

# Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L., 1758) Larvalarında Nükleotid Katkılı Ürün Kullanımının Gelişime Etkisi

Erkan Can

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, İzmir, Türkiye  
\*E mail: ecanengineer@hotmail.com

**Abstract:** *The dietary nucleotide effect on the growth of sea bass (Dicentrarchus labrax, L., 1758) larvae.* In this study, it is investigated the dietary nucleotides (DNA and RNA) effects on the growth and survival rate of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) at nursery and adaptation stage. The treatments had started day 40 of the larvae and finished the day 85, the effect on the growth of larvae of the product was observed up to day 100. As a result of this study, it was determined that if groups were applied dietary nucleotides are investigated from growth seeing. Length increase was no differences ( $p>0.05$ ), but weight increase and survival rates were differences ( $p<0.05$ ).

**Key Words:** Sea bass, RNA, DNA, nucleotides and larval growth.

**Özet:** Bu çalışmada, balık üretiminde kullanılmak üzere geliştirilen RNA ve DNA nükleotidleri katkılı ürün kullanımının levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balıklarında sörvaj ve adaptasyon dönemlerindeki gelişim ve yaşama oranları üzerine etkisi araştırılmıştır. Denemeler karma yeme geçiş döneminde 40. günde başlamış 45 gün sürmüştür. 85. günde uygulama sonlandırılmış, 100. güne kadar gelişime etkisi gözlenmiştir. Sonuç olarak nükleotid katkısı yapılan gruplar gelişim yönünden incelendiğinde total boy artışının farklılık göstermediği ( $p>0.05$ ), bununla beraber canlı ağırlık artışında ve hayatta kalma oranlarında farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Levrek, RNA, DNA, nükleotid, larval gelişim.

## Giriş

Deniz balıkları üretim sektöründe artan rekabet balık üreten firmaları verimliliği artırabilmek için yeni fonksiyonel etki maddeleri aramaya yönlendirmiştir. Ülkemizde yaygın olarak üretilen levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balıklarının larval dönemlerinde besleme üretim kalitesini ve kantitesini etkileyen en önemli kriterlerden biri olduğundan yem içinde larval performansı artırıcı ürünlerin katkı maddesi olarak kullanımı üreticilerin önemle üzerinde durduğu konular arasında yer almaktadır.

Akuakültürde farklı balık türlerinde yeme nükleotid ilavesi ile yapılan bir çok çalışmada patojenlere karşı immün sistemin güçlendirildiği, gelişim oranının artırıldığı ve mortalitenin azaltıldığı bildirilmiş olup (Ramadan ve Atef, 1991; Ramadan ve diğ., 1994; Adamek ve diğ., 1996; Burrells ve diğ., 2001a; Burrells ve diğ., 2001b; Sakai ve diğ., 2001; Leonardi ve diğ., 2003; Li ve diğ., 2004a,b) son yıllarda bu konu ile ilgili çalışmalar artmış ve DNA ve RNA nükleotidleri içeren ürünler, C vitamini,  $\beta$ -glucan, probiyotikler ve prebiyotikler gibi biyolojik performansı artırıcı katkı maddeleri arasına girmiştir (Adamek 1996; Castro at al., 1999; Saka ve diğ., 2002).

Hücre içindeki nükleotidlerin üretimi hem zaman hem de enerji gerektirmektedir. Çok komplike bir proses olan hücredeki pürinlerin sentezi farklı aminoasitlerde başlamak üzere 14 farklı biyokimyasal aşamayı içerir. Nükleotidlerin oral olarak ilave edilmesi, vücuttaki hücre bölünmesi için gerekli olan zamanı ve enerjiyi azaltabilmektedir (Carver ve Walker,

1995; Cosgrove, 1998).

Günümüze kadar hücrelerin, nükleotid ihtiyaçlarını "De Novo Sentezi" ile karşılayabildikleri düşünülürken, yapılan yeni çalışmalar çoğu dokunun, karaciğer hariç nükleotid ihtiyacını sadece De Novo sentezi ile değil aynı zamanda Salvage Pathway ile de karşıladığını göstermiştir (Rudolph, 1994; Carver ve Walker, 1995; Grimble ve Westwood, 2000a). Ayrıca bağışıklık sisteminin bazı hücreleri, kemik iliği hücreleri, lenfositler ve eritrositler pürinleri sentez etme yeteneğine sahip değildir. Bunun yanı sıra diğer dokular örneğin, bağırsak mukozası hücreleri tek başlarına pürin ihtiyacını karşılayacak derecede üretmezler (Lopez-Navarro ve diğ., 1995).

