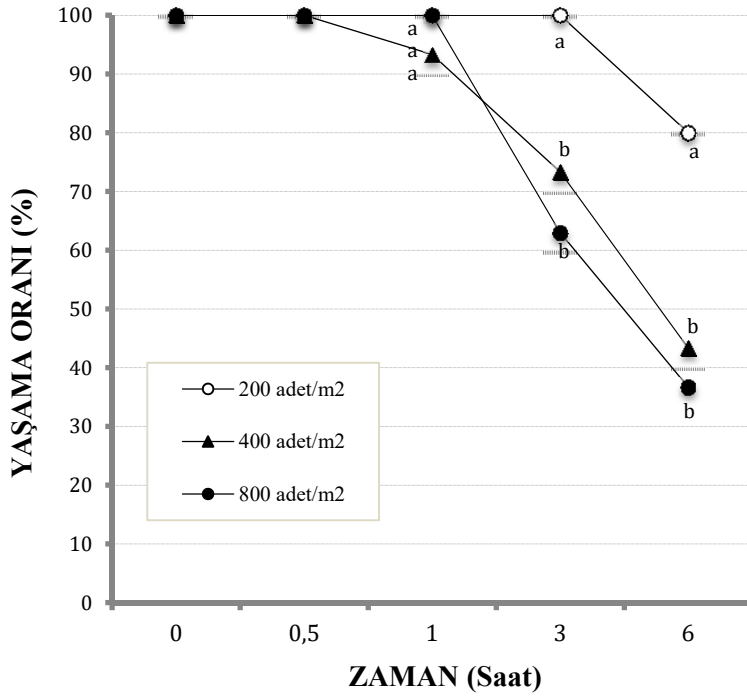


Şekil 4.4. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen formalin stres testi esnasında elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) ± standart sapmadır.

4.1.1.2.(2). Tuzluluk Testi

Tuzluluk testinde ilk ½ saatte herhangi bir ölüm gerçekleşmemiş, ancak 1. saatten itibaren ilk ölümler görülmeye başlanmıştır. Testin 3. saatinde 400 ve 800 adet/m² stok yoğunluklarından alınmış olan gruplarda hayatta kalma oranları %63.00 ile %73.33 seviyelerine kadar düşmüş olup (Çizelge 4.2, Şekil 4.4), 200 adet/m² yoğunluklarından teste alınan karideslerde bu periyotta hiç ölüm kaydedilmemiştir. Testin sonlandırıldığı 6. saatte yüksek yoğunluklarda hayatta

kalma oranları hızla azalmaya devam ederek %36.67-%43.33'e kadar düşmüş ve bu arada düşük stok yoğunlukta tutulan karideslerde yaşama oranı %80 gibi yüksek kalmıştır (Şekil 4.4, $P<0.05$).



Şekil 4.5. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen tuzluluk stres testi esnasında elde edilen yaşama oranları. Her değer bir ortalama (%) $\pm$ standart sapmadır.

Çizelge 4.2. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonrasında 6 saat süreyle gerçekleştirilen tuzluluk ve formalin stres testlerinin neticesinde elde edilen yaşama oranları.

FORMALİN STRES TESTİ			
SÜRE (Saat)	Yaşama Oranları (%)		
	200 adet/m ²	400 adet/m ²	800 adet/m ²
0.0	100.00	100.00	100.00
0.5	100.00 ^a	96.67±5.77 ^a	100.00 ^a
1.0	100.00 ^a	86.67±11.55 ^a	93.33±5.77 ^a
3.0	93.33±11.55 ^a	76.67±5.77 ^{ab}	60.00±10.00 ^b
6.0	63.33±10.00 ^a	30.00±10.00 ^b	6.67±2.89 ^c
TUZLULUK STRES TESTİ			
SÜRE (Saat)	Yaşama Oranları (%)		
	200 adet/m ²	400 adet/m ²	800 adet/m ²
0.0	100.00	100.00	100.00
0.5	100.00	100.00	100.00
1.0	100.00 ^a	93.33±5.77 ^a	100.00 ^a
3.0	100.00 ^a	73.33±5.77 ^b	63.00±11.27 ^b
6.0	80.00±10 ^a	43.33±5.77 ^b	36.67±11.55 ^b

Her değer bir ortalama (%) ± standart sapmadır. Her satırda yer alan ortalamalardan farklı harflerle işaretlenenler birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır (P < 0.05). Denemede her ortalamanın elde edilebilmesinde 3 adet plastik kap ve toplamda 30 adet karides kullanılmıştır.

4.1.1.3. Isı Şok Proteinleri

Üç farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen karideslerde denemenin 0, 1, 3, 7, ve 30. günlerinde alınan doku örneklerinde yapılan HSP70 ve HSP90 gen

ekspresyon analiz sonuçları Çizelge 4.3 ve 4.4'te özetlenmiştir. Denemenin ilk 7 gününde karidesler küçük boyutta oldukları için örneklemler tüm vücut üzerinden alınmış, ancak 30. günde irileşen karideslerin 3 farklı dokusu disekte edilerek örneklenmiştir. Deneme başlatılmadan önce stok tanktan alınan örnek 0. gün örnekleme olarak değerlendirilmiş olup, bu örneklerde HSP70 değeri 1.13 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). 1. günde alınan örneklerde yüksek stoklama yoğunluklarındaki karideslerde HSP70 ekspresyon değerleri daha yüksek çıkmasına karşın herhangi bir istatistiki fark elde edilememiştir ($P>0.05$). Denemenin 3. ve 7. günlerinde alınan örneklerde HSP70 değerlerinde herhangi bir farklılık ortaya çıkmamıştır ($P>0.05$). Denemenin son günü olan 30. günde alınan ve 3 farklı dokuya ayrılan örneklerde ayrı ayrı yapılan HSP70 ekspresyon analizlerinde de stok yoğunluğuyla ilişkili olan belirgin herhangi bir eğilim (trend) elde edilememiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Denemenin farklı dönemlerinde örneklenen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 0, 1, 3, 7 ve 30. günlerdeki HSP70 gen ekspresyon seviyeleri.

Stoklama Yoğunluğu (adet/m ²)	HSP70 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ						
	0. GÜN	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	30. GÜN		
					HP	SOL	KAS
200 adet		1.44±1.54 ^a	1.66±0.91 ^a	2.18±1.46 ^a	1.44±0.17 ^a	0.95±0.14 ^a	1.22±0.47 ^a
400 adet	1.13±0.62	1.96±0.21 ^a	1.51±0.61 ^a	2.26±0.49 ^a	0.84±0.34 ^b	1.02±0.65 ^a	2.13±1.14 ^a
800 adet		1.88±0.54 ^a	2.15±0.37 ^a	1.53±0.27 ^a	1.15±0.38 ^a	1.06±0.44 ^a	1.10±0.39 ^a

Her sütunda yer alan ortalamalardan farklı harflerle işaretlenenler birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$). Her değer bir ortalama ($n = 6$) standart sapmayı ifade etmektedir. HP: Hepatopankreas, SOL: Solungaç, KAS: Kas dokusu.

HSP90 gen ekspresyon analizlerinde 0. gün örneklemeğinde belirlenen 1.51'lik gen ekspresyon oranı, 1. günde stoklama yoğunluğundaki artışa paralel olarak artış göstermiş ve bu artış özellikle 800 adet/m² stok yoğunluğunda, düşük stok yoğunluğuna (200 adet/m²) kıyasla, 9-10 kat yükseliş göstermiştir (P<0.05, Çizelge 4.4). Orta stok seviyesi olan 400 adet/m² grubunda da, 200 adet/m² grubuna kıyasla, HSP90 ekspresyon seviyesi yaklaşık 2.5 kat yükselmiş, ancak istatistik bir farklılık belirlenememiştir (P>0.05). Gruplar arasındaki bu anlamlı farklılık 3. günde daha az belirgin hale gelmiş, ve 7. günde artan stoklama yoğunluğuna paralel bir artış görülmüş olsa da gruplar arasında istatistiki bir farklılık bulunamamıştır (P>0.05, Çizelge 4.4). Denemenin 30. gününde alınan üç farklı doku örneklerinin hiçbirinde de stoklama yoğunluğuyla ilintili bir eğilim belirlenememiştir.

Çizelge 4.4. Denemenin farklı dönemlerinde örneklenen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 0, 1, 3, 7 ve 30. günlerdeki HSP90 gen ekspresyon seviyeleri.

Stoklama Yoğunluğu (adet/m ²)		HSP90 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ					
		0. GÜN	1. GÜN	3. GÜN	7. GÜN	30. GÜN	
						HP	SOL
200 adet			1.17±1.30 ^b	3.60±0.90 ^a	1.93±0.82 ^a	3.65±2.20 ^a	1.54±0.34 ^a
400 adet	1.51±1.52		2.90±0.93 ^b	0.64±0.64 ^b	3.54±2.55 ^a	0.78±0.57 ^b	0.51±0.17 ^b
800 adet			11.38±7.99 ^a	4.03±2.69 ^a	3.93±2.08 ^a	1.26±0.36 ^b	0.83±0.21 ^a

Her değer bir ortalama (n = 6) standart sapmayı ifade etmektedir. Her sütunda farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır (P<0.05).

4.1.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi

4.1.2.1. Su Kalite Parametreleri

Katlı sistemde dört ay süren deneme süresince taze su girdisi ortalama günde 500 L ve ayda yaklaşık 15 ton olarak hesaplanmıştır. Böylece dört ay yetiştiricilik süresince RAS sistemine toplamda sadece 60 ton taze su (tatlısu ve deniz suyu olarak) girmiştir. Buna göre, sistemde dönen su 30 ton olduğuna göre, su sızıntıları, sifonlama ve buharlaşma kayıpları için haftalık su değişimi %12.50, günlük su değişimi ise yaklaşık %1.79 olarak sürdürülmüştür. Tanklar haftada bir kez sifonlanmış ve 24 saat boyunca 1.5 HP gücünde bir blowerdan basılan hava ile havalandırma yapılarak çözünmüş oksijen seviyesi sürekli 7 mg/L'nin üzerinde tutulmuştur. Deneme süresince pH 7.9 ile 8.25, sıcaklık 26 ile 30°C, toplam amonyak 0 ile 1 mg/L, nitrit 0-5 mg/L, nitrat 0 ile 100 ve tuzluluk ise ‰18 ile ‰20 aralığında tutulmuştur (Çizelge 4.5).

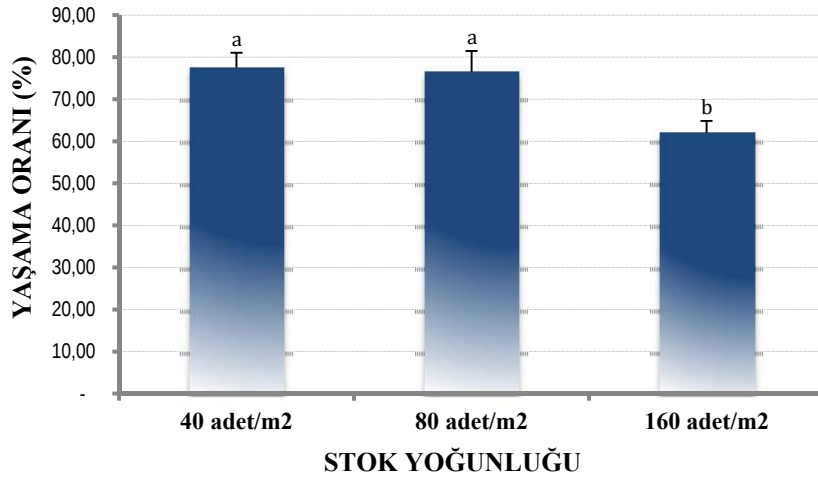
Çizelge 4.5. Katlı sistemde 4 ay süren deneme boyunca ölçülen ortalama aylık su parametre değerleri.

Aylar	Sıcaklık (°C)	Toplam Amonyak (mg/L)	Nitrit (mg/L)	Nitrat (mg/L)	Tuzluluk (‰)
Haziran	26-28	0-1	1-5	10 ile 120	20
Temmuz	28-30	0-0.5	0-2	0-100	18
Ağustos	30	0-0.5	0-2	0-100	18
Eylül	30	0-1	0-5	0-100	18

4.1.2.2. Stoklama ve Yemleme

Denemede karidesler tanklara üç farklı stoklama yoğunluğunda stoklanmadan önce stok tankından tesadüfi olarak alınan 50 adet karides bireysel olarak tartılmış ve ortalama ağırlık 1.06 ± 0.12 olarak ölçülmüştür. Deneme

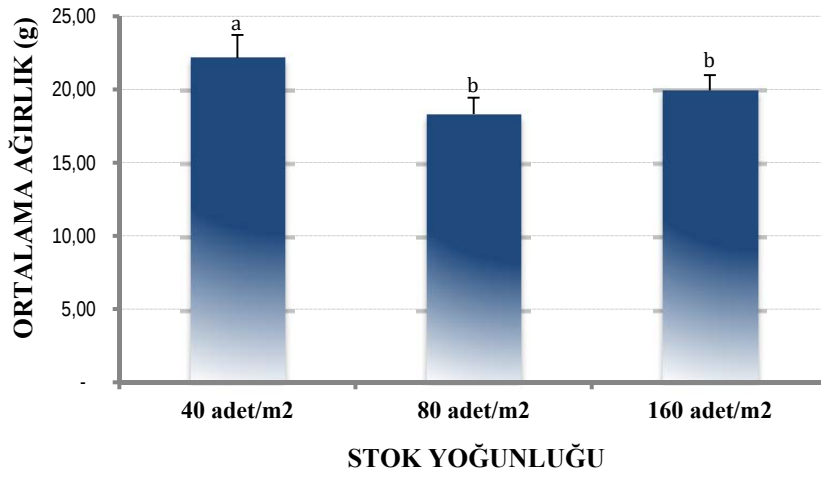
başlatıldıktan sonra ilk yemleme biyomasın %15 oranıyla başlatılmış ve yapılan gözlemler neticesinde ilk haftada oran %12'ye düşürülmüştür. Her yemlemeden 2 saat sonra tankın tabanında yapılan gözlemlerle kalan yem miktarına göre bir sonraki yemlemede verilecek yem miktarı artırılmış veya azaltılmıştır. Tanklar sığ olduğundan çoğunlukla tank tabanında kalan yemler rahatlıkla gözlemlenebilmiş ancak deneme sonuna doğru tank tabanında kepçe ile kalan yem miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Beslemede yemleme oranı 4. haftadan itibaren %7-8'e, 8 ile 12. haftalar arasında %6'ya, 12-16. haftalar arasında ise %3-4'e kadar düşürülmüştür.



Şekil 4.6. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda elde edilen yaşama oranı (%). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).

Deneme sonunda her tankta kalan karidesler tek tek sayılmış ve neticede grupların yaşama oranları 40 adet/m² grubunda %77.50, 80 adet/m² grubunda %76.50 ve en yüksek stoklama grubu olan 160 adet/m² grubunda ise %62.00 olarak belirlenmiştir ($P < 0.05$, Şekil 4.6, Çizelge 4.6). Bu gruplarda

deneme sonu ortalama karides ağırlıkları 40, 80 ve 160 adet/m² stoklama yoğunluklarında sırasıyla 22.15, 18.31 ve 19.93 olarak ölçülmüştür ($P < 0.05$, Şekil 4.7). Gruplarda SBO değerleri 40, 80 ve 160 adet/m² gruplarında sırasıyla %2.55/gün, %2.39/gün ve %2.43/gün olarak hesaplanmıştır ($P < 0.05$, Çizelge 4.6). Hasat esnasında tankların tabanında kalan karideslerin görüntüleri Şekil 4.8 ve 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda ortalama ağırlıkları (g/karides). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).

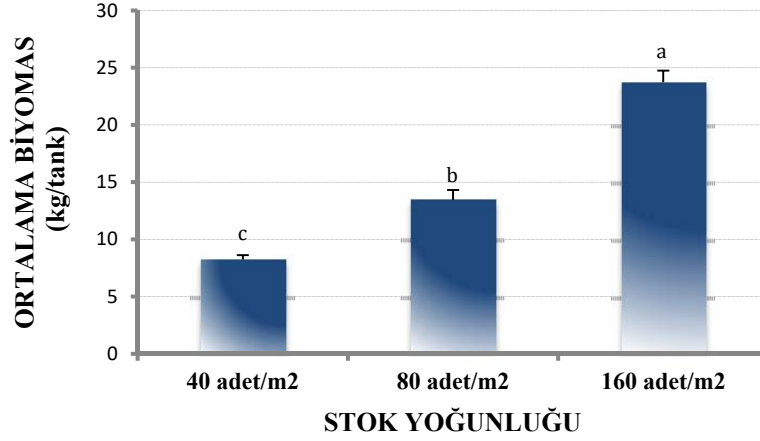
Tanklarda 4 ay süreyle yetiştirilen karideslerde elde edilen ürün miktarı gruplar bazında ortalama 40 adet/m²’de 8.24 kg/tank, 80 adet/m²’de 13.45 kg/tank ve 160 adet/m²’de 23.72 kg/tank olarak gerçekleşmiştir ($P < 0.05$, Şekil 4.10). Birim tank alanından elde edilen ürün miktarları ise 40, 80 ve 160 adet/m² stoklama yoğunlukları için 0.69, 1.12 ve 1.98 kg/m² olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



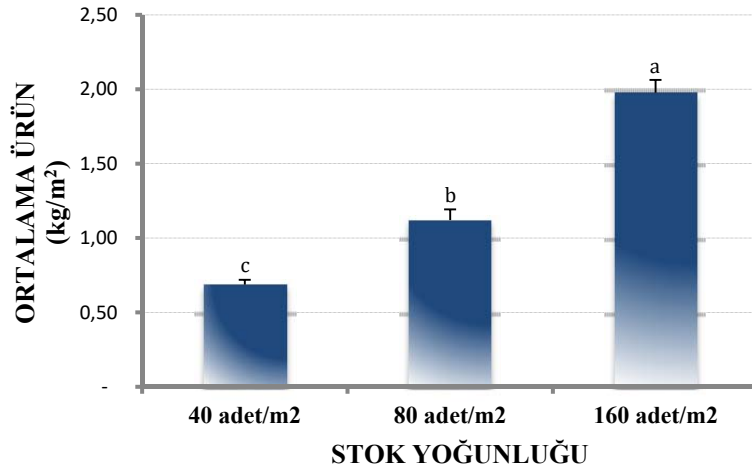
Şekil 4.8. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tank su seviyeleri düşürülürken çekilen görüntüleri.



Şekil 4.9. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda hasat edilirken çekilen görüntüleri.

