

Otolitten Yaş Tayininde Kesit Alma Tekniği

Gülnur Metin, H. Tuncay Kınacıgil

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü. 35100,
Bornova/İzmir, Türkiye

Abstract: *The Sectioning Technique in Age Determination by Otolith.* Different techniques could be used in age determination by otoliths. Direct observation, dying, break-and-burn, acidification and sectioning are the most commonly used methods. Sectioning is the widely accepted technique among the mentioned methods. This is appropriate for adult individuals and particularly for thick otoliths that we difficult to examine under stereoscopic microscope. Additionally, dying and acidification process gives more precise results in age determinations. In the present study, it is aimed to give detailed information on sectioning method, which is widely accepted method.

Key Words: Otolith, sectioning, age determination.

Özet: Otolitten yaş tayini değişik teknikler kullanılarak yapılabilir. Stereoskopik mikroskop altında direkt gözlem, boyama, kırma-yakma, asitlendirme ve kesit alma teknikleri yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bunlar içinde pek çok araştırmacı tarafından kesit alma tekniği geniş ölçüde kullanılmaktadır. Bu teknik özellikle ergin bireylerde ve stereoskopik mikroskop altında yeterli görülemeyen kalın otolitlerin değerlendirilmesinde çok iyi sonuç vermektedir. Ayrıca kesit alınan otolit yüzeyine asitlendirme ve boyama işlemleri uygulanarak, yaş değerlendirmelerinin daha sağlıklı yapılma imkanı sağlanmaktadır. Bu çalışmada, otolitten yaş tayininde önemli bir metot olan kesit alma tekniği üzerine detaylı bilgi verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Otolit, kesit alma , yaş tayini.

Giriş

Balıklarda yaş tayini geniş ölçüde sagittal otolitlerden yapılmaktadır. Mevsimsel olarak gelişen opak (ışığın geçmediği, hızlı büyüme halkası) yada hyalin (ışığın geçtiği yavaş, büyüme halkası) halkaların sayılmasına dayanan yaş tayini çok çeşitli teknikler kullanılarak yapılabilmektedir. Doğrudan mikroskop altında yapılan gözlemlerde küçük bireylerin otolitleri rahatlıkla incelenebilir. Fakat ergin bireylerin yanında, Gadidae türleri ile bazı Sparidae türlerinde CaCO₃ birikiminin fazla olması nedeni ile otolitlerden yaş tayini yapabilmek güçleşmektedir. Bu nedenden dolayı araştırmacılar yeni tekniklerin arayışı içine girmişlerdir. Bu tekniklerin başında, kırma-yakma

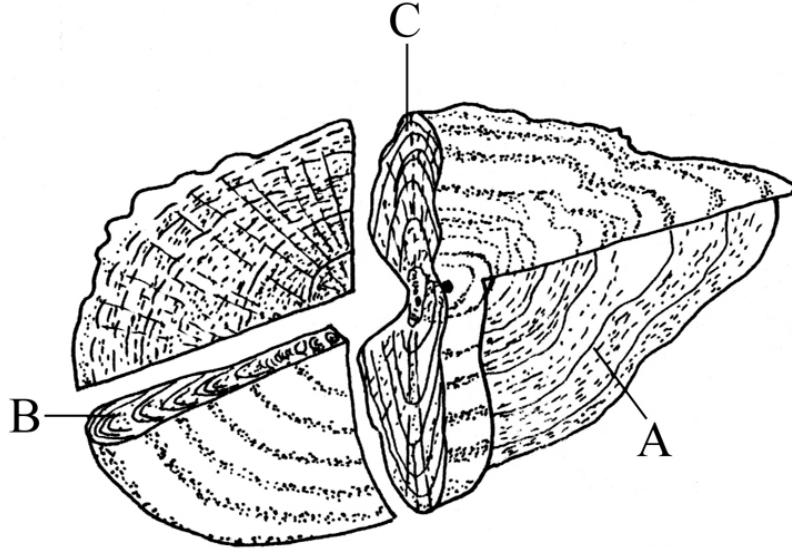
(Christensen, 1964; Aprahamian, 1987) asitlendirme (Secor ve diğ., 1991), boyama (Bouain ve Siau, 1988; Francillan ve Meunier, 1985), ve kesit alma teknikleri gelmektedir. Son teknolojik ilerlemeler otolit, pul gibi kalsifiye yapı gelişimlerinin doğru bir şekilde ölçülmesini mümkün ve nisbeten kolay hale getirmiştir (Casselman, 1990). Bunun için tetrasiklin ya da floresan özellik gösterecek boyalar, Acetazolamid gibi kimyasallar kullanılarak otolitler markalanmıştır (Brothers, 1990; Wilson et al. 1987; Hettler, 1984).