Bu çalışmada, nükleotid katkılı Akuagen ürününün, levrek balıklarının canlı yemden toz yeme geçiş ve adaptasyon dönemlerindeki (40-100 gün) gelişimlerine, yaşama oranlarına ve bağışıklık sistemlerine etkisi araştırılmıştır. Kullanılan ürün bazı kuluçkahanelerde gelişimi destekleyici yem katkı maddesi olarak kullanılmakta olup deneme aşamasındadır.

## Materyal ve Yöntem

Çalışma, Muğla'nın Yalıkavak ilçesinde bulunan özel bir larva üretim tesisinde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) yumurtaları İzmir iline bağlı Şakran ilçesinde bulunan özel bir kuluçkahaneden temin edilmiştir.

**Larval Gelişim:** Larva ünitesinde kapalı devre sistemde 4 m<sup>3</sup>'lük larva tankları (silindirik – konik) kullanılmıştır. Yumurtalar 400'er gr (100 larva/lt) olmak üzere 4 m<sup>3</sup>'lük 6 ayrı polyester tanka yerleştirilmiş olan 100'er lt'lik (500 µ plankton bezi ile çevrelenmiş) polyester inkübatörlere konulmuştur. 14 °C su sıcaklığında inkübe edilmiş ve yumurtadan çıkan larvalar bu 4 m<sup>3</sup>'lük silindirik-konik tanklara aktarılmıştır.

Larvaların beslenmesinde canlı yem olarak *Artemia* sp. kullanılmıştır. Kullanılan *Artemia* sp. (RH *Artemia* Cysts); Great Salt Lake-ABD orijinli olup, çatlatma ve zenginleştirme işlemleri, işletme bünyesinde bulunan 2 m<sup>3</sup>'lük polyester tanklarda yapılmıştır.

**Karma Yeme Geçiş ve Adaptasyon:** Larva ünitesinde 30. güne kadar getirilen larvalar volumetrik sayım yöntemiyle (Freddi, 1985) farklı 18 m<sup>3</sup>'lük tanklara aktarılmış ve 6 adet uygulama tankı oluşturulmuştur. Denemelere karma yeme geçiş döneminde başlanılmıştır. Günlük karma yem miktarları toz yeme geçiş protokolüne göre hazırlanmış olup deneme süresinin ilk 6 günü, (40. ve 51. günler arası) tank başına 200 gr, bunu izleyen 4 gün boyunca 400 gr, sonra 7 gün süresince (56. ve 62. günler arası) 800 gr, en son olarak da 5 gün boyunca 1200 gr verilmiştir. Bu günden sonra balıklar canlı ağırlığa göre hesaplanan yemlerle beslemeye devam edilmiştir. Aynı zamanda 65. günden sonra da canlı yem kesilmiş ve yalnız karma yemle beslemeye devam edilmiştir. Karma yem olarak, İNVE'den; NRD 2/3 (150-300 µ), NRD 2/4 (200-400 µ), NRD 3/5 (300-500 µ), NRD 5/8 (500-800 µ), Epac Alfa 4 (800-1200 µ) kullanılmıştır.

İmmünostümülan ürün olarak Aquagen (NOVARTIS-Aqua Health Ltd., Charlottetown, Canada) kullanılmıştır. Aquagen, *Saccharomyces cerevisia*'nın özel bir işlemle geçirilerek özütünün çıkarılması ile elde edilmiş bir ürün olup, özgün organik asitler, nükleotidler ve prekursorları içermektedir ( maya özütü; *S. Cerevisia*'dan gelen RNA fraksiyonları, nükleotidler, organik asitler: %35, bira mayası: %65). Ürün %40,91 (min. %40) ham protein, >%0,1 ham yağ, %0,95 ham selüloz, %5,41 ham kül, %4,00 (<%11) nem içermektedir.