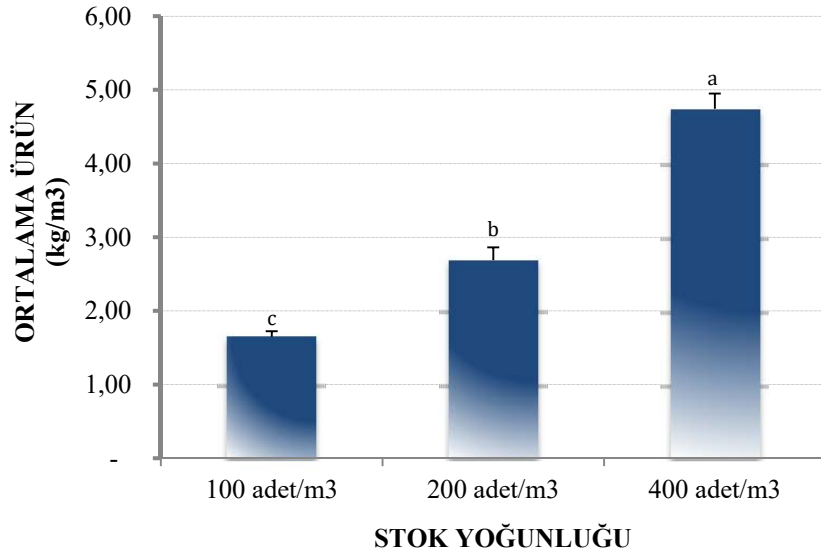


Şekil 4.10. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tanktan elde edilen ortalama ürün miktarı (kg/tank). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).



Şekil 4.11 Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda tankların her m²'sinden elde edilen ortalama ürün miktarı (kg/m²). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır ($P < 0.05$).

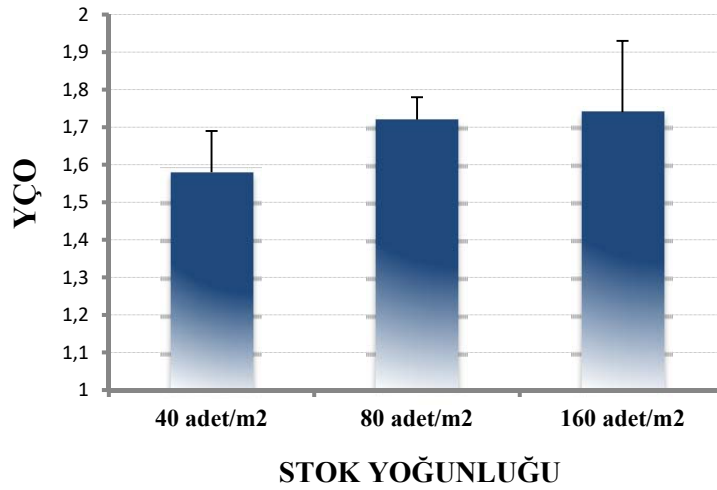
Üretim sığ sularda yapıldığından, her 1 m³ su hacmine düşen üretim miktarları hesaplandığında ise; 40, 80 ve 160 adet/m² stok yoğunluklarında elde edilen ürün miktarları 1.65, 2.69 ve 4.74 kg/m³ olarak hesaplanmıştır (P<0.05, Şekil 4.12). Üretim sonunda hasat edilen karideslerin görsel olarak boyutları Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerden (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonunda her m³ su hacminde üretilen ortalama ürün miktarı (kg/m³). Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır (P < 0.05).



Şekil 4.13. Hasat esnasında kepçede ve ele alınan karideslerin görüntüleri.



Şekil 4.14. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonu YÇO değerleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir. Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$).

Deneme süresince günlük olarak tutulan kayıtlardan hesaplanan YÇO bu değerlerin 1.58 ile 1.74 arasında değiştiğini göstermiş, ancak gruplar arasında bu parametre açısından istatistiki bir farklılık bulunmamıştır ($P > 0.05$, Şekil 4.14,

Çizelge 4.6). Deneme sonunda hasat edilen karideslerin kepçedeki görüntüsü Şekil 4.15'te görülmektedir.

Çizelge 4.6. Katlı sistemde üç farklı stoklama yoğunluğunda dört ay süreyle yetiştirilen karideslerin (*Litopenaeus vannamei*) deneme sonu performans değerleri.

DENEME GRUPLARI			
	40 adet/m ²	80 adet/m ²	160 adet/m ²
Karides Başlangıç Ağırlığı (g)	1.06±0.12	1.06±0.12	1.06±0.12
Deneme Sonu Ortalama Ağırlık (g)	22.12±1.58 ^a	18.31±1.13 ^b	19.93±1.06 ^b
Büyüme Oranı (g/hafta)	1.32	1.08	1.18
Yaşama Oranı (%)	77.50±3.54 ^a	76.50±4.95 ^a	62.00±2.83 ^b
SBO (%/gün)	2.55±0.03 ^a	2.39±0.03 ^b	2.43±0.02 ^{ab}
Biyomas (kg/tank)	8.24±0.38 ^c	13.45±0.87 ^b	23.72±1.03 ^a
Ürün (kg/m ²)	0.69±0.03 ^c	1.12±0.07 ^b	1.98±0.09 ^a
Ürün (kg/m ³)	1.65±0.08 ^c	2.69±0.17 ^b	4.74±0.21 ^a
YÇO	1.56±0.11 ^a	1.72±0.06 ^a	1.74±0.19 ^a

Her değer bir ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir. Her satırda yer alan ortalamalardan farklı harflerle işaretlenenler birbirlerinden istatistiki olarak farklıdır (P < 0.05).

4.1.2.3. Biyokimyasal Parametreler

Denemenin 2. ve 4. aylarında her gruptan alınan hemolenf örneklerinde gerçekleştirilen bazı biyokimyasal parametrelerin bulguları Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. Serum toplam protein değerlerine bakıldığında grup içerisinde en yüksek değer 40 adet/m² stok grubunda, en düşük değerin ise 160 adet/m² grubunda belirlenmiş olmakla birlikte gruplar arasında istatistiki farklılıklar tespit edilememiştir (P>0.05). Bu parametre 4. ayda yürütülen analizlerde farklılıklar göstermiş ve bu dönemde en yüksek total protein seviyesi ise en yüksek stoklama grubunda görülürken en düşük değer 80 adet/ m² grubunda belirlenmiştir (P<0.05, Şekil 4.16 ve 4.17).



Şekil 4.15. Katlı sistemde yetiştirilen karideslerin hasat edildikten hemen sonra çekilen görüntüsü.

Denemenin 2. ayında gruplar arasında serum trigliserit değerleri 40 adet/m² grubunda en yüksek, 80 adet/m² grubunda ise en düşük çıkmıştır ($P<0.05$). Diğer yandan, 4. ay analizlerinde en yüksek trigliserit değeri 160 adet/m² grubunda, en düşük değer ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir ($P<0.05$, Şekil 4.16 ve 4.17).

Laktat seviyeleri açısından gruplar kıyaslandığında; denemenin 2. ayında gruplar arasında bir farklılık belirlenmemiş, ancak 4. ayda en yüksek laktat seviyesi 80 adet/m² grubunda gözlenmiş, ($P<0.05$) diğer iki grubun laktat seviyeleri ise benzer çıkmıştır ($P>0.05$, Çizelge 4.7, Şekil 4.16 ve 4.17).

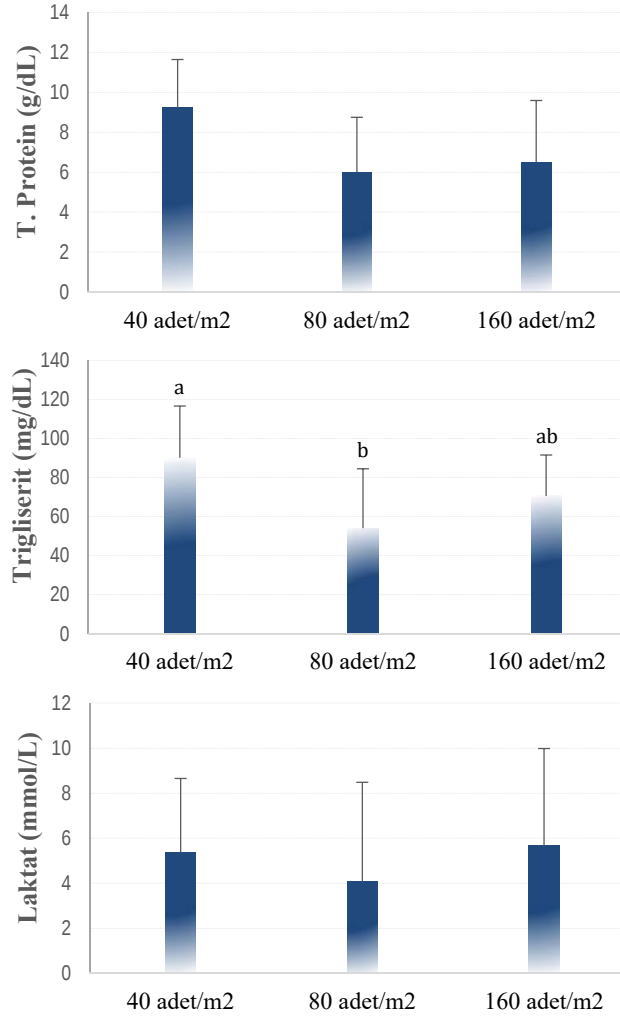
Denemenin 2. ayında alınan örneklerde yapılan analizlerde ALP değerleri açısından gruplar arasında istatistik farklılıklar bulunmuş ($P<0.05$), en yüksek ALP 40 adet/m² grubunda, en düşük değer ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir (Şekil 4.18). Denemenin 4. ayında ise, gruplar arasında bu değer açısından istatistiki bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$, Şekil 4.19).

Çizelge 4.7. Üç farklı stok yoğunluğunda katlı tank sisteminde yetiştirilen karideslerde 2. ve 4. aylarda örneklenen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) bazı biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri.

Stok Yoğunluğu (adet/m ²)	BİYOKİMYASAL PARAMETRELER					
	2. Ay Örnekleme					
	T. Protein (g/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Laktat (mmol/L)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
40 adet	9.24±2.41 ^a	90.18±26.47 ^a	5.35±3.30 ^a	495.38±153.21 ^a	156.52±61.02 ^a	122.52±25.41 ^a
80 adet	6.00±2.75 ^a	54.11±30.35 ^b	4.07±4.42 ^a	220.79±185.05 ^b	108.89±59.25 ^a	78.43±30.77 ^b
160 adet	6.50±3.09 ^a	70.56±20.98 ^{ab}	5.68±4.30 ^a	309.17±191.52 ^{ab}	109.60±60.21 ^a	93.42±45.40 ^{ab}
	4. Ay Örnekleme					
	T. Protein (g/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Laktat (mmol/L)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
	T. Protein (g/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Laktat (mmol/L)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
40 adet	9.61±1.49 ^{ab}	87.08±12.34 ^{ab}	5.79±2.74 ^b	176.48±58.67 ^a	91.43±10.78 ^a	81.01±11.67 ^a
80 adet	8.34±1.53 ^b	69.89±19.64 ^b	10.68±4.53 ^a	177.53±62.18 ^a	149.00±58.68 ^a	102.58±24.78 ^a
160 adet	10.70±1.00 ^a	93.19±13.47 ^a	4.89±1.44 ^b	202.84±85.54 ^a	136.38±64.18 ^a	96.53±22.64 ^a

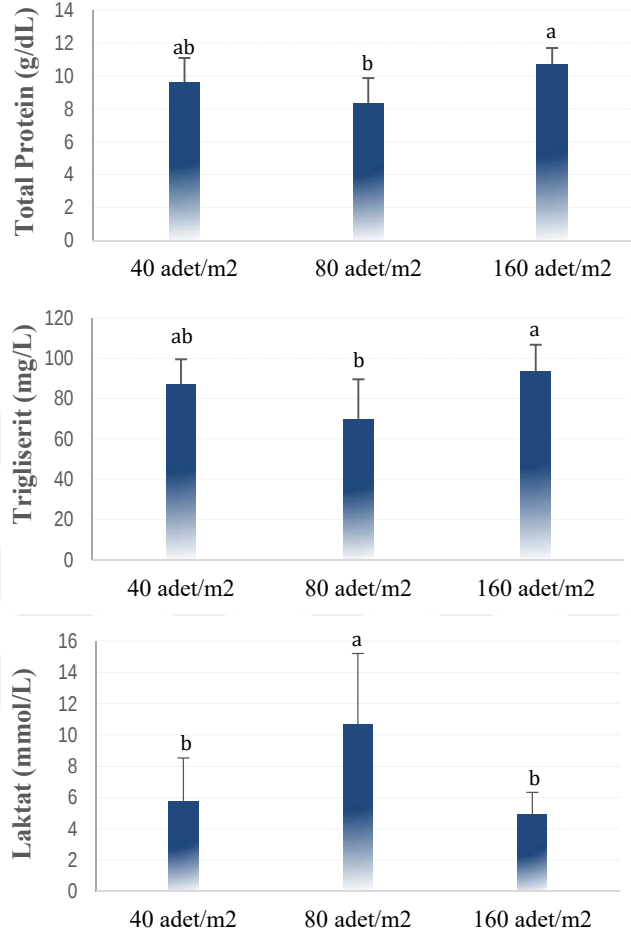
Her değer bir ortalama (n = 6) ± standart sapmayı ifade etmektedir. Her örnekleme periyodunda, sütunlarda farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasında istatistiki farklılık vardır (P<0.05).

Gruplar arasında ALT değerleri gerek 2. ay örneklerinde gerekse 4. ay örneklerinde benzer bulunmuştur (P>0.05, Şekil 4.18 ve 4.19). Denemenin 2. ay örneklemeinde gruplar arasında en yüksek ALT değeri 40 adet/m² grubunda, en düşük ALT değeri ise 80 adet/m² grubunda ölçülmüştür (P<0.05, Şekil 4.18 ve 4.19). Buna karşın 4. ay örneklemeinde, gruplar arasında ALT açısından herhangi bir istatistiksel fark çıkmamıştır (P>0.05, Çizelge 4.7).



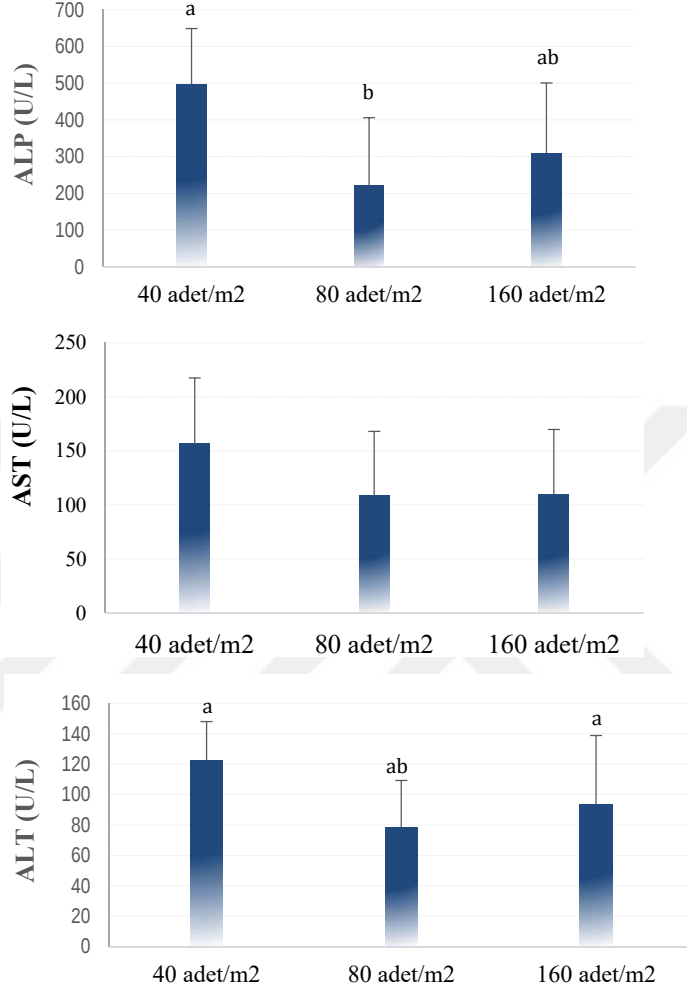
STOK YOĞUNLUĞU

Şekil 4.16. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 2. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen protein (g/dL), trigliserit (mg/dL) ve laktat (mmol/L) seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 6 karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır (P < 0.05).



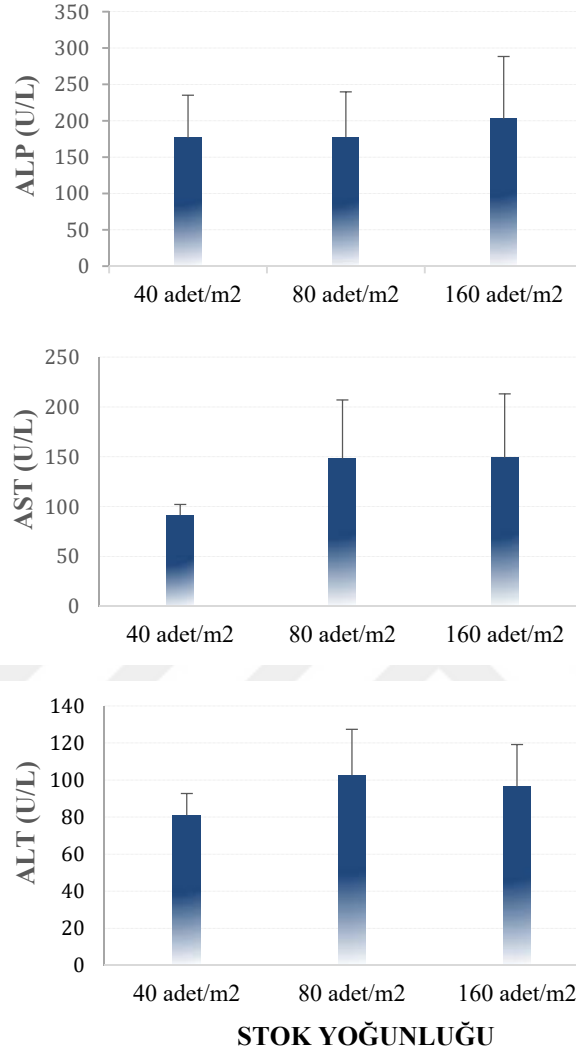
STOK YOĞUNLUĞU

Şekil 4.17. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 4. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen protein (g/dL), trigliserit (mg/dL) ve laktat (mmol/L) seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 6 karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır (P < 0.05).



STOK YOĞUNLUĞU

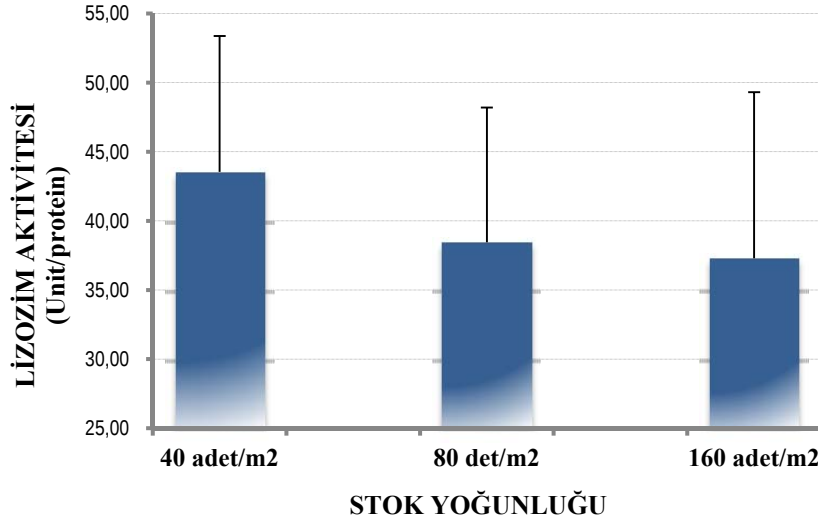
Şekil 4.18. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 2. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen ALP, AST ve ALT seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 6 karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır (P < 0.05).