Bu yöntemler içerisinde çoğunlukla kesit alma tekniği uygulanmaktadır. Rauck (1972), yılan balığı otolitlerinin ince olarak parlatılmış kesitler halinde hazırlandığında kolaylıkla okunabildiğini

kaydetmiştir. Araştırmacı, kesit makinasına otolitin yerleştirilmesi güçlüğünden dolayı otolitin polyester içine gömülebileceğini belirtmiştir. Kesit alma tekniği genel olarak, saydam bir kalıp içindeki otolitten, nukleusunun içinde bulunduğu bir kesit parçası alınarak mikroskop altında gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknik sayesinde yaş halkaları daha iyi gözlenerek, balığın yaşı ile ilgili değerlendirmeler daha sağlıklı bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca kesit parça

üzerinde çeşitli boyama teknikleri uygulanarak değerlendirmeler güçlendirilebilmektedir. Yapılmış olan bu çalışmada balıklarda yaş tayininde önemli bir yeri olan otolitten kesit alma tekniği üzerine detaylı bilgiler derlenmeye çalışılmıştır.

Kesit Alma Tekniği: Otolitlerden kesit alma işlemi antero-posterior, sagittal, transversal (dorso ventral) düzlemlerinde yapılabilir (Morales-Nin, 1987) (Şekil 1).



Şekil 1. Otolitten kesit alma düzlemleri. A: sagittal, B: antero-posterior, C: transversal (dorso-ventral), (Pannella 1980)

Kesit alma tekniği şu aşamalardan meydana gelir.

- Kalıp hazırlama
- Kesit alma
- Zımparalama
- Parlatma
- Gözlem

Kalıp hazırlama: Otolitten kesit alma işleminin kolay bir şekilde yapılabilmesi için polyester yada epoksi kullanılabilir.

Polyester genellikle ışık mikroskobu gözlemlerinde, epoksi ise polyestere göre daha saydam olması nedeniyle elektron mikroskobu gözlemlerinde kullanılmaktadır. Polyester kalıplar için SODY 33 tip polyester ve katılaşmayı sağlayan katalizör kullanılabilir. Epoksi için ise Araldite 2020 kullanılabilir. Polyester karışım otolit büyüklüğüne göre değişen boyutlardaki kalıplara dökülür. Kalıplar silikon materyalden yapılabilir. Bu tip malzeme, kalıp içinden polyesterin

kolayca çıkarılmasına imkan verebilecek yumuşaklıktadır.

Polyester ve epoksi karışım oranı, kullanılacak kalıbın boyutuna göre seçilir. Tablo 1 ve 2’de Fransa’nın IFREMER araştırma kurumu LASAA (Laboratoire de Scélerochronologie des Animaux Aquatiques) tarafından uygulanan polyester ve epoksi karışım oranları verilmektedir.

Tablo 1. Polyester karışım oranları

Polyester hacmi (ml)	Polyester ağırlığı (gr)	Katalizör damla sayısı	
		%1 için	%2 için
91	100	20	40
45.5	50	10	20
23.3	25	5	10
11.5	12.5	2.5	5
9.1	10	2	4

Tablo 2. Epoksi karışım oranları

Epoksi ağırlığı (gr)	Katalizör (gr)	Toplam (gr)
100	30	130
76.9	23.1	100
50	15	65
46.2	13.8	60
38.5	11.5	50
25	7.5	32.5
20	6	26
12	3.6	15.6

Polyester karışım plastik bir kap içinde ve plastik bir karıştırıcı kullanılarak ve aspiratör altında hazırlanmalıdır. Katalizörün polyesterle homojen bir şekilde karışması gereklidir. Karışım yaklaşık 1 cm kalınlığında silikon kalıplara dökülür ve donması için 35°C’de etüvde yaklaşık 20 dk. bekletilir. Donan polyester üzerine otolitler iç bükey tarafı üstte gelecek şekilde yerleştirilir. Ters yapıldığında hava kabarcığı kalabilir ve kalıp istenen kalitede olmaz. Otolitleri yerleştirilmesinden sonra daha önce hazırlanan oranda polyester karışım

hazırlanarak otolitler üzerine ilave edilir ve etüvde donması için bekletilir.