Deneme gruplarına, 40-85 günleri arasında 45 gün süreyle karma yemle beraber 2 gr/kg yem dozuyla üretici firma tarafından önerilen dozajla uygulama yapılmıştır. Tüm gruplarda 56. günde canlı yem (*Artemia* sp.) ile besleme sonlandırılmış, tamamen karma yeme geçilmiştir. 73. günlerinde ayrı ayrı 25 m<sup>3</sup>'lük 6 tanka aktarılmıştır. 80. günlerde tüm gruplarda deformasyon tipi ve oranları tespit edilerek ayıklama işlemleri yapılmıştır. 89-90. günlerde de TPS Fish Counter (balık sayma makinesi) ile sayılmıştır. 101. günlerinde ise bu balıkların tamamı işletmenin kafes tesislerine gönderilmiştir.

Yemleme 18 m<sup>3</sup> tanklarda sürdürülen denemeler süresince 15 saat/gün olarak otomatik yemliklerle ve elle (yarım saat arayla) yapılmıştır. 25 m<sup>3</sup> tanklarda sürdürülen çalışmalarda ise yemleme sadece manuel olarak 14 saat/gün süre ile yapılmıştır.

Çalışmanın 75. gününde, deney ve kontrol tanklarından alınan balık örnekleri otoklavda (110 °C'de 1 saat ve 1.5 atm

basıncında) sterilize edilmiş 2 lt'lik cam şişelerin içerisine konularak ve ağız folyo ile kapatıldıktan sonra, etrafı buzlarla kaplanmış bir kova ile laboratuvara götürülmüştür. Balıkların karaciğer, dalak ve böbreklerinden öze ile TSA besiyerine (Triptic soy agar), TCBS besiyerine (Tiyosülfat citrat bile salt sucroz agar) ve CA besiyerine (Cytophaga agar) ekimler yapılmıştır. 24—72 saat 21°C de inkubasyondan sonra petrilere koloniler oluşmuştur. Genel besiyeri olarak kullanılan TSA da oluşan kolonilerin toplamı total bakteri olarak, *Vibrio* selektif besiyeri olarak kullanılan TCBS agarda üreyen bakteriler *Vibrio* sp. olarak, *Flexibacter* için selektif besiyeri olan CA üreyen kolonilerde *Flexibacter* sp. olarak değerlendirilmiştir.

Uygulamada, stoklama koşulları yoğun olduğundan oksijen taşları yardımı ile suyun oksijenlendirilmesi sağlanmıştır. Bütün çalışma tanklarında, 40. günden itibaren, 5 gün boyunca % 20 su yenilenmesi, bunu izleyen 5 gün süresince % 25 su yenilenmesi ve daha sonra % 30 su yenilenmesi sağlanmıştır. Metamorfoz tamamlandıktan sonra su yenilenmesi tedrici olarak artırılmış ve % 100'e çıkılmıştır. Işıklandırmada florasana lambalar kullanılmış ve tank yüzeylerinde ışık şiddeti 400 lüks olarak ayarlanmıştır. Sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa sifon yapılmış böylelikle ölü miktarları kaydedilmiştir. Oksijenler oksimetre ile 4 saat ara ile ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Sıcaklık, dijital bir termometre ile, tuzluluk; refraktometre ile pH; dijital bir pH metre ile ve amonyak ve nitrit; dijital bir amonyak metre ile günlük olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Denemenin başlangıcında ve sonunda, ortalama ağırlık ve total boy tespit etmek amacı ile her tanktan, rasgele olmak üzere 1000'er adet örnek alınmıştır. Ortalama ağırlıklar 0,01 mg hassasiyetli bir dijital terazi ile, uzunluklar ise milimetrik okülerle tespit edilmiş ve kaydedilmiştir. Deneme sonunda balıkların sayıları balık sayma makinesi ile tespit edilmiştir. Bu sayımlardan çıkan sonuçlara, deneme süresince ölen balıkların sayıları eklenerek deneme başlangıcındaki balık adetleri bulunmuş ve yaşama oranları tespit edilmiştir.

**İstatistiksel Analizler:** Yaşama oranları arasındaki farklılığın önemi Fisher'in Ki Kare testi ile, gelişim arasındaki farklılığın önemi ise ANOVA'yı izleyen Tukey testi ile saptanmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında SPSS 11.0 programı kullanılmıştır.