Şekil 4.19. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 4. ayda alınan hemolenf örneklerinde belirlenen ALP, AST ve ALT seviyeleri. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 6$ karides/grup). Farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$).

4.1.2.4. Bazı İmmünolojik Parametreler

Büyütme denemesinin 2. ayında üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerden tesadüfen alınan örneklerde çekilen hemolenfte yapılan bazı immünolojik analizlerin sonuçları Çizelge 4.8’de özetlenmiştir. Lizozim aktivitesi açısından gruplarda düşük stoklama yoğunluğundan yüksek stoklama yoğunluğuna doğru azalan bir gidişat belirlenmiş olmasına rağmen, istatistik analizler herhangi bir farklılık göstermemiştir ($P>0.05$, Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Üç farklı stok yoğunluğunda katlı RAS sisteminde büyütülen karideslerde 2. ayda alınan örneklerde belirlenen plazma lizozim aktivitesi. Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır ($n = 8$ karides). Tekyönlü ANOVA sonuçları gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir ($P > 0.05$).

Hemosit sayımında en düşük stok yoğunluğundaki karidesler (40 adet/m²) en yüksek toplam hemosit sayısı göstermiş ancak yine de gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Üç farklı stok yoğunluğunda büyütülen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) 2. ayda örneklenen karideslerin hemolenflerinde belirlenen lizozim aktivitesi (Unit/Protein), toplam hemosit sayısı ($\times 10^6$ hücre/mL), fagositik aktivite (%) ve fagositik indeks verileri.

BAZI İMMÜNOLOJİK PARAMETRELER					
Stoklama Yoğunluğu (adet/m ²)	Karides Ağırlık (g)	Lizozim Aktivitesi (Unit/Protein)	Hemosit Sayısı ($\times 10^6$ hücre/mL)	Fagositik Aktivite (%)	Fagositik İndeks
40 adet	7.97 $\pm$ 1.23	43.55 $\pm$ 9.83	4.40 $\pm$ 3.11	25.20 $\pm$ 1.64	0.14 $\pm$ 0.01 ^a
80 adet	7.03 $\pm$ 0.55	38.45 $\pm$ 9.75	1.85 $\pm$ 1.25	25.00 $\pm$ 1.67	0.14 $\pm$ 0.01 ^a
160 adet	8.22 $\pm$ 1.34	37.29 $\pm$ 10.48	2.96 $\pm$ 1.96	24.40 $\pm$ 1.34	0.09 $\pm$ 0.00 ^b

Her değer bir ortalama $\pm$ standart sapmadır (n = 6 karides/grup). Her sütunda farklı harflerle işaretlenen gruplar arasında istatistik farklılık bulunmuştur (P < 0.05).

Fagositik aktivite gruplar arasında farklılık göstermemiş (P>0.05), ancak fagositik indeks açısından 40 ve 80 adet/m² grupları 160 adet/m² grubuna kıyasla istatistik olarak daha yüksek fagositik indeks göstermiştir (P<0.05, Çizelge 4.8). Bu da düşük stoklama koşullarında fagositik aktivite gösteren hücrelerin daha fazla sayıda lateks boncuk tükettiğini göstermiştir.

4.1.2.5. Isı Şok Proteinlerinin Gen Ekspresyon Analizleri

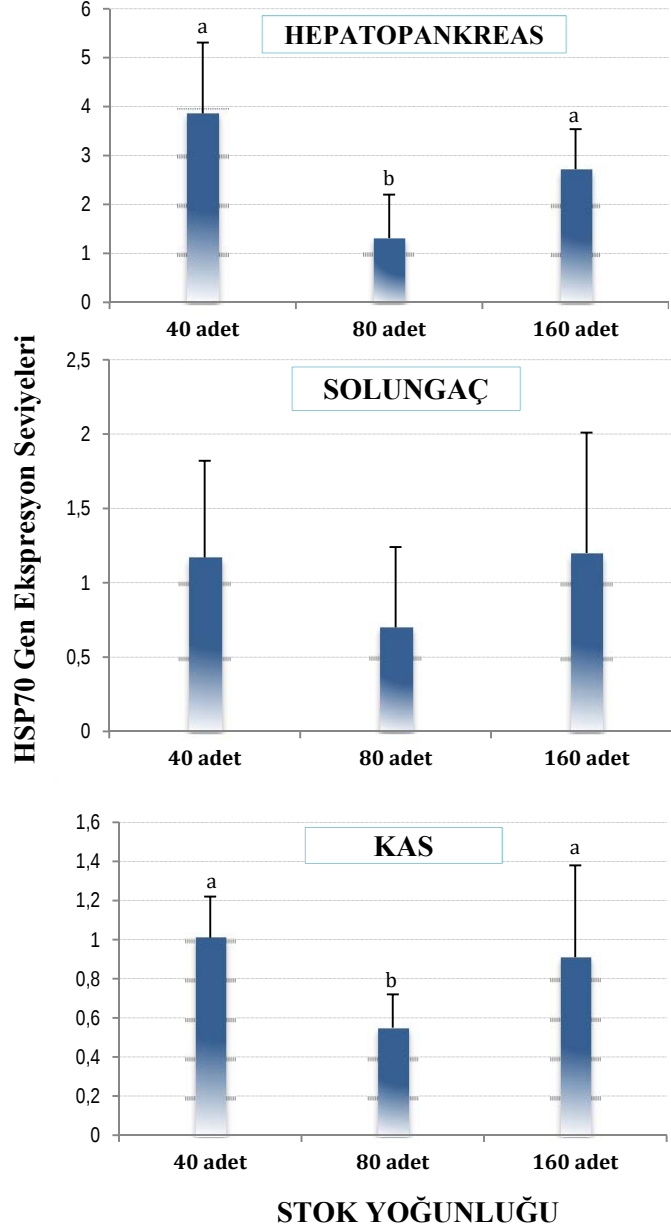
Denemenin 2. ve 4. aylarında örneklenen karideslerde gerçekleştirilen HSP70 ve HSP90 gen ekspresyon analiz sonuçları Çizelge 4.9'da özetlenmiştir. Bu dönemlerde karidesler irileştikleri için rahat hemolenf alınabilmiş ancak HSP analizleri toplam vücut yerine üç farklı dokuda gerçekleştirilmiştir. Denemenin 2. ayında dokularda yürütülen analizlerde hepatopankreasta en yüksek HSP70 seviyesi 40 ve 80 adet/m² stok gruplarında, en düşük seviye ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir (Şekil 4.21). Denemenin sonunda (4. ay örneklemeğinde) ise HSP70 seviyeleri en düşük stoklama yoğunluğundan en yüksek stoklama yoğunluğuna doğru azalma göstermesine rağmen herhangi bir istatistiksel fark

bulunamamıştır ($P>0.05$, Çizelge 4.9, Şekil 4.22). Solungaç dokuda yapılan analizlerde; gerek 2. ay gerekse 4. ay sonuçlarda HSP70 gen ekspresyon analiz sonuçlarında herhangi bir istatistiksel fark bulunamamıştır ($P>0.05$). Kas dokuda ise 2. ayda belirlenen HSP70 seviyesi 80 adet/m² grubunda en düşük, 40 ve 160 adet/m² gruplarında ise benzer bulunmuştur ($P<0.05$, Çizelge 4.9). Kas dokuda 4. ayda yürütülen analizlerde ise en yüksek HSP70 ekspresyon seviyesi 160 adet/m² grubunda görülmüşken ($P<0.05$), 40 ve 80 adet/m² stok gruplarında seviye benzer bulunmuştur (Şekil 4.22).

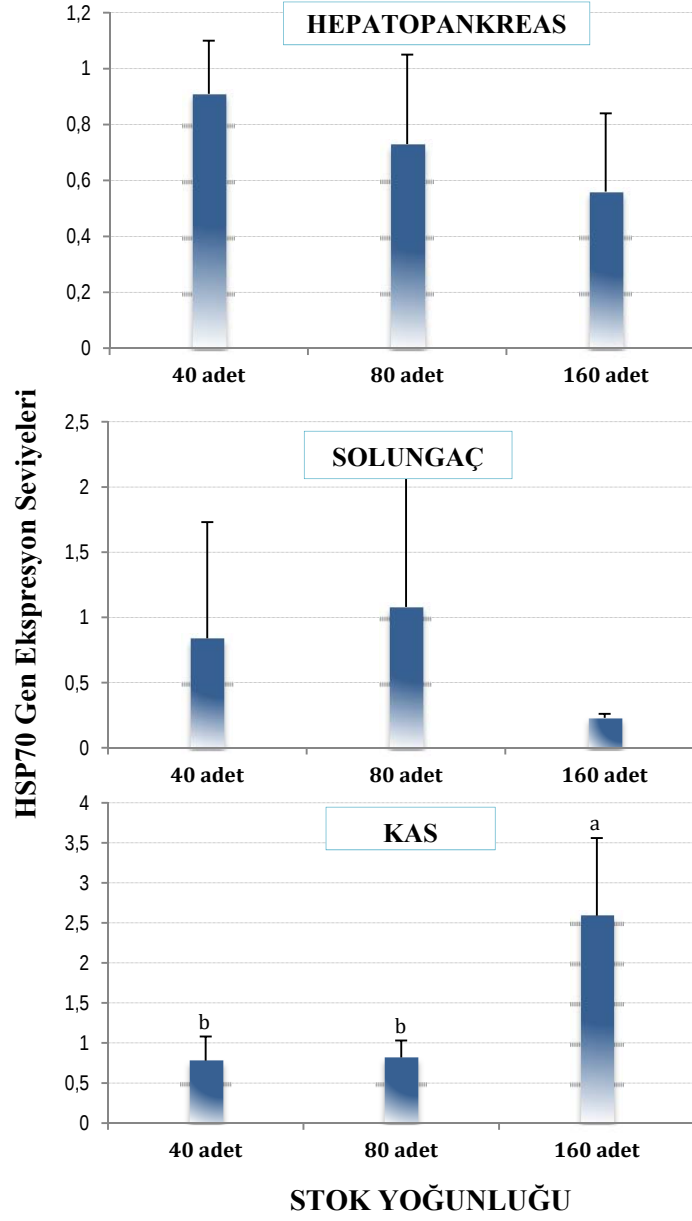
Çizelge 4.9. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 2. ve 4. aylarında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri.

Karides Organları	Stoklama Yoğunluğu (adet/m ²)	HSP70 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ	
		2. AY	4. AY
Hepatopankreasta	40 adet	3.86±1.45 ^a	0.91±0.19 ^a
	80 adet	1.31±0.89 ^b	0.73±0.32 ^a
	160 adet	2.72±0.82 ^a	0.56±0.28 ^a
Solungaçta	40 adet	1.17±0.65 ^a	0.84±0.89 ^a
	80 adet	0.70±0.54 ^a	1.08±0.99 ^a
	160 adet	1.20±0.81 ^a	0.23±0.03 ^a
Kasta	40 adet	1.01±0.21 ^a	0.78±0.30 ^b
	80 adet	0.55±0.17 ^b	0.82±0.21 ^b
	160 adet	0.91±0.47 ^a	2.59±0.97 ^a

Her değer bir ortalama ($n = 6$) standart sapmayı ifade etmektedir. Her organ için 2. veya 4. aylar için ayrı ayrı olmak üzere, farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).



Şekil 4.21. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 2. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır.



Şekil 4.22. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 4. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP70 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama $\pm$ standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır.

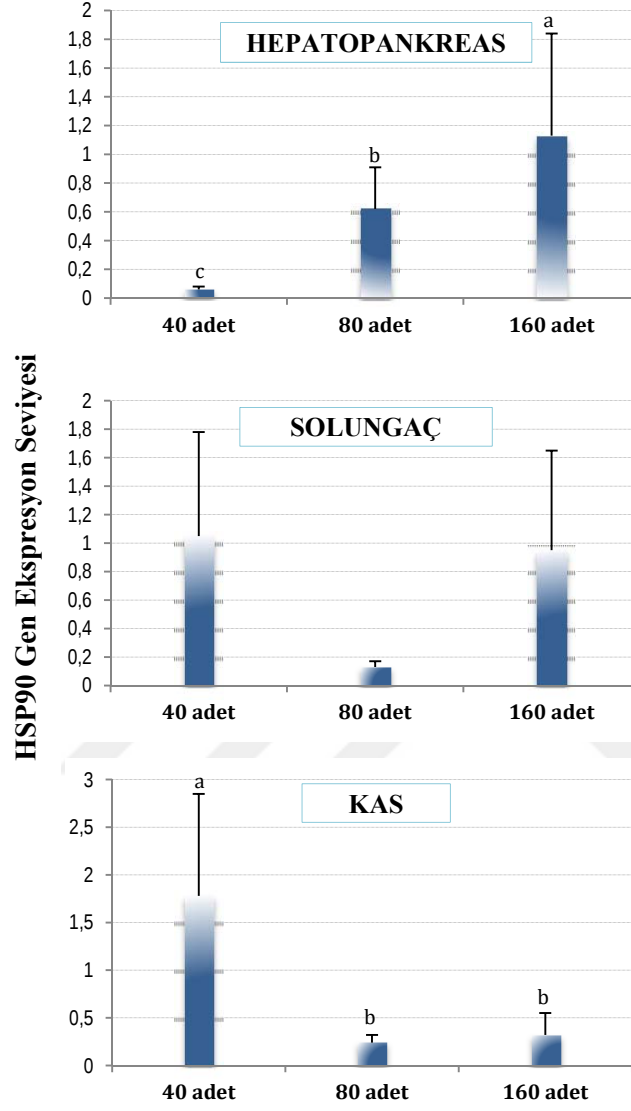
Denemenin 2. ve 4. aylarında üç farklı dokuda olmak üzere alınan örneklerde yürütülen HSP90 gen ekspresyon analizlerinde elde edilen bulgular Çizelge 4.10'da özetlenmiştir. Hepatopankreas dokusunda yapılan analizlerde; 2. ayda en yüksek HSP90 ekspresyon seviyesi 160 adet/m² stoklama grubunda görülmüşken ($P<0.05$), 40 ve 80 adet/m² gruplarında HSP90 seviyesi çok daha düşük oranlarda kalmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.23). Denemenin sonunda alınan (4. ay) alınan örneklerde ise herhangi bir farklılık belirlenememiştir ($P>0.05$). Solungaç dokuda yapılan analizlerde; 40 ve 160 adet/m² stok grupları benzer ($P>0.05$) ve fakat 80 adet/m² grubuna göre daha yüksek HSP90 seviyeleri göstermiştir ($P<0.05$, Şekil 4.24). Deneme sonunda alınan örneklerde ise HSP90 seviyesi 40 ve 80 adet/m² gruplarında benzer ve fakat 160 adet/m² grubundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.24, $P<0.05$).

Kas dokuda 2. ayda yapılan analizlerde en yüksek HSP90 seviyesi 40 adet/m² grubunda bulunmuşken, bu seviye 80 ve 160 adet/m² gruplarında çok daha düşük seviyelerde kalmıştır ($P<0.05$). Denemenin 4. ayında ise tam tersine en düşük HSP90 ekspresyon seviyesi 40 adet/m² grubunda, en yüksek ise 160 adet/m² grubunda görülmüştür ($P<0.05$). Bu noktada 80 ve 160 adet/m² stok gruplarında HSP90 gen ekspresyonu benzer bulunmuştur ($P>0.05$).

Çizelge 4.10. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 2. ve 4. aylarında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri.

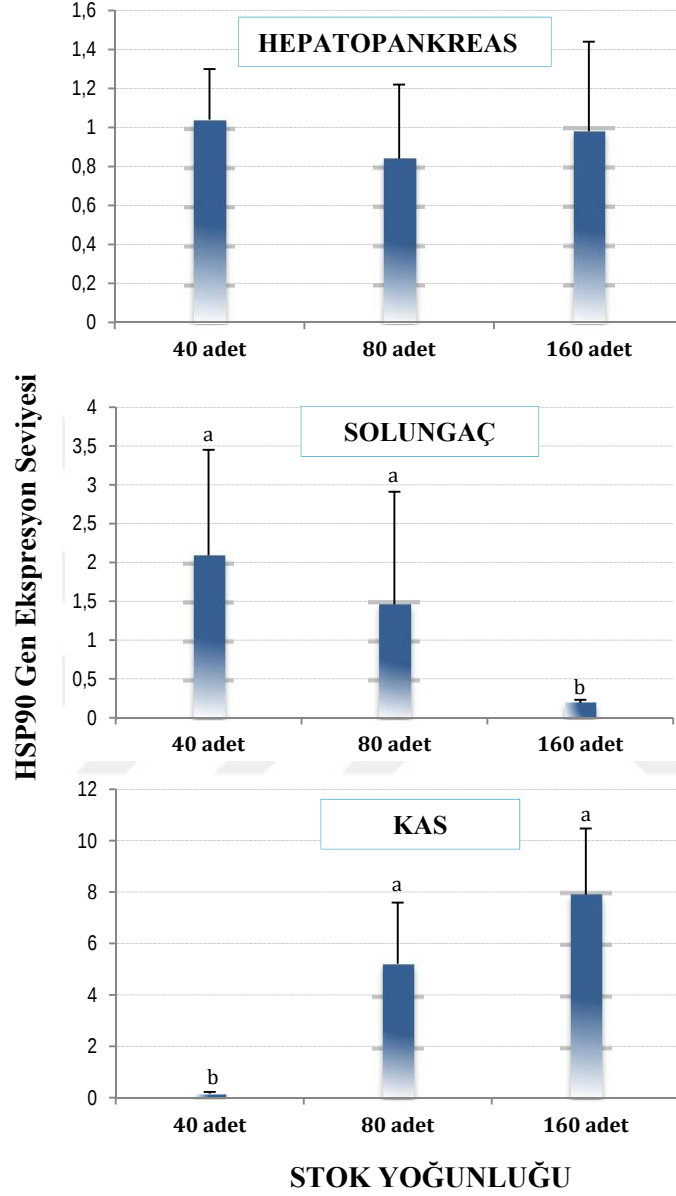
Karides Organları	Stoklama Yoğunluğu (adet/m ²)	HSP90 GEN EKSPRESYON SEVİYELERİ	
		2. AY	4. AY
Hepatopankreasta	40 adet	0.06±0.02 ^b	1.04±0.26 ^a
	80 adet	0.62±0.29 ^b	0.84±0.38 ^a
	160 adet	1.13±0.71 ^a	0.98±0.46 ^a
Solungaçta	40 adet	1.05±0.73 ^a	2.09±1.36 ^a
	80 adet	0.13±0.04 ^b	1.46±1.45 ^a
	160 adet	0.95±0.70 ^a	0.19±0.04 ^b
Kasta	40 adet	1.78±1.07 ^a	0.16±0.07 ^b
	80 adet	0.24±0.08 ^b	5.21±2.38 ^a
	160 adet	0.32±0.13 ^b	7.90±2.57 ^a

Her değer bir ortalama (n = 6) standart sapmayı ifade etmektedir. Her organ için 2. veya 4. aylar için ayrı ayrı olmak üzere, farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistiki olarak birbirlerinden farklıdır (P<0.05).