Polyester karışım içine renklendirici koyularak da değişik kalıplar elde etmek mümkündür. İlk kez Bedford (1977) tarafından geliştirilen bu yöntemde Polyester karışım içine siyah renk maddesi ilave edilmekte ve bunlardan çok ince film kesitler alınmaktadır. Tablo 3’de, 360mm x 48mm ebatlarındaki kalıp için uygulanacak olan polyester karışım oranları verilmiştir. Polyesterin yanında kaynaştırıcı olarak Morsodyne 204, katılaşmayı sağlayan katalizör içine Organik peroksit 104 ve siyah renk maddesi kullanılmaktadır.

Epoksi kalıp hazırlığı da polyesterde olduğu gibidir. Ancak epoksinin düzgün olması için katalizör ile aralditin en az 5 dk. süre ile karıştırılması gereklidir. Epoksi hazırlanıp 1 cm kalınlığında kalıba dökülerek 1 gece etüvde bekletilir. Daha sonra otolit, polyesterde olduğu gibi yerleştirilerek tekrar epoksi ilave edilir ve 2 gece havalandırılmalı etüv içinde bekletilir. Polyester epoksiye göre daha hızlı donabilmektedir. Bu nedenle epoksi karışımın 2 gece bekletilmesi uygundur.

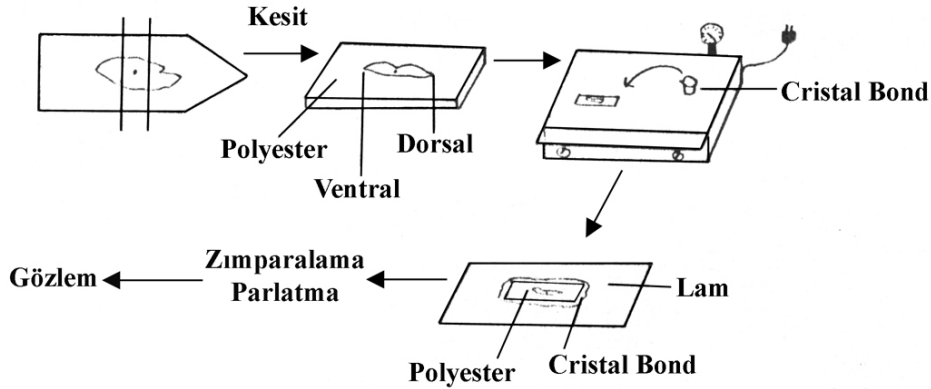
Kesit Alma: Etüvde bekletilip sertleşen otolitlere kesit alma işlemi uygulanır. Kesit almadan önce lup altında nukleusun yerinin belirlenip işaretlenmesi gerekir. Aksi taktirde kesitin nukleustan düzgün bir şekilde geçmesi zorlaşır. Epoksi ya da polyesteri kesebilecek çeşitli kesit makineleri bulunmaktadır. Bunlar içinde çok ince kesitler için 0-5000 tur arasında devir yapabilen hızlı devirli “İsomet 2000” ve normal kesitler için yavaş devirli “İsomet II-1180 Low Speed” kesit makinesi kullanılabilir. Bu tip kesit makinesi ile yaklaşık 100µ’luk kesitler elde etmek mümkündür. Polyester ya da epoksi kalıp içindeki otolit kesit makinesine düzgünce yerleştirilerek istenen düzlemde kesit parça alınır. Alınan kesit termoplastik yapıştırıcı

Cristal Bond 405 yardımı ile lam üzerine yapıştırılır. Cristal Bond oldukça saydam yapıda olup, oda sıcaklığında katı halde bulunur. 150°C’de ısıtıcı bir tabla üzerinde ağzı kapalı bir petri kabında eritilip spatula yardımı ile bir damla lam üzerine alınarak kesit parçanın lama yapışması sağlanır. Kesit parça direkt lam üzerine yapıştırılabileceği gibi lamla kesit preparatı arasına küçük bir cam parça koyularak da yapıştırma yapılabilir. Bu sayede preparata yükseklik kazandırılarak cilalama işleminin daha kolay yapılması sağlanır (Şekil 2). Siyah polyester kalıp içinde bulunan otolitlerden film kesitler

almak için 127 mm çapında 0.25mm kalınlıkta bıçağa sahip ve dakikada 2000 devir yapabilen kesit makinası kullanılabilir (Souplet ve Dufour, 1983).