## Bulgular

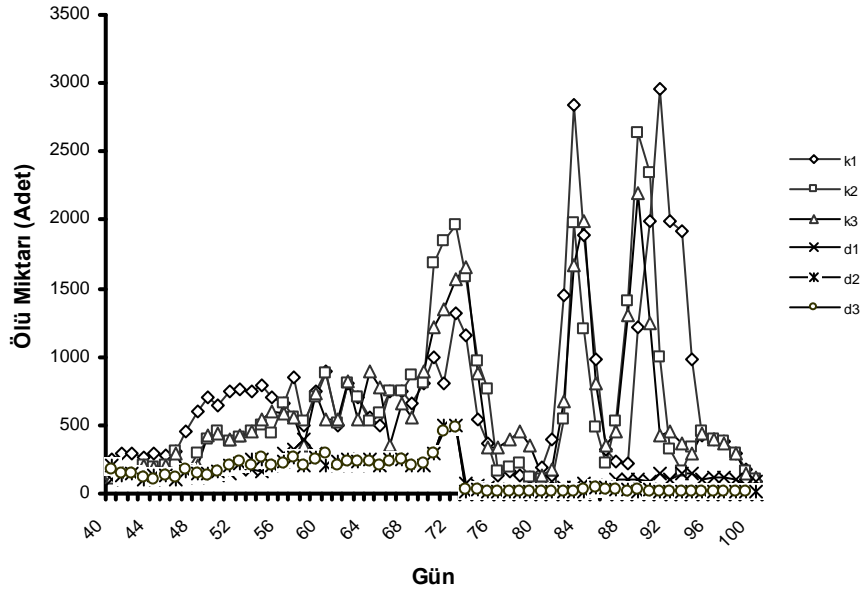
Denemede kullanılan su ortamına ait parametrelerde deney ve kontrol grupları arasında farklılık görülmemiş olup (p<0.05), levrek larval yetiştiriciliği için istenilen kriterler sağlanmıştır.

Çalışmanın (larvaların 101. yaşı) sonucunda ağırlıklar kontrol gruplarında 2.10±0.15 gr, deney gruplarında ise 2.75±0.13 gr olarak bulunmuştur. Bu bulgulara göre deney ve kontrol grupları arasında ağırlık artışı bakımından farklılık görülmüş olup (p<0.05) denemelerin başlangıcı ve sonucu elde edilen ortalamalar Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Deneme süresince ölçülen larva uzunlukları ise deney ve kontrol grupları arasında önemli bulunmamış ( $p>0.05$ ) olup başlangıç ve sonuçtaki larva total boyları da ağırlık ilişkileri ile birlikte Çizelge 1'de verilmiştir. Çalışma sürecince deney gruplarında metamorfoz kontrol gruplarına göre daha az kayıpla tamamlanmıştır ( $p<0.05$ ) (Şekil 1).

**Tablo 1.** Deney ve kontrol gruplarındaki gelişim sonuçlarının karşılaştırılması.

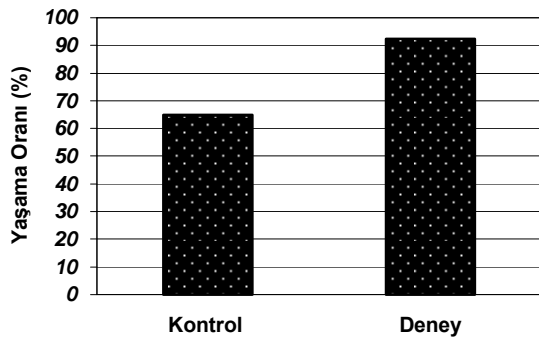
Ölçümler (Xort±Se)		Kontrol	Deney
Total Ağırlık (gr)	Başlangıç	0.019±0.11	0.019±0.09
	Final	2,10±0.15	2,75±0.13
Total Boy (mm)	Başlangıç	14,93 ± 1,02	14,96 ± 0,96
	Final	49,60 ± 3,3	54,60 ± 2,54



**Şekil 1.** Denemeler süresince deney ve kontrol gruplarından alınan günlük ölü miktarları.

Kontrol grubunda yaşama oranları K1: % 61.46, K2: % 65.73, K3: % 67.59 bulunmuş, deney gruplarında ise bu değerler D1: % 91.61, D2: % 92.88 ve D3: % 92.96 olarak saptanmıştır. Buna göre yaşama oranı Kontrol grubu için % 64.92 ve Deney grubu için % 92.48 olarak kaydedilmiş olup gruplar arasındaki yaşama oranlarının farklılığı önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 2).

gözlenmiş, manüplasyon sonunda kontrol gruplarında enfeksiyon görülmesine rağmen, deney grupları bu enfeksiyona yakalanmamıştır. Laboratuara gönderilen örneklerden kontrol gruplarında *Flexibacter* sp. teşhisi konulmuş, deney gruplarında herhangi bir patojene rastlanmamıştır.