STOK YOĞUNLUĞU

Şekil 4.23. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 2. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır.



Şekil 4.24. Katlı sistemde üç farklı stok yoğunluğunda (40, 80 ve 160 adet/m²) yetiştirilen karideslerde (*Litopenaeus vannamei*) denemenin 4. ayında örneklenen bireylerin farklı dokularında belirlenen HSP90 gen ekspresyon seviyeleri. Her sütun bir ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir (n = 3). Farklı harflerle işaretlenen ortalamalar istatistik olarak birbirlerinden farklıdır.

4.2. Tartışma

4.2.1. I. Deneme: Farklı Stoklama Yoğunluklarının *Litopenaeus vannamei*'de Büyüme Performansı ve Stres Parametreleri Üzerine Etkileri

4.2.1.1. Büyüme Performansı ve Yem Tüketimi

İdeal stok yoğunluğu sucul canlılarda büyümenin sürdürülebildiği ve aynı zamanda su kalite kriterlerini olumsuz etkilemeyen yoğunluk olarak bilinir. Aşırı stoklamada büyüme çoğu zaman düşer ve ayrıca su canlılarının davranışları ve bağışıklık sistemleri de bundan olumsuz etkilenebilir. 2013-2016 yılları arasında yürütülen bir TAGEM projesinde *P. semisulcatus* 30 m² beton tanklarda 40, 80 ve 120 adet/m² stok yoğunluklarında 6 ay boyunca büyütülmüş ve deneme sonunda gruplar, sırasıyla ancak %28, %25 ve %22.30 yaşama oranlarıyla ve ortalama 18.50, 12.80 ve 11.47 g ağırlıklara ulaştırılabilmişlerdir. Bu deneme süresince hesaplanan YÇO ise 2.97 ile 3.58 arasında değişmiştir (Kumlu ve ark, 2016). Bu araştırmacılar aynı yetiştiricilik ünitesinde daha yüksek stoklama koşullarında (100, 150 ve 200 adet/m²) ve üstelik de ıslah edilmemiş bir *P. vannamei* varyetesinden elde ettikleri yavrularla yaptıkları bir çalışmada ise aynı sürede (6 ay) 100 adet/m² stokladıkları karideslerde ortalama 19 gram ağırlığa %70.40 yaşama oranına ve 1.94 YÇO ile ulaşmışlardır (Kumlu ve ark, basılmamış veri). Gao ve ark (2017), 60 gün boyunca kafeslerde juvenil karidesleri (*L. vannamei*) üç farklı stok yoğunluğunda (188, 250 ve 313 adet/m²) büyütmüşler ve karideslerin hayatta kalma oranının stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte azaldığını (sırasıyla %83.3, %79.2 ve %78.7) kaydetmişlerdir. Deneme sonunda spesifik büyüme oranının ve ağırlık kazancının düşük stoklama grubunda, orta ve yüksek stoklama grubuna göre; yem çevrim oranının yüksek stoklama grubunda, orta ve düşük stoklama grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Karideslerin filan ağırlığının stoklama yoğunluğunun artışı ile azaldığını ve yüksek stoklama grubunda düşük stoklama grubundan önemli ölçüde düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Esparza-Leal ve ark (2015) de bina içi tanklarda temiz suda ve biyofloc sisteminde dört farklı stok yoğunluğunda (1500, 3000, 6000 ve 9000 karides/m³)

Pasifik beyaz karideslerini kıyaslamış ve 42 günlük deneme sonunda temiz suda ortalama ağırlıklarının 0.64, 0.41, 0.31 ve 0.17 olarak azaldığını, yaşama oranlarının ise (%85.0 ile %98.4 arasında) istatistiki farklılık göstermediğini belirlemişlerdir. Denememizde ön-büyütme aşamasında üç farklı stoklama yoğunluğunda (200, 400 ve 800 adet/m²) yetiştirilen *L. vannamei* yavrularında deneme sonu yaşama oranları, sırasıyla, %77, %78 ve %82 olarak ve ortalama ağırlıklar ise 1.35, 1.09 ve 1.12 g olarak elde edilmiş ($P>0.05$), günlük ortalama yem tüketim değerleri (grup başına) stok yoğunluğunun artışı ile birlikte yükselme göstermiştir ($P<0.05$). Deneme kapsamında yaptığımız çalışma ve Esparza-Leal ve ark (2015)'nin bulguları, Pasifik beyaz karideslerinin ön-büyütme aşamasında 1 m³ suda yüksek stoklama koşullarında bile yüksek yaşama oranlarıyla yetiştirilebileceklerini göstermiştir.

4.2.1.2. Stres Testleri

Stres testleri bir organizmayı kısa süreli aşırı bir stresöre maruz bırakma prensibine dayanır; bu testler canlının fizyolojik durumu ve hayatta kalma oranını belirleyen testler olarak ifade edilmiştir (Dhert ve ark. 1992; Fegan, 1992). Moe ve ark (2004), C vitamini eklenmiş yemle besledikleri kuruma karidesi (*Marsupenaeus japonicus*) larvalarını formalin stresine maruz bırakmışlar ve kontrol grubuna göre daha uzun süre hayatta kaldığını tespit etmişlerdir. Samocha ve ark (1998), farklı yaştaki Pasifik beyaz karidesinin postlarvalarında formalin testi uygulamışlar ve 0.5, 1 ve 2. saatlerde hayatta kalma süresi bakımından önemli bir fark olduğunu, 2. ve 3. saatlerde fark olmadığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise deneme sonunda uygulanan formalin stres testi stoklama yoğunluğunun artışı ile 6 saat süren stres testlerindeki yaşama oranlarının düştüğünü, diğer bir ifadeyle, yüksek stoklama koşullarında yetiştirilen karideslerde çevresel koşullara hassasiyetin arttığını ortaya koymuştur ($P<0.05$).

Alvarez ve ark (2004), 15 günlük karides (*L. vannamei*) postlarvalarını %3 tuzluluk stresine 30 dakika süreyle ve ardından yine 30 dakika süreyle yetiştirme

suyuna (%36) maruz bırakmışlar ve muamele grupları arasında önemli ölçüde bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Samocha ve ark (1998), farklı yaştaki karides postlarvalarını (*L. vannamei*) tuzluluk stres testine maruz bırakmışlar ve 0.5. saatte hayatta kalma süresi bakımından önemli bir fark olduğunu, 2. ve 3. saatlerde fark olmadığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda deneme sonunda uygulanan tuzluluk stres testi stoklama yoğunluğunun artışı ile 6 saat süren stres testlerindeki yaşama oranlarının düştüğünü, diğer bir ifadeyle, yüksek stoklama koşullarında yetiştirilen karideslerde çevresel koşullara hassasiyetin arttığını ortaya koymuştur ($P<0.05$).

4.2.1.3. Isı Şok Proteinleri (HSP70 - HSP90)

Son zamanlarda Pasifik beyaz karidesinde termal stres, pH dayanıklılık testi, ağır metal testi (Qian ve ark, 2012), stoklama yoğunluğu (Gao ve ark, 2017) ve bakteri dayanıklılık testi (Zhou ve ark, 2010) neticesinde, bu çevresel stres faktörlerinin akut etkilerinin veya uzun açlık periyodu ve ardından yeniden beslemenin (Lin ve ark, 2012) farklı HSP gen ekspresyonlarına (LVHSP60, LVHSP70, LVHSC70, ve LVHSP90 veya HSP60 ve HSP70) etkileri çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar, balıklarda artan stok yoğunluğunun metabolik ve antioksidan enzimlerin miktarını azalttığını ve aksine stres ile ilintili proteinlerden HSP70'i yükselttiğini göstermiştir (Aksakal ve ark, 2011). Bu araştırmacılar gökkuşağı balığı ile yaptıkları bir çalışmada, 15, 20, 25 ve 30 kg/m³ stok yoğunluklarını test etmiş ve en yüksek stok yoğunluklarında HSP70'in ekspresyon seviyesinin yükseldiğini ve dolayısıyla kas dokuda ölçülen bu değerlerin balıkta ciddi bir stres yaşandığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

HSP70 ekspresyon analizleri için, deneme başlatılmadan önce stok tanktan alınan 0. gün örneklemeğinde HSP70 değeri 1.13 olarak belirlenmiş, 1 gün sonra tüm stoklama gruplarında (200, 400 ve 800 adet/m²) bu değer, sırasıyla, 1.44, 1.96 ve 1.88 seviyelerine yükselmiştir. Ancak, %30.56 ile %36.11 seviyesinde artışlara rağmen yinede ilk gün HSP70 verileri üzerinde yapılan istatistik hesaplamalar gruplar arasında bir fark olmadığını göstermiştir ($P>0.05$). Denemenin 3, 7 ve en

son 30. günlerinde alınan örneklerde ise stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte HSP70 verilerinde anlamlı bir eğilim belirlenememiştir. Gao ve ark (2017), juvenil karideslerde (*L. vannamei*) (ortalama 2 g) stoklama yoğunluğunun (188, 250 ve 313 adet/m²) büyüme, oksidatif stres ve HSP70 üzerine etkisini araştırmışlar ve HSP70'in hepatopankreasta artan stoklama yoğunluğu ile önemli ölçüde arttığını, kasta 250 adet/m² grubunda 188 adet/m² grubundan önemli ölçüde yüksek olduğunu, hemolenfte ise gruplar arasında bir fark olmadığını belirlemişlerdir.

HSP90 gen ekspresyon analizlerinde 0. gün örneklemeğinde belirlenen 1.51'lik gen ekspresyon seviyesi, 1. günde stoklama yoğunluğundaki artışa paralel olarak artış göstermiş ve bu artış özellikle 800 adet/m² stok yoğunluğunda, düşük stok yoğunluğuna (200 adet/m²) kıyasla, 9-10 kat olarak gerçekleşmiştir ($P<0.05$). İlk günde, orta stoklama yoğunluğu olan 400 adet/m² grubunda da, 200 adet/m² grubuna kıyasla, HSP90 seviyesi yaklaşık 2.5 kat yükselmiş, ancak istatistik bir farklılık belirlenememiştir ($P>0.05$). Gruplar arasındaki bu anlamlı farklılık 3. günde daha az belirgin hale gelmiş ve 7. günde artan stoklama yoğunluğuna paralel bir artış görülmüş olsa da, gruplar arasında istatistiki bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). 30. günde alınan 3 farklı doku örneklerinin hiçbirinde de stoklama yoğunluğuyla ilintili bir eğilim belirlenememiştir. Bu veriler hem HSP70 hem de HSP90 gen ekspresyon analiz sonuçlarının stoklama yoğunluklarıyla ilintili olarak artış gösterdiklerini, ancak özellikle HSP90'nın daha da fazla etkilendiğini ortaya koymuştur. Stoklamanın HSP gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri kısa süreli olmuş ve genellikle 1-2 günden sonra seviyeler normal düzeye iniş göstermiştir. Guo ve ark (2010), günlük sıcaklık dalgalanmasının (25°C sabit sıcaklık, 25±1°C, 25±2°C, 25±3°C ve 25±4°C) Pasifik beyaz karidesinin büyüme ve fizyolojik durumu ile ilgili etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, 25±4°C rejiminde büyümenin, 25°C'lik sabit sıcaklıktaki karideslere göre, önemli ölçüde daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmada, günlük sıcaklık dalgalanmasının HSP70 üzerinde önemli bir artış yaratmadığını, bunun nedeninin ±4°C'lik dalgalanma baskısının HSP70 gen ekspresyonlarında önemli bir değişiklik için yeterli seviyede

stres yaratmamış olabilmesine bağlamışlardır. Zhenyu ve ark (2004), farklı stres kaynaklarının (sıcak veya soğuk şoku ile *Vibrio anguillarum* ile WSSV uygulaması) Çin karidesinde (*F. chinensis*) ilk kez farklı dokularda HSP70 ekspresyonunu etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, sıcaklık şoku ve WSSV stres uygulamaları ile HSP70'in hepatopankreas ve solungaçlarda belirgin olarak indüklendiğini, ancak kas, gözsapı ve hemolenfte ise gözlemlenmediğini kaydetmişlerdir. Soğuk şok ve WSSV muamelesinin, inceledikleri tüm dokularda HSP70 seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varmışlardır. HSP70 indüksiyonunun karideslerde, ortam sıcaklığının akut olarak 10°C artırıldığı durumlarda ve sadece uygulamadan 2 saat sonra en yüksek değere çıktığını belirtmişlerdir.

Zhou ve ark (2010), çalışmalarında Pasifik beyaz karidesinde bakteri yüklenmesine tepki olarak HSP60 ve HSP70'in gen ekspresyonlarını incelemişler ve bu çalışmada LvHSP60 mRNA'nın hem yapısal hem de indüklenebilir olduğunu, hemositlerde, kas, mide, kalp, hepatopankreas ve solungaç dokusu dahil olmak üzere, incelenen hemen hemen tüm dokularda (bağırsak hariç) yüksek oranda belirlenebildiğini ifade etmişlerdir. Solungaçta, hepatopankreasta ve hemositlerde bakteri yüklemesinden sonra LvHSP60'ın belirgin olarak yukarıya doğru yükseldiğini, hemosit ve hepatopankreasta LvHSP70'in transkripsiyonunun da indüklendiğini kaydetmişlerdir. Ang-lu ve ark (2015), *Exopalaemon carinicauda*'daki ısı şok proteini familyalarının (HSP70 ve HSP90) mRNA ekspresyonunu, akut sıcaklık stresini takiben araştırmışlar ve karideslerin 19, 23 ve 27°C sıcaklık stresine maruz bırakıldıklarında HSP70 mRNA ekspresyon seviyelerini 2 saat içinde arttırdıklarını, ancak daha sonra denemenin sonuna (48 saat) kadar azalttıklarını, HSP90 mRNA ekspresyon seviyelerinin ise 2 saatte azaldığını ve denemenin sonuna doğru ise yükseldiğini belirlemişlerdir. Karidesin HSP70 ve HSP90 mRNA ekspresyonu arasındaki bu farklılığın ısı stresine gösterilen farklı rollerle ilişkili olabileceğini ve sonuçta bu her iki HSP genlerinin de karideslerin sıcaklığa dayanıklılıklarında çok önemli roller oynayabileceklerini

ifade etmişlerdir. Bir çalışmada, Loc ve ark (2013), karidesleri (*L. vannamei*) enfeksiyona karşı koruyan mekanizmaları daha iyi anlamak için postlarvalarda ölümcül olmayan bir ısı şokunun ardından 30 dakika süreli ani ısı şokunun kontrol grubuna kıyasla HSP70 mRNA'sını arttırdığını belirlemişlerdir. Chen ve ark (2015a), *Gracilaria tenuistipitata* ekstraktı (GTE) içeren deniz suyunda (%35) amonyak stresine maruz bıraktıkları Pasifik beyaz karideslerde HSP70'in transkript seviyesinin stres sonrası 24 saat içinde regüle edilebildiğini kaydetmişlerdir. Üstte belirtilen literatür bildirişlerinden ve denememiz bulgularımızdan yola çıkarak, özellikle ön-büyütme döneminde 800 adet/m² (1-1.5 g boyutlarında) gibi test ettiğimiz en yüksek stoklama yoğunluğunun karideslerde HSP70 ve özellikle de HSP90 gen ekspresyon seviyelerini uyararak yükselttiği, ancak bu uyarımın 1-2 gün içerisinde azalarak seviyelerin tekrar normale dönerek regüle edilebildiği belirlenmiştir. Kronik yüksek stoklamanın da hiçbir organda (hepatopankreas, solungaç ve kas) HSP70 veya HSP90 genlerinin ekspresyon seviyelerinde belirgin bir fark yaratmadığı ve karideslerin maruz kaldıkları stresöre zamanla adapte olabildikleri anlaşılmıştır.

4.2.2. II. Deneme: Katlı Tank Sisteminde Farklı Stok Yoğunluklarında Yetiştirilen Karideslerde Büyüme, Yem Tüketimi ve Stres Parametrelerinin Belirlenmesi

4.2.2.1. Büyüme Performansı ve Yem Tüketimi

Entansif stok koşulları gibi uzun süreli stres (kronik) durumlarında fizyolojik denge kurulamaz (en azından uzunca bir süre için) ve hastalık etmenlerine olan direnç azalır; üreme ve büyüme de bundan olumsuz etkilenir (Van Weerd ve Komen, 1998). Yüksek stoklama koşullarında su kalitesinde gerçekleşen düşüşlerin de su canlılarında büyümeyi olumsuz etkilediği, yem alımını ve yemden yararlanmayı düşürdüğü bilinmektedir. Kronik stresin giderilmesi karideslerin sağlık durumu ve büyüme performansı açısından akvakültürde büyük önem taşımaktadır. Karidesler büyütme esnasında kısa (saat veya gün) veya uzun süreli (bir

veya birkaç hafta) çevresel, biyolojik veya elle muameleden kaynaklı olarak strese maruz kalabilirler. Stres karideslerin hastalıklara karşı hassasiyetlerini arttırır ve bağışıklık savunma kapasitelerini düşürür (Le Moullac ve Haffner, 2000). Uzun süreli stres koşullarında deneme sonu yaşama oranı, ağırlık kazancı, yem tüketimi ve kabuk değişimi gibi bazı biyolojik performans verileri takip edilir. Pickering (1993) düşük ortalama canlı ağırlık verileri veya büyüme oranında görülen azalmanın uzun süreli stresin belirlenmesinde iyi bir indikatör olduğunu bildirmiştir.