Tablo 3. Renkli polyester karışım oranı (Souplet ve Dufour, 1983).

Madde	Oran
Kaynaştırıcı	5 damla
Polyester	90 gr
Renk maddesi	15 gr
Katalizör	4 cm ³



Şekil 2. Kesit alma tekniği aşamaları

Parlatma: Kesit alınan parçanın mikroskop altında net bir şekilde gözlenebilmesi için örneğin parlatılması gerekir. Parlatma işlemi nukleusun net bir şekilde görünebilmesine kadar devam ettirilir. Otolit üzerinde nukleusun muhtemel yeri “sulcus” kanalı takip edilerek tespit edilebilir (Şekil 3).

Parlatma iki aşamadan meydana gelir:

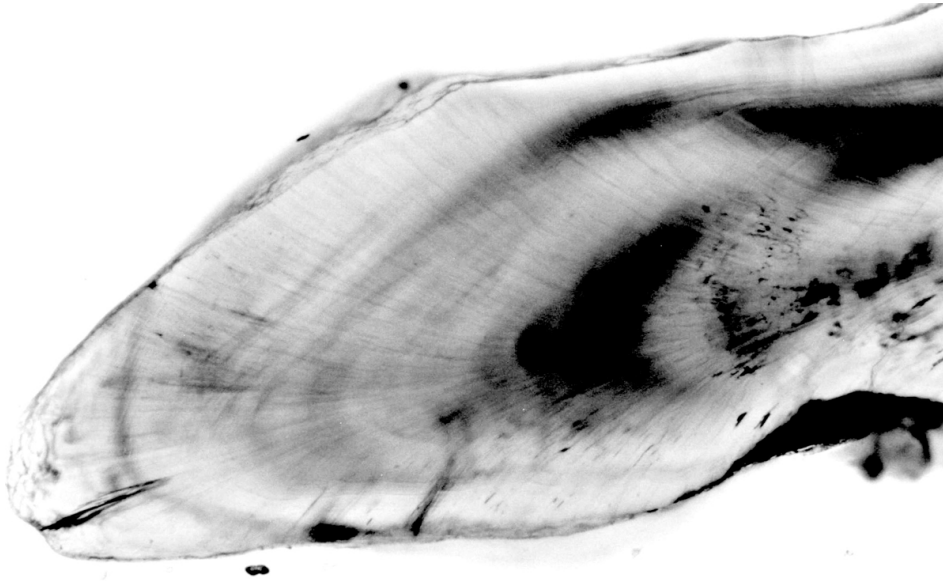
- Zımparalama
- Cilalama

Parlatmanın ilk aşaması zımparalama işlemi 400-800-1200 μ 'luk zımpara kağıtları

kullanılarak yapılır. 400 μ 'luk kağıttan başlayarak otolite zarar vermeden yavaş dairesel hareketlerle zımparalama yapılır. Bu işlemin rahat ve zarar vermeden yapılabilmesi için kağıt üzerine az miktarda su koyulur. Yeteri miktarda zımparalama yapıldıktan sonra cilalama aşamasına geçilir. Bunun için özel parlatma diskleri kullanılır. Cilalama üç farklı ölçüde ($\frac{1}{4}\mu$ - 1μ - 3μ) Alüminyum oksit pudrası kullanılarak kademeli şekilde yapılır. 3μ 'luk alüminyum oksit pudrası dökülmüş diskten başlayarak yavaş hareketlerle preparat disk üzerinde hareket ettirilir. Cilalamanın düzgün yapılıp yapılmadığı preparatın sürekli olarak

mikroskop altında gözlenmesi ile kontrol edilir. 3µ ve 1µ alimünyum oksit pudralı cilalamadan sonra en ince cilalama ¼µ'la gerçekleştirilir. Preparatın bir yüzünde nukleusun belirmeye başlaması ile bu yüzeyde parlatma işlemi bitirilerek preparat ters çevrilir ve diğer yüzeyde parlatma işlemine geçilir. Siyah polyester kalıpla hazırlanan örneklerde parlatma işlemi

uygulanmadan direkt mikroskop altında gözleme geçilebilir. Epoksi örneklerin zımparalama ve cilalama işlemi için özel makineler kullanılır. Makinenin döner tablasına yerleştirilen zımparalama ve cilalama diskleri üzerine örnek koyularak parlatma işleminin daha kolay ve düzgün yapılması sağlanır.