**Şekil 2.** Deney ve kontrol gruplarındaki yaşama oranlarının karşılaştırılması.

Kontrol gruplarında en akut ölümler balıkların deforme olanlarının ayıklanmasından sonra olmuştur. Seleksiyon sonucu deneme gruplarında kontrole göre daha az kayıp

## Tartışma ve Sonuç

Balıklarda nükleotid katkılı yem diyetlerinin kullanılmasının en önemli faydalarından birisi normal akuakültür koşullarında ortaya çıkan stres faktörleriyle (türe özgü gelişim safhaları, manipülasyonlar, su kalitesi, stok yoğunluğu gibi) ortaya çıkabilen olumsuzlukların en az kayıpla atlatılabilmesidir (Burrells et al., 2001b; Low et al., 2003). Bu çalışmada da metamorfoz aşamasında kontrol gruplarında büyük kayıplar görülürken, deney gruplarında çok az kayıpla tamamlanmıştır. Ürün, metamorfozu tamamlama aşamasında larvanın direncini artırarak mortaliteyi düşürmüştür, yaşama oranını artırmış ve aynı zamanda gelişimi hızlandırmıştır. Yapılan manipülasyonlarda (deforme balıkların ayıklanması ve sayma işlemleri) da yine kontrol gruplarında enfeksiyon başlamış, deneme gruplarında problem görülmemiştir. Bu verilerin ışığında ürün manipülasyonlara karşı balığın direncini artırmış ve enfeksiyona yakalanmasını engellemiştir. Burada immün

sistemi geliştirici bir etkisi olmuştur. Mayaların hücre duvarlarından üretilen nükleotidlerle yapılan balık beslemesi ile mortalitenin azaldığı ve spesifik olmayan immün sistemin geliştiği Robertson ve diğ., (1990) ; Raa ve diğ., (1992); Ellis (1999) ile Burrells ve diğ., (2001a) tarafından da bildirilmiş olup bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Larvaların gelişiminde, total boy olarak karşılaştırmalara gidildiğinde deney gruplarında kontrol gruplarına oranla daha iyi sonuçlar alınmış bununla beraber istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Ancak yetiştiricilik açısından düşünüldüğünde balığın gelişim performansı, fizikokimyasal parametrelere bağlı olduğu gibi beslemeye de bağlı olarak değişmektedir. Çalışmada kullanılan ürünün kullanım süresi artırıldığında önemli derecede uzunluk artışı olabilir. Ağırlık artışı bakımından ise deney gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede olumlu sonuçlar elde edilmiş ve ürün levrek larvalarının gelişimini hızlandırmıştır. Ascogen ve Optimun gibi nükleotid katkılı benzer ürünlerle yapılan çalışmalarda da *Oncorhynchus mykiss* ve *Salmo salar* balıklarının gelişimlerinde olumlu sonuçlar elde edilmiş olup (Adamek ve diğ., 1996; Burrells ve diğ., 2001b) bu çalışma ile paralellik göstermiştir. Başka bir çalışmada, *Tilapia* juvenillerinde yapılan Akuagen uygulamalarında gelişim bakımından deney ve kontrol grupları arasında farklılık görülmemiştir (Hambal ve diğ., 2000). Bununla beraber denemelerin 16 gr *Tilapia* juvenillerinde başlamış olması ve bu aşamalardan sonra balıklarda hastalık yapıcı etkenlere rastlanmamış olması deneme ve kontrol gruplarında farklılığın saptanamamış olmasına bağlanabilir. Bizim çalışmamız stok yoğunluğunun yüksek tutulduğu larval dönemlerde yapıldığından metamorfozla ortaya çıkan stres koşullarında, ortamda artış gösteren patojen mikroorganizmalar nedeniyle ve yapılan manipülasyonların etkisiyle deney gruplarında Akuagen'in olumlu etkisi açık bir şekilde tespit edilmiştir. Ortamda patojen varlığının balıkların gelişiminde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından da desteklenmektedir (Vadstein, 1997; Queiroz ve Boyd, 1998; Austin, 1998).