Pasifik beyaz karidesinde farklı yetiştiricilik sistemlerinde farklı stoklama yoğunluklarının büyüme ve yem tüketim performansları araştırılmış ve değişik sonuçlar alınmıştır. Herrera ve ark (2006), çalışmalarında Pasifik beyaz karidesini üç farklı stok yoğunluklarında (50, 60 ve 70 karides/m²), toprak havuzlarda, ortalama 18.63 g, 13.46 g ve 11.86 g ulaştırabildiklerini ve verimin sırasıyla 7.243 kg, 7.307 kg ve 8.011 kg/ha olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Sookying ve ark (2011), açık havuz ve tank koşullarında *L. vannamei*'de stok yoğunluğunun büyüme performansı ve ekonomik fizibilite üzerine etkisini değerlendirmiş; 0.1 hektarlık havuzlara 0.015 g ağırlıkta stokladıkları karidesleri 17, 26, 35 ve 45 adet/m² yoğunluklarda, 10 hafta süreyle ve ayrıca 24.8 ton kapasiteli tanklara stokladıkları daha iri (2.8 g) yavruları 15, 25, 35, 45, 55 ve 65 adet/m² stok koşullarında 10 hafta süreyle büyütmüşlerdir. Havuz çalışmasının sonunda (14 hafta) stok yoğunluğu ile büyüme arasında negatif bir korelasyon görmüşler ve karideslerin 20.70-25.25 grama %58.0 ile %65.1 arasında hayatta kalma oranı ve 1.17 ile 1.54 arasında YÇO ile ulaştıklarını bildirmişlerdir. Açık hava koşullarında, tank sisteminde de büyümenin stok yoğunluğuyla ters orantılı olarak gerçekleştiğini ve ortalama nihai ağırlıkların 13.42-16.13 g, yaşama oranlarının %93.4-100.0 ve YÇO'ların 1.15-1.54 arasında değiştiğini ve stoklama yoğunluğu ile negatif bir korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Balakrishnan ve ark (2011), çalışmalarında *L. vannamei*'nin, toprak havuzlarda (0.8-0.9 ha), farklı stok yoğunluklarında (50, 56.25, 51.25 ve 61.11 adet/m²) büyümesini 110 gün

süreyile incelemişler; deneme sonunda ortalama final ağırlıklarının sırasıyla 21.2, 18.9, 19.6 ve 17.5 g; hayatta kalma oranlarının %82, 92, 81, ve 80 ve YÇO'ların 1.4, 1.34, 1.38 ve 1.35 olduğunu tespit etmişlerdir. Suriya ve ark (2016), *L. vannamei*'nin stok yoğunluğunun (100 adet/m² ve 12 adet/m²) hayatta kalma ve büyüme performansı üzerine etkisini araştırmışlar ve deneme sonu hayatta kalma oranlarını, sırasıyla %80 ile %90, YÇO değerlerini 1.39 ile 1.4, ortalama vücut ağırlıklarını ise 20 ila 34 g ve toplam üretimi ise 9500 ile 5861 kg olarak bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, Ray ve ark (2017) temiz su ve biyofloc üretim sistemlerinde Pasifik beyaz karideslerini kıyaslamak amacıyla her 1 m² suya 250 adet ortalama 0.48 g ağırlıkta karides stoklamış ve 55 gün süren deneme sonunda final ağırlıkları, biyomas, haftalık büyüme oranı ve yaşama oranlarını biyofloc ve temiz su kültürlerinde sırasıyla 11.1 ve 11.6 g, 1.7 ve 2 kg/m³, 1.4 ile 1.5 g/hafta, %69 ile %78 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca, Suantika ve ark (2018) RAS sisteminde karidesleri (*L. vannamei*) üç farklı yoğunlukta (500, 750 ve 1,000 PL/m³) stoklamışlar ve 84 gün süren deneme sonunda ortalama ağırlıkları 14.87, 13.09 ve 11.32 g, yaşama oranlarını %70, %53.67, %44, günlük SBO'ları %7.12, %6.95, %6.79, ve YÇO'ları ise 1.32, 1.45, ve 2.05 olarak bulmuşlardır. Çalışmada grupların stok oranlarındaki artış ile birlikte biyomasın sırasıyla 5.20 kg/m³, 5.24 kg/m³ ve 4.99 kg/m³ olarak hesaplandığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, RAS için optimal stoklama yoğunluğunu 500 PL/m³ olarak bildirmişlerdir. Krummenauer ve ark (2016) Pasifik beyaz karideslerini biyofloc sisteminde, 0.40, 0.80 ve 1.20 m su derinliklerinde (%30 tuzlulukta), 9 adet 35.5 ton kapasiteli tanklarda (sera içinde), 400 adet/m² stoklama yoğunluklarında 120 gün boyunca büyütmüşler ve deneme sonunda (17. hafta) ortalama ağırlıkların ve yaşama oranlarının değişmediğini bulmuşlardır (P>0.05). Ancak final biyomaslar gruplar arasında 2.88 (1.2 m), 4.83 (0.80 m) ve 8.45 kg/m³ (0.40 m) olarak farklılık göstermiştir (P<0.05). Bu araştırmacılar biyofloc sisteminde 0.4 m su derinliğinin biyomas açısından daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında RAS sistemde büyütme denememiz sonunda grupların yaşama

oranlarının 40 adet/m² grubunda %77.50, 80 adet/m² grubunda %76.50 ve en yüksek stoklama grubu olan 160 adet/m² grubunda ise %62 olduğu belirlenmiştir. Deneme sonu ortalama karides ağırlıklarının da yine artan stoklama yoğunlukları ile birlikte (40, 80 ve 160 adet/m²) azaldığı ve neticede 22.15, 18.31 ve 19.93 g olarak belirlendiğini, SBO'ların ise aynı gruplarda %2.55/gün, %2.39/gün ve %2.43/gün olarak hesaplandığı görülmüştür (P<0.05). Büyüme performans verilerimiz 40 adet/m² stoklama yoğunluğunun üzerinde test ettiğimiz stoklama koşullarında 40-45 cm derinlikteki tanklarda karideslerde stres nedeniyle tüm performans değerlerinde bir azalma gerçekleştiğine dikkat çekmiştir.

4.2.2.2. Biyokimyasal ve İmmün Parametreler

Dış stresörler tarafından fizyolojik sistemlerin normal sınırların dışına çıkmaya zorlanmaları halinde hayvanlarda stres oluşur. Stres indikatörleri hayvanların kısa süreli durumları veya uzun süreli sağlık durumlarının değerlendirilmesi hakkında fikir verirler. Bundan dolayı da, yetiştiricilik esnasında sağlık durumlarının doğru yöntemlerle belirlenmesi, havuzlardaki karides popülasyonlarının sağlıklı bir şekilde yönetilmesine katkı getirir. Sağlık ve immün parametrelerin düzenli olarak değerlendirilmesi sadece popülasyonların mevcut sağlık durumlarıyla ilgili bilgi vermez, aynı zamanda stres durumlarında profilaktik önlemlerle canlıların hastalanmadan durumu atlatabilmelerine de yardımcı olabilir. Pek çok çalışma stres koşullarında karideslerin hematolojik parametrelerinde değişiklikler gerçekleştiğini bildirmiştir (Le Moullac ve Haffner, 2000; Sanchez ve ark, 2001; Pascual ve ark, 2003). Bazı araştırmalar hemolenf içeriğindeki toplam protein, glikoz, trigliserit, kolesterol ve laktatın karideslerde fizyolojik durum indikatörlerinden olduklarını bildirmiştir (Sanchez ve ark, 2001). Bazı immünolojik değişkenlerden THS ve plazma protein seviyesi immün durumun belirlenmesinde kullanılmıştır (Rodríguez ve Le Moullac, 2000). Bazı fizyolojik değişkenlerden de glukoz (Racotta ve Palacios 1998), laktat (Racotta ve Palacios 1998) ve osmoregülasyon kapasitesi de (Charmantier ve Soyez 1994) stres

indikatörleri olarak değerlendirilmiştir. Diğer bazı fizyolojik parametreler içerisinde; toplam protein, toplam lipid, trigliseritler, ve kolesterol de karideslerde besinsel durum ve sağlık durumunun analiz edilmesinde dikkate alınmıştır (Sánchez ve ark, 2001).

Bir su canlısında optimal koşullarda (yani stresin olmadığı durumlarda) plazma total protein ve trigliserit değerlerinin yüksek çıkması ve tam tersine stres koşullarında bu değerlerin düşmesi beklenir. Toplam serum protein içeriğinin balıklarda sağlık durumu ile ilgili bir indikatör olarak kullanılabileceği Binuramesh ve Michael (2011) tarafından bildirilmiştir. Yüksek stoklama yoğunluğunda bulunan sazanlarda da toplam serum proteininin düştüğü Yin ve ark (1995) tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar plazma toplam protein seviyelerinde azalmaların balıklarda enfeksiyon riskini arttırdığını ifade etmişlerdir. Gerçekten de denemenin 2. ayında gruplar bazında plazma toplam protein değerlerine bakıldığında, grup içerisinde en yüksek toplam protein değerinin 40 adet/m² stok grubunda olduğu görülmüş ve bunu 80 adet/m² grubu ve ardından da 160 adet/m² grubu takip etmiştir. Buna rağmen yapılan değerlendirme sonucunda, bu dönemde yine de gruplar arasında istatistiki herhangi bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0.05$). Bu parametre 4. ayda yürütülen analizlerde ise istatistiksel farklılıklar göstermiş olmakla birlikte, bu farklılığın stoklama yoğunluğuyla ilişkili olmadığı görülmüştür ($P<0.05$). Denemenin 2. ayında plazma trigliserit değerleri açısından da üsttekine benzer şekilde; gruplar arasında en yüksek değer 40 adet/m² grubunda ölçülmüş, bu grubu 80 adet/m² ve ardından da 160 adet/m² grubu izlemiştir ($P<0.05$). Diğer yandan, 4. ay analizlerinde en yüksek trigliserit değeri 160 adet/m² grubunda, en düşük değer ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir ($P<0.05$). Özellikle 2. ay plazma total protein ve trigliserit değerleri bu dönemde yüksek stoklama yoğunluklarının bu parametreleri etkilediğini, ancak 4. ayda bu etkinin ortadan kalktığını göstermiştir. Çalışmamızdakine benzer şekilde, Mercier ve ark (2006) de Pasifik beyaz karideslerinin 4 hafta süreyle tekrarlanan stres koşullarına maruz bırakıldıklarında plazma protein, toplam lipid ve trigliserit değerlerinde

düşmeler belirlemişlerdir. Toplam protein ve toplam lipit, yaşama oranı ve immün değişkenlerle pozitif korelasyon gösterirler. Karideslerde immün bileşiklerin büyük bir kısmı proteinlerden oluştuğu için, immün parametrelerinde düşmeler dolayısıyla yaşama oranında düşmeler, patojenik enfeksiyon durumlarında da toplam proteinlerin plazmada azalması beklenen bir durumdur (Joseph ve Philip, 2007).

Stres esnasında hızla enerji kaynağı olarak kullanılabilen karbonhidratlar ve lipitler yaşama oranının yükselmesinde etkili olan immün kapasitenin devamlılığında önemli rol oynarlar. Mercier ve ark (2009) uzun süreli stres koşullarında trigliseritler, kolesterol, total lipit ve ozmotik basınç parametrelerinde önemli değişiklikler gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Bizim de çalışmamızda 4. ayda ölçülen total protein ve trigliserit değerleri arasında anlamlı farklılıkların çıkmamasının nedeni uzun süreli stres koşullarında karideslerin bu uzun süreçte koşullara adapte olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Mercier ve ark, 2006 ve 2009). Kronik strese maruz bırakılan karideslerde stresin atlatılmasına yönelik gerekli olan enerjinin karşılanmasında plazmada bulunan proteinlerin kullanıldığı bildirilmektedir (Mercier ve ark, 2009). Fouzi ve ark (2012), WSSV enfekte ettikleri ve 10 gün boyunca amonyağa maruz bıraktıkları karideslerde stresin daha da arttığını ve bu grupta hemolenf total protein seviyesinin amonyaktaki seviyenin artışı ile birlikte önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Plazmada bulunan proteinlerin enerji amaçlı kullanılması da, aslında stres altındaki karideslerde büyümenin neden yavaşladığını ve düşük performans gösterildiğini de açıklar. Üstteki araştırmacılar, çalışmalarında total lipitler ve özellikle de trigliseritlerin stres durumlarında metabolik enerji amaçlı kullanılmadıklarını bildirmiş olsa da, çalışmamızda 2. aydaki trigliserit verileri plazmada belirgin bir şekilde azalma gösterdiği için, bu besin kaynağının da muhtemelen stresin giderilmesi amacıyla o dönemlerde tüketildiğini göstermektedir. Zira çalışmamızda uyguladığımız 2 aylık stres periyodu Mercier ve ark (2009)'nin uyguladığı periyottan 1 ay daha uzun sürdüğü için proteinlere ilave olarak karidesler lipitleri de tüketmeye gerek duymuş

olabilirler. Mercier ve ark (2009) plazma proteinlerinin uzun süreli stres koşullarında immün sistem tarafından da kullanıldığını ve plazmadaki azalmaya bunun da etki etmiş olabileceğini bildirmektedir. Ancak 4. ayda alınan plazma örneklerinde, artık karideslerin total protein ve trigliserit verilerinde stoklama yoğunluğu ile ilintili bir ilişki göstermemiş olması, artık karideslerin kronik stres ortamına adapte olduklarını gösteriyor olabilir.

Akut stres biyoindikatörlerinden olan laktatın önemli bir parametre olduğu bildirilmekte olup (Wells ve ark, 1999), Atlantik salmonu ile yürüttükleri denemenin ilk ve 29. günlerinde, Basrur ve ark (2010) yüksek stok grubunda stresten kaynaklı plazma laktat seviyelerinin de yüksek çıktığını bildirmişlerdir. Laktat seviyeleri açısından gruplar kıyaslandığında; denemenin 2. ayında gruplar arasında bir farklılık belirlenmemiş, ancak 4. ayda en yüksek laktat seviyesi 80 adet/m² grubunda gözlenmiş, ($P<0.05$) diğer iki grubun laktat seviyeleri ise benzer çıkmıştır ($P>0.05$). Bulgularımız laktat değerlerinin bir stres kaynağı olarak stoklama yoğunluğu ile anlamlı bir ilişki içerisinde olmadığını, bunun da uzun süreli stres koşullarında bu parametrenin normal seviyesine dönmesiyle ilgili olduğunu düşündürmüştür. Zira, Mercier ve ark (2009) kısa süreli stres altında bile (1 saat) laktat konsantrasyonlarında görülen yükselişin düşük olduğunu ve 24 saat içerisinde seviyenin kontrol grubunun bile altına indiğini bulmuşlardır. Zaten Mugnier ve Justou (2004) da bir parametre olarak laktatın glukoza göre daha az hassas bir stres indikatörü olduğunu bildirmişlerdir.

Krustaselerde, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) çalışmaları balıklardakilere göre daha yeni olup, bu alanda yapılan ilk yayınlar pestisit (Galindo-Reyes ve ark, 2000), ağır metal birikimi (Zhao ve ark, 1995) ve termal/ozmotik stres (Chien ve ark, 2003) ile ilgili konulardır. AST ve ALT enzimleri spesifik aminoasitlerin birinden diğerine amin gruplarının transfer edilmelerini sağlarlar ve çoğunlukla omurgalılarda iyi çalışan bir karaciğerin indikatörüdürler. Van Waarde ve ark (1982) stres koşullarında ALT'nin amino asitlerin sentezi ve deaminasyonunda yaşamsal bir görevlerinin olduğunu ve bu kritik

dönemlerde canlıların ihtiyaç duydukları enerjinin karşılanmasını sağladıklarını bildirmektedir. Samanta ve ark (2014), 30 gün süren bir pestisit uygulaması sonrasında bazı balıklarda ALT, AST aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığını ve bunun doku veya organ hasarlarından kaynaklanmış olabileceğini ve metabolitlerin membranlardan geçişinde önemli bir role sahip olduğunu; bu enzimin seviyesinin stres koşullarında önemli ölçüde yükseldiğini bildirmişlerdir. Tüm bu enzimlerin artışının yüksek metabolik aktivitelerin göstergesi olduğunu ve bu aktivitelerle herbisit stresinden kaynaklı enerji ihtiyacının karşılanmasına çalışıldığını belirtmişlerdir. Serum protein ve ALP seviyelerindeki değişimin akvatik canlıların immün durumları ile ilgili fizyolojik yanıtlar olduğu ve balıkların sağlık durumları ile ilgili önemli bilgiler verebileceği bildirilmiştir (Tahmasebi-Kohyani ve ark, 2012). Diğer hayvanlarda olduğu gibi, krustaselerde de hem ALT hem de AST amino asit ve diğer ara metabolitlerin çevrimlerinde anahtar rol oynarlar (Chaplin ve ark, 1967). Joseph ve Philip (2007) de siyah kaplan karidesinde (*P. monodon*) akut tuzluluk stresinin immünolojik ve fizyolojik tepkilerini araştırdıkları çalışmalarında THS, PO, ALP, asit fosfataz aktivitesi ve metabolik değişkenler olarak da toplam protein, toplam karbonhidrat, toplam lipit, glukoz ve kolesterol seviyelerinin hepsinin de artış gösterdiğini ve plazmada THS ve ALP'nin sağlık göstergeleri olarak önerilebileceğini belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde, Fouzi ve ark (2012), çalışmalarında 10 gün boyunca farklı toplam amonyak seviyelerine ve beyaz spot sendromu virüsüne (WSSV) maruz bıraktıkları karideslerde (*P. monodon*) hemolenf ALT, AST ve TP'nin önemli ölçüde yükseldiğini saptamışlardır. 30 gün süreyle üç farklı stoklama (120, 180 ve 270 balık/m³) yoğunluğunda yetiştirilen tatlısu levreğinde (*Scortom barcoo*) serumda toplam protein haricinde, trigliserit, lizozim ve ALP aktivitelerinin stoklama yoğunluğu ile birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir. Liu ve ark (2015) Atlantik salmonunda düşük (7.57-15.71 kg/m³), orta (15.12-31.11 kg/m³) ve yüksek (30.18–61.34 kg/m³) stoklama yoğunluklarında kronik stres parametrelerini 10 hafta süre ile araştırmışlar ve test edilen tüm serum parametrelerinde ilk haftalarda önemli

değişiklikler belirlemişlerdir. ALP bir çeşit lizozomal enzim olarak balıklarda oluşan yaraların iyileştirilmesinde koruyucu olarak rol oynar (Iger ve Abraham, 1990) ve parazitik enfeksiyonlarda seviyelerinde artışlar olur (Ross ve ark, 2000). Caipang ve ark (2009) atlantik kod balığında ALP'nin kısa süreli aşırı stoklama koşullarında belirgin bir şekilde yükseldiğini bildirmiştir. Liu ve ark (2015) Atlantik salmonunda ALP aktivitesinin yetiştiriciliğin ilk iki haftasında tüm stoklama gruplarında azaldığını, ancak 4. haftadan sonra ise, tüm yüksek stoklama gruplarında seviyenin yükseldiğini görmüşlerdir. Ancak, denememizin 2. ve 4. aylarında alınan örneklerde yapılan analizlerde ALP, AST ve ALT değerlerinin stoklama oranının artışı ile anlamlı bir ilişki göstermediği veya gruplar arasında istatistiki farklar bulunmadığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bu verilere göre, *L. vannamei*'de kronik stres faktörü olarak test edilen stoklama yoğunluklarının bu enzimler üzerinde önemli etkiler yaratmadığı sonucuna varılmıştır.