Şekil 3. Kıрма mercan (*Pagellus erythrinus* L. 1758) otolitinde transversal düzlemde alınmış kesit örneği, (2 yaş)

Gözlem

Kesit alınmış ve düzgün bir şekilde parlatılmış olan otolit örneği alttan ya da üstten aydınlatmalı ışık mikroskopunda incelenebilir. Mevsimsel oluşan halkalar açık ve koyu bantlar halinde özellikle sulcus acusticus bölgesinde net bir şekilde sayılabilir (Şekil 3).

Işık mikroskobu gözlemi, elektron mikroskobu gözlemlerine göre daha az hazırlığa ihtiyaç duyması açısından pratiktir ancak büyütme gücünün azlığı dezavantajdır (Brothers, 1987). Video

görüntüleme yöntemi görüntünün büyütülmesi, parlaklık ve kontrast değerinin artırılmasında yardımcı olur. Ancak çözünürlüğü arttıramaz. Video görüntüleme otomatik ve yarı otomatik imaj analiz sistemlerinin de bir elemanıdır. Video görüntüleri kolayca, video kasetlerinde saklanıp diğer araştırmacılarla paylaşılabilir. Elektron mikroskobu, çok daha yüksek büyütme ve çözünürlük verir. Özellikle ışık mikroskopunda fark edilmesi oldukça güç olan, kalınlığı 1µ'dan küçük halkaların gözlenmesinde etkilidir.

Sonuç

Kemikli balık türlerinin çeşitliliği, bütün türler için ortak bir inceleme metodu geliştirilmesini güçleştirir. Son yıllarda mikroyapısal ve kimyasal analizlerin gelişmesi ile otolitten yaş belirleme çalışmalarında da gelişmeler olmuştur (Brothers , 1987). Doğrudan gözlemde, özellikle ergin birey otolitlerinde ve kalın tabakalı otolitlerde yaş halkalarının görülebilmesi oldukça güçtür. Ayrıca kısa zamanda çok sayıda otolitin gözlenmesi zor ve yorucudur. Kesit alma tekniğinde, polyester karışımın döküldüğü kalıp boyutları büyütülerek çok sayıda otolitin aynı düzlemde sıralanması sağlanabilir. Özellikle büyük kalıplarda çok sayıda otolitten kesit alınması sayesinde kısa zamanda birçok otolit gözlenebilir. Brothers (1987), sagittal otolitte transvers ya da oblik kesit uygulamasının gelişim evrelerinin daha iyi gözlenmesi açısından uygun olduğunu belirtmiştir. Ayrıca yıllık gelişim bölgelerinin detaylı incelenmesi için gelişmiş görüntü analiz ekipmanları ve elektron mikroskobu analizi kullanılabilir (Casselman 1983, Ashford ve diğ., 1993). Kesit yüzeyleri üzerine, %5-7 EDTA (pH 7.2-7-6) ile asitlendirme işlemi uygulanarak gelişim bölgeleri belirginleştirilebilir (Secor ve diğ., 1992). Asitleme, düzgün parlatılmış otolit yüzeyinde uygulandığında büyüme zonları ve kesikli zonlar arasındaki farkın ortaya koyulmasında çok etkili olmaktadır (Secor ve diğ., 1991). Ayrıca gelişen bilgisayar teknolojisi, otolitlerden yararlanarak bilgisayar ortamında büyüme hesaplamasını mümkün kılmıştır. Hazırlanmış kesit preparatı bilgisayara bağlı mikroskopta gözlenerek özel hazırlanmış görüntü çözümleyici programlar (TNPC-Traitement Numerique de Pièces Calcifiées) yardımı ile balığın büyüme modeli ortaya koyulabilmektedir (Troadec, 1999).