Bu çalışmada levreklerin sörvaj ve adaptasyon dönemlerinde patojen mikroorganizmaların ve stres faktörlerinin gelişimi direkt olarak etkilediği tespit edilmiştir. İmmün sistemin geliştirilerek balıkların patojen mikroorganizmalara karşı direncinin artırılması aynı zamanda gelişimin hızlandırılması üretim kalitesi ve kantitesini direkt olarak etkileyen faktörler arasında yer aldığından biyolojik performansı artırıcı bu tür ürünlerin kullanımı akuakültür üretimleri için büyük önem taşımaktadır. Gelecekte uygun nükleotid kaynaklarının bulunmasının yanı sıra, uygun dozaj kullanımı ve uygulama teknikleri ile uygulama süreçleri türlere özgü üretim koşullarında önemli hale gelebilir.

## Kaynakça

Adamek, Z., J. Hamackova, J. Kouril, R. Vachta, I. Stibranyiova. 1996. Effect of Ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wels (*Silurus glanis*) under conditions of intensive culture. *Krmiva (Zagreb)* 38, 11–20.

Austin, B., 1998. Biotechnology and diagnosis and control of fish pathogens. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 1-2.

Burrells, C., 2001. Nucleotides aid dietary louse control. *Fish Farmer* 24, 62.

Burrells, C., P.D. William, P.F. Forno. 2001a. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. *Aquaculture* 199, 159–169.

Burrells, C., P.D. William, P.J. Southage, S.L. Wadsworth. 2001b. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. *Aquaculture* 199, 171–184.

Carver, J.D., W.A. Walker. 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 6, 58–72.

Castro, R., N. Couso, A. Obach and J. Lamas, 1999. Effect of different  $\beta$ -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology* (1999) 9, 529–541.

Cosgrove, M., 1998. Nucleotides. *Nutrition* 14, 748–751.

Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 291–308.

Freddi, A. 1985. Sea Bass (*D.labrax*) and Gilthead Sea Bream (*S. aurata*) larval rearing. F. A. O. Project Regional Mediterranean de Development de L' aquaculture, pp: 62.

Grimble, G.K., O.M.R. Westwood. 2000a. Nucleotides. In: German, J.B., Keen, C.L. (Eds.), *Nutrition and Immunology: Principles and Practice*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, pp. 135–144.

Hambal, H.H., M.S. Kahanudin, H.A. Mohd-Amir, and M.A. Uraya. 2000. Effect Of the Feed-Additive 'Aquagen' On The Growth of Red Tilapia Cultured in the Rain-fed Water Recirculating System.

Li, P., D.H. Lewis, D.M. Gatlin III. 2004a. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*, *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 561–569.

Li, P., X. Wang, D.M. Gatlin III. 2004b. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*, *M. saxatilis*), and elevated levamisole in vitro impairs macrophage function. *Aquac. Res.* 35, 1380–1383.

Leonardi, M., A.M. Sandino, A. Klempau. 2003. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23, 52–59.

Lo'pez-Navarro, A.T., A. Gil, A. Sa'nchez-Pozo. 1995. Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. *J. Nutr.* 125, 2090–2095.

Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., Secombes, C.J., 2003. Expression of immune genes in turbot *Scophthalmus maximus* fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture* 221, 23–40.

Queiroz, J. F. and C.E. Boyd. 1998. Effect of bacterial inoculum in cannal catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 67-73.

Raa, J., G. Rørstad, R. Engstad, B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Sharif, M.I., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. Eds., *Diseases in Asian Aquaculture*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 39–50.

Ramadan, A., Atef, M., 1991. Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen bSQ) on growth rate of tilapia fish. *Acta Vet. Scand.* 87, S304–S306.

Ramadan, A., N.A. Afifi, M. Moustafa, A.M. Samy. 1994. The effect of ascogen on the immune response of tilapia fish to *Aeromonas hydrophila* vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 159–165.

Robertsen, B., G. Rørstad, R. Engstad, J. Raa. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.* 13, 391–400.

Rudolph, F.B., 1994. The biochemistry and physiology of nucleotides. *J. Nutr.* 124, 124S–127S.

Saka, Ş., K. Firat, and E. Can, 2002. The effect of probiotic product on growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) larvae in weaning period. *Anadolu University Journal of Science and Tecnology*. Vol.: 3, No:2:251-256.

Sakai, M., K. Taniguchi, K. Mamoto, H. Ogawa, M. Tabata. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.* 24, 433–438.

Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture; possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 401-417.