Hemolenf içeriğindeki bazı değişkenlerden örneğin pıhtılaşma zamanı, THS, fagositik aktivite, antibakteriyel aktivite, vd. potansiyel stres indikatörleri olarak bildirilmiştir (Wang ve Chen, 2005; Cheng ve ark, 2007). THS ve ALP gibi değişkenler yaşama oranı ve dolayısıyla stresli ortamlarda sağlık durumunun belirlenmesinde diğerlerine göre daha iyi tahminler yapılabilmesine yardımcı olurlar. ALP ve asit fosfataz aktiviteleri hücre dışı saldırılarda önemli bir savunma mekanizması rolü üstlenirler (Cheng ve Rodrick, 1975) ve ayrıca hemositlerin fagositik aktiviteleri ile de ilişkilidirler. Bir çalışmada Mercier ve ark (2006) Pasifik beyaz karideslerini 4 hafta süreyle tekrar tekrar stres koşullarına maruz bırakmış ve bu koşullarda denemenin sonunda THS ve superoksit anyon seviyelerinde stres koşullarında herhangi bir değişiklik belirlememişlerdir. Alsen (2005), tatlısu kerevitlerinde (*Astacus leptodactylus*) serotoninin (5-HT) stres üzerine etkilerini çalışmış ve bu hormonun hemolenf dolaşımındaki hemosit hücrelerinde önemli bir artışa sebep olmadığına dair bulgular bildirmiştir. Mugnier ve ark (2008), mavi karideslerde (*L. stylirostris*) amonyak ve hipoksinin (oksijen yetmezliği) kombine etkisinin plazma laktat seviyesini arttırdığını ve THS'yi

azalttığını gözlemlemişlerdir. Klobucar ve ark (2012), kirli su ortamında kerevitlerin (*A. leptodactylus*) THS miktarında artış gözlemlemişler ve böylece kirliliğe maruz kalmanın neden olduğu stresin de doğrulandığını ortaya koymuşlardır. Song ve ark (2003), Pasifik beyaz karidesinde, immün tepkilerini ve yaşama oranını değerlendirmek için Taura sendromu virüsünü (TSV) enjekte etmişler ve bu muameleye karideslerin verdiği bazı fizyolojik tepkileri araştırmışlardır. Taura sendromu virüsü ile enfekte olan karideslerde, THS, hiyalinosit ve granülosit hücre sayıları, total plazma proteini ve hemosiyanin oranının kontrol grubuna göre sırasıyla, %21, %24, %17, %56 ve %67'ye kadar düştüğünü kaydetmişlerdir. Yıldız ve Benli (2004), sublethal (ölümcül düzeyin altında) nitrit konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları kerevitlerde (*A. leptodactylus*) hemolenf THS'lerin, nitrit muamelesine tepki olarak azaldığını ve genel olarak nitrit içermeyen suya maruz bıraktıklarında ise arttığını kaydetmişlerdir. Li ve Chen (2008), Pasifik beyaz karideslerinde düşük ve yüksek pH stresi altında 12-72 saat boyunca THS'nin, Hsu ve Chen (2007) ise sülfid stresi altında THS, PO ve fagositik aktivitede azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir. Saeed ve ark, (2015), çalışmalarında *L. vannamei*'nin tuzluluk stresinin kan parametreleri üzerine etkisini araştırmışlar; çalışmada ‰30 tuzluluğa kıyasla, ‰15 ve ‰45 tuzluluğun kan plazmasında hemosit hücrelerinde ve toplam protein değerlerinde belirgin bir düşüşe neden olduğunu tespit etmişlerdir ($P<0.05$). Li ve ark (2010), ‰35 tuzlulukta yetiştirdikleri karideslerde (*L. vannamei*) *V. alginolyticus* enjeksiyonu ve düşük tuzluluk stresi kombinasyonunun doğal bağışıklığa etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ‰25, ‰20 ve ‰15 tuzluluktaki sulara transfer edilen karideslerde 1, 6, 12, 24, 72 ve 120 saat sonra THS miktarının 6-12 saatte en düşük seviyeye indiğini belirlemişlerdir. Diğer yandan, Mercier ve ark (2009) kısa süreli bir stres uygulamasının ardından (1 saat) kontrol grubuna göre THS'de önce önemli bir artış ve ardından ise önemli bir azalış gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Üstteki literatür bildirişleriyle uyumlu bir şekilde, denememizde üç farklı stoklama yoğunluğunda 2 ay süreyle yetiştirilen karideslerde (*L. vannamei*) THS değerlerinde, artan stoklama

oranıyla ters orantılı olarak, azalma görülmüş (40 adet/m²'de 4.40x10⁶, 80 adet/m²'de 1.85x10⁶ ve 160 adet/m²'de 2.96x10⁶ hücre/mL), ancak herhangi bir istatistik farklılık bulunamamıştır. Denemenizde elde ettiğimiz verilerimizden yola çıkarak karideslerin hemolenf THS değerlerinin iki ay gibi uzun bir süreç içerisinde dengelenmiş olması itibarıyla kronik bir stres parametresi olarak değerlendirilemeyeceği anlaşılmıştır.

Li ve Chen (2008), Pasifik beyaz karideslerinde düşük ve yüksek pH stresi altında THS ve fagositik aktiviteyi incelemişler ve denemede fagositik aktivitenin 6-72 saat, THS'nin ise 12-72 saat boyunca azaldığını tespit etmişlerdir. pH 10.1'e aktardıkları karideslerde granüler hücre sayıları ve THS'nin 6 saat sonra, süperoksit dismutaz aktivitesinin ise 72 saat sonra önemli ölçüde azaldığını kaydetmişlerdir. Bu araştırmacılar 120 saat sonra pH 6.5 ve 10.1'e transfer ettikleri karideslerin bağışıklık parametrelerinin orijinal değerlerine geri döndüğünü gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte 6.5 pH'ya aktardıkları karideslerde daha düşük fagositik aktivite gözlemlemişlerdir. Hsu ve Chen (2007), Pasifik beyaz karideste sülfid stresi altında, benzer şekilde Wang ve Chen (2005) ani tuzluluk değişimlerinde fagositik aktivitenin önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Cheng ve ark (2006), farklı dozlarda noradrenalin enjekte ettikleri *L. vannamei*'de THS'nin 2 saat sonra %15-32 oranında, fagositik aktivitenin de 2 saat sonra her dozda önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar karideslerde THS'nin 4 saat, fagositik aktivitenin ise 16 saat sonra normal değerlere geri döndüğünü tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Cheng ve ark (2005), dopaminin karideste (*L. vannamei*) bağışıklık sistemi üzerine etkisini araştırmış; enjeksiyondan 4 saat sonra THS'nin %25 ve %39 oranında, fagositik aktivitenin de 2 saat sonra önemli ölçüde azalma eğilimi gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar karideslerde THS'nin 16 saat, fagositik aktivitenin ise 4 saat sonra normal değerlere geri döndüğünü tespit etmişlerdir. Rengpipat ve ark (2000) siyah kaplan karidesinde (*P. monodon*) probiyont bakteri (*Bacillus* S11) ile bağışık ilişkisini araştırmış; çalışmada fagositik aktivitenin ve fagositik indeksin önemli ölçüde

yükseldiğini tespit etmişlerdir. Khimmakthong ve ark (2011), fagositik aktiviteye etki eden protein (PAP) genini kullanarak *L. vannamei*'nin bağışıklık tepkisinin uyarılmasını incelemişler; denemede 1.9 ila 3 kat daha yüksek fagositoz ve fagositik indeks belirlemişlerdir. Denememizde 2 ay gibi uzun süren bir potansiyel stres kaynağı (stoklama yoğunluğu) baskısı altında yetiştirilen Pasifik beyaz karideslerinde yapılan fagositik aktivite analizlerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiş, ancak fagositik indeks değerlerinde 160 adet/m² stoklama yoğunluğunda istatistik olarak düşük bir değer elde edilmiştir ($P<0.05$). Test ettiğimiz en yüksek stoklama oranı olan 160 adet/m² grubunda karideslerin belirgin bir şekilde zayıf fagositik indeks göstermesi, bu grubun stres altında olması itibarıyla hassasiyetini ortaya koymuştur.

Stoklama yoğunluğu, periyodik elleme ve örneklemeler, taşıma, su kalitesi ve bazı besinsel uygulamalar gibi stres kaynakları lizozim aktivitesini etkiler (Saurabh ve Sahoo, 2008). Chen ve ark (2015b), farklı tuzluluklara (%2.5, 5, 10, 15, 25 ve %35) maruz bıraktıkları juvenil Pasifik beyaz karideste büyüme ve immün parametrelerini incelemişler; karideslerde %15, %25 ve %35 tuzlulukta yetiştirilenler de, %2.5, %5 ve %10'da yetiştirilenler ile karşılaştırıldığında, daha fazla şeffaf ve granül hücreye, önemli ölçüde yüksek THS seviyesine ve lizozim aktivitelerine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Yao ve ark (2008), Çin karidesinde (*F. chinensis*) laminarin ve *V. anguillarum* enjeksiyonunun kan hücrelerindeki lizozim aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve uygulamadan sonra hemositlerin lizozim aktivitesinin aynı anda orta seviyede bir artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar lizozom membran stabilitesi ve lizozim aktivitesini kullanarak karideslerde immün durumunun değerlendirilebileceğini önermişlerdir. Tez kapsamında farklı stoklama koşullarının yürüttüğümüz denemede 2. ayda aldığımız hemolenf örneklerinde lizozim aktiviteleri yine büyük olasılıkla uzun süren deneme protokolünden kaynaklı olarak farklılık göstermemiştir. Sadhu ve ark (2014) Asya levreğini (*Lates calcarifer*) 6 ay boyunca iki farklı stoklama (5 ve 15 balık/m³) yoğunluğunda kafeslerde yetiştirmiş

ve stoklama yoğunluğundan kaynaklı kronik stresin neden olabileceği kan parametrelerini incelemişlerdir. Yüksek stoklama grubunda kortisol ve glikoz seviyeleri artmış ve lizozim aktivitesi azalmıştır. Ayrıca toplam lökosit sayısı, toplam serum proteininde azalma, ancak tersine ALP ve asit fosfataz seviyelerinde yüksek stoklama ile birlikte bir artış görülmüştür. Stoklama stresinden kaynaklı üstte belirtilen tüm bu fizyolojik ve immün parametreler deneme sonuna kadar bu şekilde devam etmiştir. Yin ve ark (1995) yüksek stoklama yoğunluğunda tutulan sazanlarda lizozim aktivitelerinde benzer düşüşler gözlemlemişlerdir. Murray ve Fletcher (1976), yüksek stok grubunda lizozim aktivitesindeki önemli düşüşün, bu enzimi içeren kandaki lökositlerin sayısının azalmasıyla ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Balıklarda plazma lizozimin parazitik ve bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede kullanıldığı bilinmektedir (Yin ve ark, 1995). Yüksek stok gruplarında stresten kaynaklı asit ve alkalın fosfataz aktivitelerindeki yükselmelerin lizozomal değişikliklerle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Sadhu ve ark, 2014). Potansiyel stres indikatörleri olarak değerlendirilebilecek olan bu enzimler balıklarda patojenlere karşı savunmada veya vücut yüzeyindeki yaralanmaların iyileştirilmesinde kullanılırlar (Ross ve ark, 2000).

4.2.2.3. Isı Şok Proteinleri (HSP70 - HSP90)

Isı şok protein genlerindeki değişimin yararlı bir biyoindikatör olarak akvatik hayvanlarda stresin belirlenmesi ve optimum çevresel koşulların izlenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Iwama ve ark, 2004). Gao ve ark (2017), juvenil karideslerde (*L. vannamei*) (ortalama 2 g) stoklama yoğunluğunun (188, 250 ve 313 adet/m²) büyüme, oksidatif stres ve HSP70 üzerine etkisini araştırmışlar ve HSP70'in hepatopankreasta artan stoklama yoğunluğu ile önemli ölçüde arttığını, kasta orta stoklama yoğunluğunda, düşük stoklama yoğunluğuna göre önemli ölçüde yüksek olduğunu, hemolenfte ise gruplar arasında bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Yüksek stok yoğunluklarında 30 gün yetiştirilen alabalıklarda HSP70 gen ekspresyonlarının yükseldiği, benzer şekilde aşırı

stoklama stresinin Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve Atlantik kod balığında da (*Gadus morhua*) HSP70'i indüklediği bilinmektedir (Gornati ve ark, 2004; Caipang ve ark, 2008). Jia ve ark (2016), kalkan balığını (*Scophthalmus maximus*) düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı stoklama seviyesinde 120 gün boyunca yetiştirmiş ve çalışmada lizozim ve ALP'nin yüksek stok grubunda diğerlerinden daha düşük seviyelere indiğini, lizozim ile ilgili genlerin de düştüğünü, ancak bunların tersine HSP70 mRNA seviyesinin ise yüksek stok grubunda yükseldiğini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, genel bulgular ışığında, bir stresör olarak aşırı stoklamanın kalkan balıklarında immün sistemi baskıladığı sonucuna varmışlardır. Jia ve ark (2016) farklı nitrit konsantrasyonlarına akut olarak (48-96 saat) maruz bırakılan kalkan balıklarında lizozim aktivitesinin düştüğünü, ALP'nin, HSP70 ve HSP90 gen ekspresyon seviyelerinin yükseldiğini belirlemişlerdir. Iwama ve ark (2004) HSP70 gen ekspresyon parametresinin hassas bir biyoindikatör olduğunu ve farklı stresörlere farklı seviyelerde yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Dil balıklarında (*S. senegalensis*) uzun süreli yüksek stok yoğunluklarında karaciğer ve böbreklerde HSP70 gen ekspresyonlarında düşmeler (down-regulation) görülebilmektedir (Salas Leiton ve ark, 2010). Değişik araştırmalarda elde edilen farklı HSP70 gen ekspresyon tepkilerinin türsel, stresör çeşidi veya süresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gornati ve ark (2004) üç ay süreyle üç farklı stok yoğunluğunda (<10, 80 ve 100 kg/m³) yetiştirilen levreklerin (*D. labrax*) karaciğer ve beyinlerinde HSP genlerini çalışmışlar ve 100 kg/m³ biyomasta aşırı seviyede HSP70 seviyesi belirlenmiş, ancak HSP90 ölçülememiştir. Bunun yerine beyin dokusunda ise 80 kg/m³'te bile HSP90 gen ekspresyonunda yükselme ortaya çıkmıştır. Üstte görüldüğü üzere, farklı stok yoğunluklarının balıklarda moleküler seviyede etkileri üzerine birçok araştırma yürütülmüş olmasına rağmen, bu tip araştırmalar karideslerde yeterince ilgi görmemiştir. Liu ve ark (2016) kalkanlarda farklı stoklama koşullarında fizyolojik ve immün yanıtları araştırmış; ortalama 185.4 g balıkları 120 gün RAS sisteminde üç [düşük (~9.3-26.1 kg/m²), orta (~13.6-38.2 kg/m²) ve yüksek (~19.1-52.3 kg/m²)]

stoklama yoğunluğunda yetiştirerek bunlardan 0, 40, 80 ve 120. günlerde örnekleme yapmışlardır. Büyüme, biyokimyasal parametreler ve gen ekspresyonları her üç grupta da son güne (120 gün) kadar değişim göstermemiştir. Deneme sonunda, yüksek stoklama grubu, diğerlerine kıyasla, daha düşük SBO ve ortalama ağırlık göstermiştir. 120. günde, gen ekspresyonlarından örneğin HSP70'in belirgin bir şekilde azaldığı ve lizozim mRNA düzeyinin düştüğü belirlenmiştir. Genel olarak bu araştırmacıların bulguları, kalkanlarda yüksek stoklama yoğunluklarının metabolik ve antioksidan enzim aktivitelerini bloklayarak, fizyolojik stres ve immün sistemi baskıladıklarını göstermiştir. Bizim çalışmamızda, HSP70 analizleri için, denemenin 2. ayında (60. gün) ve 4. ayında (120. gün ve deneme sonu) alınan doku örneklerinde yapılan gen ekspresyon analizleri göstermiştir ki; denemenin 2. ayında analiz yapılan hiçbir dokuda (hepatopankreas, solungaç veya kasta) HSP70 seviyeleri, stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte anlamlı bir değişim göstermemiştir. Denemenin 4. ay örneklemesinde de bu durum değişmemiş ve kas dokuda yapılan analizler haricinde diğer dokularda HSP70 gen ekspresyon seviyeleri benzer bulunmuştur ($P>0.05$). Ancak, bu periyotta (4. ay) kas örneklerinde HSP70 seviyesi 40 adet/m² stok grubunda 0.78 iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.82, ancak 160 adet/m² grubunda ise yaklaşık 3 katlık bir artış ile 2.59 seviyesine çıkmıştır ($P<0.05$). Denemenin 4. ayında ve en yüksek stok grubunda görülen bu yükseliş HSP70 geninin muhtemelen artan karides biyoması (2 kg/m² veya 4.74 kg/m³) tarafından stres yaratmaya başladığı için indüklendiğini göstermiştir. Bu biyomas artışı en düşük stoklama grubundan (40 adet/m²) 2.87 kat ve orta stok (80 adet/m²) grubundan ise 1.77 kat daha yüksek olarak hesaplanmıştır. Özellikle tanklardaki suyun sadece 40-45 cm derinliğinde olması, hayvanlar üzerinde daha yüksek oranda stres oluşmasına neden olmuş olabilir. Yarahmadi ve ark (2016) gökkuşağı alabalığında 10, 40 ve 80 kg/m³ stoklama oranlarında 30 gün boyunca stres ve immün sistemle ilgili kan parametreleri ve HSP gen ekspresyonlarını araştırmış ve HSP70 seviyelerinin stoklama ile ilişkili olduğunu ve stoklama

oranının artışıyla birlikte (40 ve 80 kg/m³) yükseldiğini, LyzII gen ekspresyonu ve serum laktat seviyesinin düştüğünü, serum toplam protein ve ALP seviyelerinin ise değişmediğini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar kısa süreli akut stresin balıklarda (alabalık) immün sistem üzerinde olumlu etkiler verebileceğini, ancak aşırı stoklamadan kaynaklı kronik stresin immün sistemi baskıladığını ve bunun da balıkları patojenlere daha hassas hale getirebileceğini belirtmişlerdir. Dolayısıyla, denememizin 4. ayında, karideslerin büyümesi (ortalama 20 g >) ile artan biyomasın artık stres yaratmaya başladığı ve bu dönemden itibaren de bu stresin karideslerde patojenlere yönelik hassasiyeti arttırabileceği yorumlanabilir.