Ülkemizde otolitten yaş tayini genellikle stereoskopik mikroskopta doğrudan gözlem tekniği ile yapılmaktadır. Bunun yanında kırma-yakma tekniğinde uygulanmaktadır. Polat ve Gümüş (1996), *Merlangius merlangus euxinus* Nord 1840, türünde kırma ve yakma tekniği denemişler ve yöntemin bu tür için iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Balıklarda yaş belirleme çalışmalarında ileri tekniklerin uygulanması, sonuçların daha iyi alınması açısından büyük önem taşımaktadır.

Teşekkür

Bu çalışmanın hazırlanmasında uygulama imkanı sağlayan Fransa'nın IFREMER araştırma merkezi, LASAA (Laboratoire de Sclérochronologie des Animaux Aquatiques) laboratuvarı araştırmacı ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Aprahamian, M.W., 1987. Use of the burning technique for age determination in eels (*Anguilla anguilla* L.) derived from the stocking of elvers. Fish.Res., 6: 93-96.
- Ashford, J.R., Robinson, K., White, M.G., 1993. A method for preparing large numbers of otolith sections for viewing by scanning electron microscope. ICES J. Mar. Sci., 50: 227-229.
- Bouain, A., Siau, Y., 1988. A new technique for staining fish otoliths for age determination. J. Fish Biol., 32: 977-978.
- Bedford, B.C., 1977. Further development of the technique of preparing thin sections of otoliths set in black polyester resin. C.I.E.M., CM. F:24, p.10.
- Brothers, E.B., 1990. Otolith marking. American Fisheries Society Symposium, 7:183-202.
- Brothers, E.B., 1987. Methodological approaches to the examination of otoliths in aging studies, p. 319-330. In R.C. Summerfelt and G.E. Hall ed. Age and Growth of Fish. Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Casselman, J.M., 1983. Age and growth

- assessment of fish from their calcified structures-techniques and tools. In E.D. Prince, I.M. Pulos (Ed.), proceeding of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fish: Tunas, billfish, and sharks, p. 1-17. NOAA Tech. Rep. NMFS 8.
- Casselman, J.M., 1990. Growth and relative size of calcified structures of fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119:673-688.
- Christensen, J.M., 1964. Burning of otoliths, a technique for age determination of Soles and other fish. *J. Cons. Inter. Explor. Mer*, 29: 73-81.
- Francillian, H., Meunier, F.J., 1985. Conservation et presentation des preparation colorees au Bleu Alcian et l'Alziarine. *Cybium*, 9:2, 121-126.
- Hettler, W.F., 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113: 370-373.
- Morales-Nin, B., 1987. Metodos de determinacion de la edad en los osteictios en base a estructuras de crecimiento. *Informes tecnicos de investigacion pesquera*, 143: 3-30.
- Pannella, G., 1980. Growth patterns in fish sagittae. Chapter 15, 519-560. In: Rhoads, d.c., Lutz, R.A., (Eds.), *Skeletal Growth of Aquatic Organisms*. Plenum press, New York.
- Polat, N., Gümüş, A., 1996. Ageing of whiting (*Merlangius merlangus euxinus*, Nord 1840) based on broken and burnt otolith. *Fisheries Research*, 28: 231-236.
- Rauck, G., 1975. A new technique of sawing otoliths. *ICES C.M. 1975/F: 23*, 1-5.
- Secor, D.H., Dean, J.M., Laban, E.H., 1991. Manual for otolith removal and preparation for microstructural examination. Electric Power Research Institut and the Belle W. Baruch Institut for Marine Biology and Coastal Research, 01: p.85.
- Secor, D.H., Dean, J.M., Laban, E.H., 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination, p.19-57. In D.K. Stevenson and S.E. Campana(ed.) *Otolith microstructure examination and analysis*. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117.
- Souplet, A., J-L., Dufour, 1983. Developpement des techniques de lecture des otolithes en coupes fines. *Repp. Techn. ISTPN*, 5: 1-6.
- Toadec, H., 1999. Computer assisted age reading. *European Fish Ageing Network Report 2*: p.32.
- Wilson, C.A., D.W. Beckman, J.M. Dean, 1987. Calcein as a flurescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116: 668-670.