Akvakültürde stoklama oranı uzun süreli stres yaratarak ilgili türün fizyolojisi ve davranışları üzerinde etkili olur ve yaşama oranı ile büyüme performans parametrelerini etkiler. Yüksek stoklamada büyüme, yem tüketimi, YÇO, sindirilebilirlik oranı ve balık refah göstergelerinde sorunlarla karşılaşılır (Ellis ve ark, 2002). Sıcaklık dalgalanması ve şokunun (Guo ve ark, 2010; Loc ve ark, 2013), veya sıcak/soğuk şoku ile *V. anguillarum* WSSV uygulamasının (Zhenyu ve ark, 2004), bakteri yüklemesinin (Zhou ve ark, 2010) ve amonyak stresinin HSP70 gen ekspresyonuna etkileri karideslerde araştırılmış (Chen ve ark, 2015a), ancak bilindiği kadarıyla stoklama ile ilişkili olarak karideslerde HSP90 gen ekspresyon seviyesi ilk kez bu tez kapsamında ele alınmıştır. Dil balığında (*S. senegalensis*) aşırı stoklama stresinin ısı şok proteinlerinden HSP70 ve HSP90 stres genleri ve doğal immün sistem ile ilgili genlerden g-tipi lizozim genlerini etkileyebileceği bildirilmiştir (Costas ve ark, 2013). Diğer ilgili birçok moleküller gibi, HSP70 genleri balıklarda stoklama yoğunluğunun etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Kim ve ark, 2013; Ni ve ark, 2014). Hücresel strese yanıt olarak HSP70 en çok çalışılan ısı şok proteinleridir, ki bunlar denatüre edilmiş veya değiştirilmiş proteinlerin ve polipeptidlerin parçalanması veya tamir edilmesinde aracı olurlar (Ni ve ark, 2014).

Balıklarda yüksek stoklama koşullarına tepki olarak HSP70 seviyesinin yükseldiğini gösteren bir çok araştırma mevcuttur (Kim ve ark, 2013; Aksakal ve

ark, 2011; Şahin ve ark, 2014). Jia ve ark (2016), yüksek stoklama oranının kalkan balığının derisinde HSP70 mRNA seviyesinin yükselmesine neden olduğunu göstermiştir. Çevresel stresörlerden (yüksek stoklama gibi) kaynaklı hücresel hasarlardan korunabilmek için HSP70 seviyesinde gerçekleşen artışın önemli bir rolü olabileceği bildirilmiştir (Kregel, 2002). Denemenin yine 2. ayında yapılan HSP90 gen ekspresyon analizlerinde sadece hepatopankreasta anlamlı bir değişim gerçekleşmiş ve bu dokuda stoklama yoğunluğunun artışına paralel olacak şekilde istatistiksel olarak belirgin bir artış belirlenmiştir ($P<0.05$). Bu noktada, 40 adet/m² stok grubunda HSP90 seviyesi 0.06 olarak hesaplanmış iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.62 ve ardından 160 adet/m² grubunda ise 1.13 olarak gerçekleşmiştir. Buna göre en yüksek stok yoğunluğunda karideslerin hepatopankreas dokusunda indüklenen HSP90 artışı, diğer gruplara kıyasla, 1.82 ile 18.83 kat daha yüksek çıkmıştır. 4. ay analizlerinde ise hepatopankreastaki HSP90 indüklenmesinin ortadan kalktığı, bunun yerine, sadece kasta stoklama yoğunluğu ile HSP90 gen ekspresyon seviyeleri arasından anlamlı bir ilişkinin bulunduğu fark edilmiştir. Deneme süresince karides biyomasının en üst noktaya çıktığı bu dönemde kasta 40 adet/m² grubunda HSP90 seviyesi 0.16 olarak ölçülmüş iken, bu seviye 80 adet/m² grubunda 5.21'e (32.56 kat) ve 160 adet/m² grubunda ise 7.90 seviyesine çıkmıştır (49.38 kat, $P<0.05$).

Gerek HSP70 gerekse HSP90 analiz sonuçlarından, denememiz koşullarında, Pasifik beyaz karidesinin 4. ayında ulaşılan biyomas seviyesinde (2 kg/m² veya 4.74 kg/m³) karideslerin 160 adet/m² (deneme başlangıç stoklama seviyesi) stok grubunda stres yaşamaya başladıkları ve bu stoklama oranının ötesinde yetiştiricilik yapılması halinde, karideslerin bağışıklık sistemlerinde artan hassasiyet nedeniyle hastalıklarla karşılaşma riskinin yükseleceği öngörülmüştür. Karides yetiştiriciliğinde büyütmenin genellikle 3.5-4 ay gibi oldukça kısa periyotlarda tamamlanması, yüksek stoklama koşullarında hastalık riskini azaltmakta ve böylece daha yüksek ürün elde edilebilmesine imkan vermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karideslerin bağışıklık sistemlerinin yüksek stok yoğunluklarında nasıl etkilendiğine dair formalin testi, salinite testi ile bazı biyokimyasal ve immünolojik parametreler arasındaki ilişki ilk kez bu tezde ayrıntılı olarak ele alınmış ve incelenmiştir. Ayrıca karideslerde stoklama yoğunluğunun stres oluşturduğuna (akut veya kronik) ve bunun farklı dokularda (et, solungaç ve hepatopankreas) HSP90'nın sentezlenmesine yol açtığına dair bugüne kadar herhangi hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.1. I. Deneme;

Tez çalışmasının I. denemesinde yüksek stoklama yoğunluklarının karideslerde stres oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek için; büyüme, yem tüketimi, dokularda HSP genlerinin görünüm analizleri (HSP70 ve HSP90) ve dayanıklılık testleri (formalin, tuzluluk) yapılmıştır ve özet olarak elde edilen genel sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

- * Önbüyütme aşamasında üç farklı stoklama yoğunluğunda (200, 400 ve 800 adet/m²) yetiştirilen *L. vannamei* yavrularında deneme sonu yaşama oranları, sırasıyla, %77, %78 ve %82 olarak ve ortalama ağırlıklar ise 1.35, 1.09 ve 1.12 g olarak elde edilmiştir.
- * Deneme sonunda uygulanan stres testleri stoklama yoğunluğunun artışı ile yaşama oranlarının düştüğünü, diğer bir ifadeyle, yüksek stoklama koşullarında yetiştirilen karideslerde çevresel koşullara hassasiyetin arttığını ortaya koymuştur ($P < 0.05$).
- * HSP70 analizlerinde 0. gün örneklemeğinde HSP70 değeri 1.13 olarak belirlenmiş, 1 gün sonra tüm stoklama gruplarında (200, 400 ve 800 adet/m²) bu değer, sırasıyla, 1.44, 1.96 ve 1.88 seviyelerine yükselmiştir. Ancak, %30.56 ile %36.11 seviyesinde artışlara rağmen, yine de ilk gün

HSP70 verileri üzerinde yapılan istatistik hesaplamalar gruplar arasında bir fark olmadığını göstermiştir.

- * Denemenin 3, 7 ve 30. günlerinde alınan örneklerde stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte HSP70 verilerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.
- * HSP90 gen ekspresyon analizlerinde 0. gün örneklemede belirlenen 1.51'lik seviye, 1. günde stoklama yoğunluğundaki artışa paralel olarak artış göstermiş ve bu artış özellikle 800 adet/m² stok yoğunluğunda, düşük stok yoğunluğuna (200 adet/m²) kıyasla, 9-10 kat daha yüksek olarak gerçekleşmiştir.
- * 1. günde, orta stoklama yoğunluğu olan 400 adet/m² grubunda da, 200 adet/m² grubuna kıyasla, HSP90 seviyesi yaklaşık 2.5 kat yükselmiş, ancak istatistik bir farklılık belirlenmemiştir.
- * Gruplar arasındaki bu anlamlı farklılık 3. günde daha az belirgin hale gelmiş ve 7. günde artan stoklama yoğunluğuna paralel bir artış görülmüş olsa da, gruplar arasında istatistiki bir farklılık bulunamamıştır. 30. günde alınan 3 farklı doku örneklerinin hiçbirinde de stoklama yoğunluğuyla ilintili bir eğilim belirlenmemiştir.
- * Bulgularımız hem HSP70 hem de HSP90 gen ekspresyon analiz sonuçlarının stoklama yoğunluklarıyla ilintili olarak artış gösterdiklerini, ancak özellikle HSP90'nın daha da fazla etkilendiğini ortaya koymuştur.
- * Literatür bildirişlerinden ve bulgularımızdan yola çıkarak, özellikle ön-büyütme döneminde 800 adet/m² (1-1.5 g boyutlarında) gibi test ettiğimiz en yüksek stoklama yoğunluğunun karideslerde HSP70 ve özellikle de HSP90 gen ekspresyon seviyelerini uyararak yükselttiği, ancak bu uyarımın 1-2 gün içerisinde azalarak seviyelerin tekrar normale dönerek regüle edilebildiği anlaşılmıştır.

5.2. II. Deneme;

Tez çalışmasının II. denemesinde, resirküle sistemde farklı stoklama yoğunluklarının (40, 80 ve 160 adet/m²) karideslerde (*L. vannamei*) stres oluşturup oluşturmadığını belirlemek için; büyüme, yem tüketimi, bazı hemolenf (plazma laktat, total protein, trigliserit) ve immünolojik parametreler (ALP, AST ve ALT) ile ısı şok proteinlerindeki değişim 4 ay süreyle araştırılmıştır ve denemeden elde edilen genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- * Islah edilmiş Pasifik beyaz karidesi (*L. vannamei*) RAS sisteminde sadece 4 ayda 40, 80 ve 160 adet/m² stoklama koşullarında (üstelik sadece 40-45 cm su derinliğindeki tanklarda) yaşama oranları sırasıyla %77.50, %76.50 ve %62.00 olarak gerçekleşmiştir. Deneme sonu ortalama karides ağırlıkları da yine sırasıyla 22.15, 18.31 ve 19.93 g ve SBO değerleri %2.55/gün, %2.39/gün ve %2.43/gün olarak bulunmuştur. Bu denemede YÇO 1.56 ile 1.74 arasında değişmiştir.
- * Denemenin 2. ayında gruplar bazında en yüksek serum toplam protein değeri 40 adet/m² stok grubunda belirlenmiş, bunu 80 adet/m² grubu ve ardından da 160 adet/m² grubu takip etmiştir. Bu parametre 4. ayda yürütülen analizlerde istatistiksel farklılıklar göstermiş olmakla birlikte, bu farklılığın stoklama yoğunluğuyla ilişkili olmadığı görülmüştür.
- * Stoklama grupları arasında 2. ayda belirlenen en yüksek serum trigliserit değeri 40 adet/m² grubunda belirlenmiş, grubu 80 adet/m² ve ardından da 160 adet/m² grubu izlemiştir. Diğer yandan, 4. ay analizlerinde en yüksek trigliserit değeri 160 adet/m² grubunda, en düşük değer ise 80 adet/m² grubunda belirlenmiştir.
- * 2. ay serum total protein ve trigliserit değerleri bu dönemde yüksek stoklama yoğunluklarının bu parametreleri etkilediğini, ancak 4. ayda bu etkinin ortadan kalktığını göstermiştir.

- * Çalışmamızda stoklama yoğunluğunun artışının tersine, 2. ayda protein ve trigliserit değerlerinin plazmada belirgin bir şekilde azalış göstermesi, bu besin kaynağının muhtemelen stresin giderilmesi amacıyla o dönemlerde tüketildiğini ortaya koymaktadır.
- * 4. ayda ölçülen total protein ve trigliserit değerleri arasında anlamlı farklılıkların çıkmamasının nedeninin uzun süreli stres koşullarına (kronik stres) karideslerin adaptasyonu olduğu düşünülmektedir.
- * Bulgularımız laktat değerlerinin bir stres kaynağı olarak stoklama yoğunluğu ile anlamlı bir ilişki içerisinde olmadığını, bunun da uzun süreli stres koşullarında bu parametrenin normal seviyesine dönmesiyle ilgili olduğunu düşündürmüştür.
- * Denememizin 2. ve 4. aylarda alınan örneklerde yapılan analizler ALP, AST ve ALT değerlerinin stoklama oranının artışı ile anlamlı bir ilişki göstermediğini veya gruplar arasında istatistiki farklar bulunmadığını göstermiştir. Elde ettiğimiz bu verilere göre, *L. vannamei*'de kronik stres faktörü olarak test edilen stoklama yoğunluklarının bu enzimler üzerinde önemli etkiler yaratmadığı sonucuna varılmıştır.
- * Denemenizde elde ettiğimiz verilerden, karideslerin hemolenf THS değerlerinin iki ay gibi uzun bir süreç içerisinde dengelenmiş olması itibarıyla kronik bir stres parametresi olarak değerlendirilemeyeceği anlaşılmıştır.
- * Denememizin 2 ay gibi stoklama yoğunluğu baskısı altında yetiştirilen karideslerde yapılan fagositik aktivite analizlerinde gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiş, ancak fagositik indeks değerlerinde 160 adet/m² stoklama yoğunluğunda istatistik olarak düşük bir değer elde edilmiştir. Test ettiğimiz en yüksek stoklama oranında (160 adet/m²) karideslerin belirgin bir şekilde zayıf fagositik indeks göstermesi, bu grubun stres altında olması itibarıyla hassasiyetini ortaya koymuştur.

- * Proje kapsamında farklı stoklama koşullarında yürüttüğümüz denemede 2. ayda aldığımız hemolenf örneklerinde lizozim aktiviteleri yine büyük olasılıkla uzun süren deneme protokolünden kaynaklı olması itibarıyla farklılık göstermemiştir.
- * Bilindiği kadarıyla, karideslerde stoklama yoğunluğu ile ilişkili olarak HSP90 gen ekspresyon seviyesi ilk kez bu proje kapsamında ele alınmıştır.
- * Çalışmamızda, HSP70 analizleri için, denemenin 2. ve 4. ayında alınan doku örneklerinde yapılan gen ekspresyon analizleri göstermiştir ki; denemenin 2. ayında hiçbir dokuda (hepatopankreas, solungaç veya kasta) HSP70 seviyeleri, stoklama yoğunluğunun artışı ile birlikte anlamlı bir değişim göstermemiştir. Denemenin 4. ay örneklemeğinde de bu durum değişmemiş, kas dokuda yapılan analizler haricinde, diğer dokularda HSP70 seviyeleri benzer bulunmuştur.
- * Denemenin 4. ay kas örneklerinde HSP70 seviyesi 40 adet/m² stok grubunda 0.78 iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.82, ancak 160 adet/m² grubunda ise yaklaşık 3 katlık bir artış ile 2.59 seviyesine çıkmıştır. En yüksek stok grubunda görülen bu yükseliş HSP70 geninin muhtemelen artan karides biyoması (2 kg/m² veya 4.74 kg/m³) tarafından stres yaratmaya başladığı için indüklendiğini göstermiştir. Bu biyomas artışı en düşük stoklama grubundan (40 adet/m²) 2.87 kat ve orta stok (80 adet/m²) grubundan ise 1.77 kat daha yüksek olarak hesaplanmıştır. Özellikle tanklardaki suyun sadece 40-45 cm derinliğinde olması, hayvanlar üzerinde daha yüksek oranda stres oluşmasına neden olmuş olabilir.
- * Denemenin 4. ayında, karideslerin büyümesi (ortalama 20 g >) ile artan biyomasın, özellikle de 160 adet/m² grubunda, artık stres yaratmaya başladığı ve bu dönemden itibaren de bu stresin karideslerde patojenlere yönelik hassasiyeti arttırabileceği düşünülmüştür.
- * Denemenin 2. ayında yapılan HSP90 analizlerinde sadece hepatopankreasta anlamlı bir değişim gerçekleşmiş ve bu dokuda stoklama

yoğunluğunun artışına paralel olacak şekilde istatistiksel olarak belirgin bir artış belirlenmiştir. Bu noktada, 40 adet/m² stok grubunda HSP90 seviyesi 0.06 olarak hesaplanmış iken, bu değer 80 adet/m² grubunda 0.62 ve ardından 160 adet/m² grubunda ise 1.13 olarak gerçekleşmiştir. Buna göre en yüksek stok yoğunluğunda karideslerin hepatopankreas dokusunda indüklenen HSP90 artışı, diğer gruplara kıyasla, 1.82 ile 18.83 kat daha yüksek çıkmıştır.

- * 4. ay analizlerinde hepatopankreastaki HSP90 indüklenmesinin ortadan kalktığı, bunun yerine, sadece kasta stoklama yoğunluğu ile HSP90 gen ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir ilişkinin bulunduğu fark edilmiştir. Deneme süresince karides biyomasının en üst noktaya çıktığı bu dönemde kasta 40 adet/m² grubunda HSP90 seviyesi 0.16 olarak ölçülmüş iken, bu seviye 80 adet/m² grubunda 5.21'e (32.56 kat) ve 160 adet/m² grubunda ise 7.90 seviyesine çıkmıştır (49.38 kat).

KAYNAKLAR

- Aguirre-Guzman, G., Sanchez-Martinez, J.G., Campa-Cordova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., 2009. Penaeid Shrimp Immune System. Thai J. Vet. Med., 39(3):205-215.
- Aksakal, E., Ekinçi, D., Beydemir, Ş., Alım, Z., Buğrahan, C., 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. Livestock Science, 141(1):69-75.
- Alsen, A., 2005. Investigation of Serotonin (5-HT) activities and localisation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. Biology Education Centre, Uppsala University and Department of Biology, Degree Project in Biology, 1-26.
- Alvarez, A.L., Racotta, I.S., Arjona, O., Palacios, E., 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 237:237-249.
- Ang-lu, S., Ke-ji, J., Dao-ji, L., 2015. Effects of heat stress on the mRNA expression of Hsp70 and Hsp90 in white shrimp, *Exopalaemon carinicauda*. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 44(10):1504-1511.
- Bachere, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp, a comparison with other effectors of innate immune. Aquaculture, 191:71-88.
- Balakrishnan, G., Peyail, S., Ramachandran, K., Theivasigamani, A., Savji, K.A., Chokkaiah, M., Nataraj, P., 2011. Growth of Cultured White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) In Different Stocking Density. Advances in Applied Science Research, 2(3):107-113.
- Basrur, T., Longland, R., Wilkinson, R., 2010. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem., 36:445-450.

- Bathige, S.D.N.K., Umasuthan, N., Revathy, K.S., Whang, I., Lim, B.S., Nam, B.H., Lee, J., 2013. A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Haliotis discus discus*: genome organization, transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.*, 41:282-294.
- Binuramesh, R., Michael, D., 2011. Diel variations in selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 30:824-829.
- Blancheton, J.P., 2000. Development in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, 22(1-2):17-31.
- Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A., 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125:443-451.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23:329-344.
- Caipang, C. M. A., Brinchmann, M.F., Berg, I., Iversen, M., Eliassen, R., Kiron, V., 2008. Changes in selected stress and immune related genes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, following overcrowding. *Aquac. Res.*, 39:1533-1540.
- Caipang, C.M.A., Berg, I., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2009. Short term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. *Aquaculture*, 295:110-115.
- Chaplin, A.E., Hugginst, A.K., Aunday, K.A., 1967. The distribution of L-a-aminotransferases in *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 20:195-198.
- Charmantier, G., Soye, C., 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 178: 233-246.

- Chen, Y.Y., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., Chao, K.P., Lee, C.S., 2014. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Petalonia binghamiae* Extract Activate Immunity, Increase Immune Response and Resistance against *Vibrio alginolyticus*. J. Aquac. Res. Development, 5:(6)2-7.
- Chen, Y.Y., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., Huang, C.L., 2015a. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Gracilaria tenuistipitata* extract show early recovery of immune parameters after ammonia stressing. Mar. Drugs, 13:3606-3624.
- Chen, Y.Y., Blanc, M., Lin, Y.C., Huang, C.L., Chen, J.C., 2015b. Growth and immune parameters in white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared at different salinities. J. Fish. Soc. Taiwan, 42(1):63-71.
- Cheng, T.C., Rodirick, G.E., 1975. Lysosome and other enzymes in the haemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Comp. Biochem. Physiol., 52B:443-447.
- Cheng, W., Chieu, H.T., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunology, 19:375-385.
- Cheng, W., Chieu, H.T., Ho, M.C., Chen, J., 2006. Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 21:11-19.
- Cheng, S.Y., Hsu, S.W., Chen, J.C., 2007. Effect of sulphide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicas*. Fish & Shellfish Immunol., 22:16-26.
- Chien, Y.H., Pan, C.H., Hunter, B., 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquaculture, 216:177-191.
- Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W., 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish & Shellfish Immunology, 23:364-377.

- Cohen, J.M., Samocha, T.M., Fox, J.M., Gandy, R.L., Lawrence, A.L., 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquacultural Engineering*, 32:425-442.
- Company, R., Caldach-Giner, J.A., Kaushik, S.J., Perezsanchez, J., 1999. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture*, 171:279-292.
- Costas, B., Aragao, C., Dia, J., Afonso, A., Conceição, L.E., 2013. Interactive effects of a high quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 39:1141-1151.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., 1998. The design, management and production of a recirculating raceway system for the production of marine shrimp. *Aquacultural Engineering*, 17:193-211.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachere, E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from penaeids shrimp (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272:28398-28406.
- Dhert, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. Stress evaluation: a tool for quality control of hatchery produced shrimp and fish fry. *Aquac. Eur.*, 17:6-10.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 61:493-531.
- Esparza-Leal, H.M., Cardozo, A.P., Wasielesky Jr, W., 2015. Indoor nursery tanks at high stocking density in clear water versus biofloc system. *Aquacultural Engineering*, 68:28-34.
- FAO., 2016. The state of World fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 200 pp.

- Fegan, D.F., 1992. Recent developments and issues in the Penaeid shrimp hatchery industry. In: Wyban, J. (Ed.), Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp:55-70.
- Fouzi, M.N.M., Shariff, M., Yusoff, F., 2012. Stress Quantification in *Penaeus monodon* Exposed to Different Levels of Ammonia and Subsequent Infection to WSSV. Research Journal of Veterinary Sciences, 5(1):13-24.
- Gaber, M.M., Omar, E.A., Abdel-Rahim, M., Nour, A.M., Zaki, M.A., Srouf, T.M., 2012. Effects of Stocking Density and Water Exchange Rates on Growth Performance of Tiger Shrimp, *Penaeus semisulcatus* Cultured in Earthen Ponds. Aquaculture Research & Development, 3:7.
- Galindo-Reyes, J.G., Venezia, L.D., Lazcano-Alvarez, G., Rivas-Mendoza, H., 2000. Enzymatic and osmoregulative alternations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. Chemosphere, 40:233-237.
- Gao, Y., He, Z., Vector, H., Zhao, B., Li, Z., He, J., Lee, J.L., Chu, Z., 2017. Effect of Stocking Density on Growth, Oxidative Stress and HSP 70 of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 17:877-884.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Gene, 341:111-118.
- Gunalan, B., Soundarapandian, P., Dinakaran, G.K., 2010. Effect of Different Stocking Densities on the MBV Infected Seeds of Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Asian Journal of Agricultural Sciences, 2(1):5-8.
- Guo, B., Wang, F., Dong, S., Dong, Y., Tian, X., 2010. The effects of cyclical temperature changes on growth and physiological status of *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Int., 18:921-932.

- Hall, M.R., Ham, E.H.V., 1998. The Effects of Different Types of Stress on Blood Glucose in the Giant Tiger Prawn *Penaeus monodon*. Journal of The World Aquaculture Society, 29(3):290-299.
- Hancock, R.E.W., 1998. The therapeutic potential of cationic peptides. Expert Opin. Investig. Drugs, 7:167-174.
- Herrera, A.M., Corona, C.G., Cabello, M.L., Lopez, H.S., 2006. Effects of Stocking Densities on Growth of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Earthen Ponds. The Israeli Journal of Aquaculture, 58(3):205-213.
- Hsu, S.W., Chen, J.C., 2007. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. Aquaculture, 271(1-4):61-69.
- Iger, Y., Abraham, M., 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. J. Fish Biol., 36:421-437.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O., Todgham, A., Ackerman, P., Nakano, K., 2004. Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish? J. Exp. Biol., 207:15-19.
- Jia, R., Liu, B.L., Han, C., Huang, B., Lei, J.L., 2016. The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 181-182:40-46.
- Johansson, M., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Soderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191:45-52.
- Joseph, A., Philip, R., 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture, 272:87-97.
- Khimmakthong, U., Deachamag, P., Phongdara, A., Chotigeat, W., 2011. Stimulating the immune response of *Litopenaeus vannamei* using the phagocytosis activating protein (PAP) gene. Fish & Shellfish Immunology, 31:415-422.

- Kim, J.H., Dahms, H.U., Han, K.N., 2013. Biomonitoring of the river pufferfish, *Takifugu obscurus* in aquaculture at different rearing densities using stress related genes. *Aquac. Res.*, 44:1835-1846.
- Kiruthika, J., 2013. Effect of salinity stress on the biochemical and nutrition parameters of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fishery Technology*, 50(4):294-300.
- Klobucar, G.I.V., Malev, O., Srut, M., Stambuk, A., Lorenzon, S., Cvetkovic, Z., Ferrero, E.A., Maguire, I., 2012. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere*, 87:62-67.
- Koenigsknecht, J., Landreth, G., 2004. Microglial phagocytosis of fibrillar betaamyloid through a beta1 integrindependent mechanism. *J Neurosci*, 24:9838-9846.
- Kregel, K.C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermo tolerance. *J. Appl. Physiol.*, 92:2177-2186.
- Krummenauer, D., Peixoto, S., Cavalli, R.O., Poersch, L.H., Wasielesky, Jr, W., 2011. Super intensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern brazil at different stocking densities. *Journal of The World Aquaculture Society*, 42(5):726-733.
- Krummenauer, D., Poersch, L.H., F6es, G., Lara, G., Wasielesky Jr, W., 2016. Survival and growth of *Litopenaeus vannamei* reared in Bft System under different water depths. *Aquaculture*, 465: 94-99.
- Kumlu, M., 2001. Karides, İstakoz ve Midye Yetiştiriciliği. Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No. 6, Adana, 305s.
- Kumlu, M., Aktaş, M., Eroldoğan, O.T., 2003. Pond Culture of *Penaeus semisulcatus* in Subtropical Conditions of Türkiye. *EU, Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(3/4):367-372.

- Kumlu, M., Kır, M., Yılmaz, Ö., Göçer, M., Eroldoğan, O.T., 2010. Growth of over-wintered and pre-seasonally produced post-larvae of *Penaeus semisulcatus* in the subtropics. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10:269-276.
- Kumlu, M., Beksarı, A., Yılmaz, H.A., Kınay, E., 2016. Growth and food consumption of the green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus* under high stocking densities in a recirculation system. Presented in 5th International Conference on Agriculture, Environment and Biological Sciences, 28-29 April, 2016, Pattaya, Thailand.
- Kumlu (Basılmamış Veri). Akdeniz Koşullarında Karides Yetiştiriciliğinin Geliştirilmesi. TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü: General Directorate of Agricultural Research and Policies) (TAGEM-13/Ar-Ge/34), 2013-2016.
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191: 121-131.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. Curr. Opin. Immunol., 11:23-37.
- Li, Y., Li, J., Wang, Q., 2006. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 256:608-616.
- Li, C.C., Chen, J.C., 2008. The immune response of White shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. Fish & Shellfish Immunology, 25:701-709.
- Li, C.C., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2010. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. Fish & Shellfish Immunology, 28:121-127.

- Lin, Y.C., Chen, J.C., Man, S.N.C., Morni, W.Z.W., Suhaili, A.S.N.A., Cheng, S.Y., Hsua, C.H., 2012. Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long term starvation and re feeding. *Results Immunol.*, 2:148-156.
- Lin, Y.C., Chen, J.C., Chen, Y.Y., Yeh, S.T., Chen, L.L., Huang, C.L., Hsieh, J.F., Li, C.C., 2015. Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 45:104-111.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22:631-677.
- Liu, M., Zhang, S., Liu, Z., Li, H., Xu, A., 2006. Characterization, organization and expression of AmphiLysC, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Gene*, 367:110-117.
- Liu, B., Liu, Y., Wang, Y., 2015. The effect of stocking density on growth and seven physiological parameters with assessment of their potential as stress response indicators for the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(3):177-192.
- Liu, B., Jia, R., Han, C., Huang, B., Lei, J.L., 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 190:1-8.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.
- Loc, N.H., Macrae, T.H., Musa, N., Abdullah, M.D.D.B., Wahid, M.E.A., Sung, Y.Y., 2013. Non-Lethal Heat Shock Increased Hsp70 and Immune Protein Transcripts but Not *Vibrio* Tolerance in the White Leg Shrimp. *Plos One*, 8(9):1-7.

- Losordo, T.M., Simmons, M.B., 1994. An introduction to water reuse systems. In: M.B. Timmons and T.M. Losordo eds. Aquaculture water reuse system: Engineering, design and management. Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences 27. Elsevier Scientific Publishing and Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 1-7.
- Martin, G.G., Graves, B., 2005. Fine structure and classification of shrimp haemocytes. J. Morphol., 185:339-348.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. HSP 70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Review. Cell Mol. Life Sci., 62:455-8.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Cordova, A.I., Tovar-Ramirez, D., Hernandez-Herrera, R., Racotta, I.S., 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture, 258:633-640.
- Mercier, L., Racotta, I.S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M.F., Wille, M., Sorgeloos, P., Palacios, E., 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. Aquaculture Research, 40(16):1849-1863.
- Moe, Y.Y., Koshio, S., Teshima, S., Ishikawa, M., Matsunaga, Y., Panganiban Jr, A., 2004. Effect of vitamin C derivatives on the performance of larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture, 242:501-512.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, 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, 20:53-60.
- Mugnier, C., Justou, C., 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. Journal of Experimental Biology & Marine Ecology, 309:35-46.

- Mugnier, C., Lemonnier, H., Legrand, A., 2006. Physiological response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to short term confinement on a pond bottom. *Aquaculture*, 253(1-4):703-711.
- Mugnier, C., Zipper, E., Goarant, C., Lemonnier, H., 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*, 274(2-4):398-407.
- Murray, C.K., Fletcher, T.C., 1976. The immunohistochemical localisation of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.*, 9:329-334.
- Mylonakis, E., Aballay, A., 2005. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect. Immun.*, 73:3833-3841.
- Nappi, A.J., Ottaviani, E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22: 469-480.
- Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Ren, Y., Song, Z., Ding, H., 2014. Two HSPs gene from juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): cloning, characterization and expression pattern to crowding and hypoxia stress. *Fish. Physiol. Biochem.*, 40:1801-1816.
- Ojima, N., 2005. Rainbow trout HSPbl (HSP27): Identification of two mRNA splice variants that show predominant expression in muscle tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 14883:277-285.
- Pan, C.H., Chien, Y.H., Hunter, B., 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297:107-118.
- Pascual, C., Sanchez, A., Sanchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218:637-650.

- Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111(1-4): 51-63.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*. Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunology*, 16:25-39.
- Qian, Z., Liu, X., Wang, L., Wang, X., Li, Y., Xiang, J., Wang, P., 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156 (3-4):211-220.
- Qing, P.L., XU, J.L., Jing, M.J., 2005. Effects of Salinity and Ph on Immune Parameters of The White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, 24(4):1223-1227.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29:351-356.
- Ravuru, D.B., Mude, J.N., 2014. Effect of Density on Growth and Production of *Litopenaeus vannamei* of Brackish Water Culture System in Summer Season with Artificial Diet in Prakasam District, India. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, 5(1):10-13.
- Ray, A.J., Drury, T.H., Cecil, A., 2017. Comparing clear water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquaculture Engineering*, 77:9-14.
- Reid, B., Arnold, C.R., 1992. The Intensive Culture of the Penaeid Shrimp *Penaeus vannamei* Boone in a Recirculating Raceway System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(2):146-153.

- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus SII*). *Aquaculture*, 191:271-288.
- Rodríguez, J., Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191:109-119.
- Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., Johnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of native Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat. Organ.*, 41:43-51.
- Rouse, D.B., Davis, D.A., 2004. Stocking Density, Nursery Duration Influence Shrimp Growth, Survival During Growout. *Seedstock Production*, 79-80.
- Sadhu, N., Sharma, S.R., Joseph, S., Dube, P., Philipose, K.K., 2014. Chronic stress due to high stocking density in open sea cage farming induces variation in biochemical and immunological functions in Asian seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Fish Physiol. Biochem.*, 40(4):1105-1113.
- Saeed, K., Sima, A.S., Babak, G., 2015. The Survey effect of salinity stress on blood parameters of young *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5):358-363.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Canavate, J.P., Manchado, M., 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish Shellfish Immunol.*, 28:296-302.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Ghosh, A.R., 2014. Evaluation of Metabolic Enzymes in Response to Excel Mera 71, a Glyphosate Based Herbicide, and Recovery Pattern in Freshwater Teleostean Fishes. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 425159, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/425159>.

- Samocha, T.M., Guajardo, H., Lawrence, A.L., Castille, F.L., Speed, M., McKee, D.A., Page, K.I., 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* Postlarvae. *Aquaculture*, 165:233-242.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology*, 23:49-75.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198:13-28.
- Santinha, P.J.M., Medale, F., Corazze, G., Gomes, E.F.S., 1999. Effects of the dietary protein:lipid ratio on growth and nutrient utilization in Gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Nutrition*, 5:147-156.
- Saurabh, S., Sahoo, P., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.*, 39:223-239.
- Schock, T.B., Duke, J., Goodson, A., Weldon, D., Brunson, J., Leffler, J.W., Bearden, D.W., 2013. Evaluation of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Health during a Superintensive Aquaculture Growout Using NMR-Based Metabolomics. *Plos One*, 8(3):1-12.
- Shakir, C., Lipton, A.P., Manilal, A., Sugathan, S., Selvin, J., 2014. Effect of Stocking Density on the Survival Rate and Growth Performance in *Penaeus monodon*. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 10:231-238.
- Soderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S., Soderhäll, K., 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 27:661-672.
- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C., Lin, M.N., 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 14:317-331.

- Sookying, D., Silva, F.S.D., Davis, D.A., Hanson, T.R., 2011. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. *Aquaculture*, 319:232-239.
- Suantika, G., Situmorang, M.L., Nurfathurahmi, A., Taufik, I., Aditiawati, P., Yusuf, N., Aulia, R., 2018. Application of indoor recirculation aquaculture system for white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) growout super intensive culture at low salinity condition. *J. Aquac. Res. Development*, 9(4):1-6.
- Suriya, M., Shanmugasundaram, S., Mayavu, P., 2016. Stocking density, Survival rate and Growth performance of *Litopenaeus vannamei* (Boon, 1931) in different cultured shrimp farms. *Int. J. Curr. Res. Biol. Med.*, 1(5):26-32.
- Suryavanshi, U., Sreepada, R.A., Ansari, Z.A., Nigam, S., Badesab, S., 2009. A study on biochemical changes in the penaeid shrimp, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) following exposure to sublethal doses of organochlorine pesticide (endosulfan). *Chemosphere*, 77(11):1540-1550.
- Şahin, K., Orhan, C., Yazlak, H., Tuzcu, M., Sahin, N., 2014. Lycopene improves activation of antioxidant system and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different stocking densities. *Aquaculture*, 430:133-138.
- Tahmasebi-Kohyani, A., Keyvanshokoh, S., Nematollahi, A., Mahmoudi, N., Pasha-Zanoosi, H., 2012. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. *Fish Physiol. Biochem.*, 38:431-440.
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., Tang, S., 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80:81-93.

- Tu, H.T., Silvestre, F., Bernard, A., Douny, C., Phuong, N.T., Tao, C.T., Rogister, G.M., Kestemont, P., 2008. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture*, 285:244-248.
- Türkmen, G. 2007a. Experimental commercial growout of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 59(1):52-57.
- Türkmen, G. 2007b. Pond culture of *Penaeus semisulcatus* and *Marsupenaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidae) on the west coast of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7:7-11.
- Van de Braak, K., 2002. Hemocytic defense in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Wageningen University. PhD Thesis, Wageningen Institute of Animal Science, The Netherlands, p: 159.
- Van Waarde, A.M., Henegouwen, B., De W-V.B., 1982. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in goldfish liver and muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comparative Biochemistry*, 72(1):133-136.
- Van Weerd, J.H., Komen, J., 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1):107-112.
- Wang, R., Lee, S.Y., Cerenius, L., Soderhäll, K., 2001. Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.*, 268:895-902.
- Wang, L.U., Chen, J.C., 2005. The immune response of White shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 18:269-278.
- Wang, F.I., Chen, J.C., 2006. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress. *Aquaculture*, 258:34-41.

- Wells, R.M., Pankhurst, N.W., 1999. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. *J. World Aquac. Soc.*, 30:276-284.
- Yao, C.L., Wu, C.G., Xiang, J.H., Li, F., Wang, Z.Y., Han, X., 2008. The lysosome and lysozyme response in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to *Vibrio anguillarum* and laminarin stimulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 363:124-129.
- Yarahmadi, P., Miandare, H.K., Fayaz, S., Caipang, C.M.A., 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress and immune related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48:43-53.
- Yıldız, H.Y., Benli, A.C., 2004. Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts, and hemolymph glucose. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 59(3):370-5.
- Yin, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 5:519-529.
- Zhang, Z.F., Shao, M., Ho Kang, K., 2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 21:159-169.
- Zhao, W., Wei, H., Jia, J., Lu, D., 1995. Effects of cadmium on transaminase activities and structures of tissues in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *J. Fish. China*, 19:21-27.
- Zhenyu, G., Chuanzhen, J., Jianhai, X., 2004. Heat-shock protein 70 expression in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during thermal and immune challenged stress. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 22(4):386-391.

Zhou, J., Wang, W.N., He, W.Y., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., Wang, A.L., 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. Journal of Invertebrate Pathology, 103:170-178.



ÖZGEŞMİŞ

18/06/1983 yılında Amasya’da doğdu. ilk, orta ve lise öğrenimini Amasya’da tamamladı. 2003 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi’nden 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlayarak 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılında aynı üniversitede doktora eğitimine başladı. 2011 yılında Tarım ve Orman Bakanlığında işe başladı. Halen Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü’ne bağlı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü’nde Yüksek Mühendis olarak görev yapmaktadır.