

Canlı Yemlerin Radyoaktif Lipozom ile Markalanması

Kutsal Gamsız, Atilla G. Alpbaz

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye

Abstract: *Marking of live feeds by radioactive liposomes.* This study was done to introduce the radioactive marking technique that had been commonly used in larval feeding studies in the last years, by marking rotifer (*Brachionus plicatilis* Mülér, 1786) and Artemia (*Artemia salina* L., 1758) with radioactivity which were extensively used for larval feeding in aquaculture. In the study, liposomes having different concentrations of radioactive isotopes (^{14}C -Palmitik asit) were used to mark rotifer and artemia; and the effects of changes in radioactive isotope concentrations on the specific activity values of live feeds were investigated.

Key Words: Radioactive labeling, ^{14}C , artemia, rotifer, larval feeding.

Özet: Bu çalışma, son yıllarda larva besleme çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaya başlanan radyoaktif markalama tekniğini tanıtmak amacı ile, su ürünleri larva yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan rotifer (*Brachionus plicatilis* Mülér, 1786) ve artemianın (*Artemia salina* L., 1758) radyoaktif markalanması üzerine yapılmıştır. Çalışmada farklı oranda radyoaktif izotop (^{14}C -Palmitik asit) içeren lipozomlar, rotifer ve artemianın markalanmasında kullanılmış, radyoaktif izotop miktarındaki değişimlerin, canlı yemlerin spesifik aktivite miktarının üzerine etkileri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Radyoaktif markalama, ^{14}C , artemia, rotifer, larva besleme.

Giriş

Su ürünlerinin entansif üretim çalışmalarında ilk basamağı besleme ve yemleme çalışmaları almaktadır. İyi yetiştiriciliğin iyi besleme ile sağlanabileceği ilkesi artık tüm dünyada yaygın olarak kabul edilen bir düşünce tarzı haline gelmiştir (Korkut ve Hoşsu, 1998).

Balık larvası yetiştiriciliği çalışmalarında da büyümeyi, ürünün kalitesini ve özellikle larvaların yaşama oranını belirleyici en önemli etken beslemedir (Tandler, 1985; Kolkovski ve diğ., 1993). Bu yüzden larva yetiştiriciliği alanında son yıllarda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunu larva besleme çalışmaları oluşturmaktadır.

Larva besleme çalışmalarında biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır (Rice ve

diğ., 1994; Planas ve Cunha, 1999).

Larvaların besin ihtiyaçlarının tespitinde biyokimyasal analizlerden yararlanılmakta, ele alınan türlerin yumurtalarının, tükettikleri zooplanktonların besin madde analizleri yapılarak besin ihtiyaçları saptanmaktadır (Leibovitz ve diğ., 1987).

Larvaların sindirim organlarında üretilen enzimlerin çeşitleri, miktarları ve pH içeriklerinin tespiti ile larvaların hangi tür yemleri kullanabileceği üzerine yapılan çalışmalarda ise fizyolojik çalışmalardan yararlanılmaktadır. Fizyolojik çalışmalar *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki temel metod ile yapılmaktadır. *In vivo* denemelerde larvaların, yemlerin ve sindirim organlarının küçük olması sorunlara yol açtığından, son zamanlarda *in vitro* denemeler önem kazanmaya başlamıştır. Bu tür çalışmalarda balıklardan

izole edilen enzimlerin içine konan yemlerin bozunmaları ölçülerek, denemede kullanılacak yemin larva tarafından sindirilebilecek yapıda olup olmadığı tespit edilmektedir (Rust ve diğ., 1993; Alarcon ve diğ., 1999; Ronnestad ve diğ., 2001).

Larva besleme çalışmalarında kullanılan diğer bir yöntem de morfolojik incelemelerdir. Bu incelemeler ışık, tarayıcı elektron ve transmisyon elektron mikroskopları kullanılarak, histolojik ve histokimyasal yöntemlerle yapılmakta, larvaların duyu organlarının (tat, v.b.), beslenme ile ilgili organellerinin (sindirim tüpü hücreleri, son mide epitel hücrelerinin, karaciğer ve pankreas) yapısı ve hücresel gelişimleri takip edilmektedir (Salhi ve diğ., 1997; Baskerville-Bridges ve Kling, 2000; Yufera ve diğ., 2000).

Larvalar üzerinde yapılan besleme denemelerinde, yemlerin tüketim, sindirim, absorpsiyon ve özümlenme oranlarının tespitinde, floresans maddelerden, renk maddelerinden veya radyoaktif maddelerden yararlanılmaktadır. Floresans ve renk maddeleriyle yapılan çalışmalarda, larvaya verilecek yemler, floresan maddeler (Thioflavine S) ya da renk maddeleri (mürekkep, algler) kullanılarak üretilmekte (suni yemler), ya da canlı yemlerin suyu süzerek beslenme özelliklerinden yararlanılarak renklendirilmektedir (zooplankton). Bu yemler kullanılarak yapılan besleme çalışmasının ardından larva sindirim sistemindeki renk veya parlaklık özel mikroskop sistemleri ile ölçülmektedir (Walford ve diğ., 1991). Bazı araştırmacılar ise sindirim sistemi içindeki partikülleri (suni yem ya da canlı yem) ışık mikroskobu altında sayarak veya sindirim sistemi içinde renk maddelerinin kapladığı alanı ölçerek tüketim oranlarını tespit etmektedir (Fernandez-Diaz ve diğ., 1994; Yufera ve diğ., 1995; Planas ve Cunha, 1999; Yufera ve diğ., 1999; Parra ve Yufera, 2000; Langdon, 2000; Baskerville-Bridges ve Kling, 2000; Önal

ve Langdon, 2000).

Larvaların tükettikleri yemlerin tüketim oranlarının tespiti çalışmalarında mikroskop altında yapılan çalışmalarda yem partiküllerinin sayımı ve renk ölçümüne dayalı yöntem kullanımında bazı olumsuz yanlar bulunmaktadır (Planas ve Cunha, 1999).

Floresan ya da boyar madde kullanımına alternatif olarak geliştirilen radyoaktif markalama yöntemi, spesifik cihaz ve madde gereksinimi, çalışma ortamının izole bir laboratuvar olması gerekliliği gibi olumsuz yanlarına karşın, tüketim ve sindirim oranlarının tespiti çalışmalarında her tür için kolay ve kesin sonuç vermesi nedeni ile yoğun olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemde radyoaktif ışın miktarı bilinen bir izotop (^{14}C , ^3H , ^{35}S), taşıyıcı maddelerle, farklı formlarda canlı yemlerin zenginleştirilmesinde ya da suni yemlerin üretiminde, yem içeriğinde kullanılmakta ve daha sonra yemlerin radyoaktif ışın miktarı (spesifik aktiviteleri) ölçülerek tespit yapılmaktadır. Ölçümde, likid sintilasyon sayıcı denen cihaz kullanılmaktadır. Sonuçların cihazlar kullanılarak okunması, insan kaynaklı hataların en aza inmesini ve kesin sonuç alınmasını sağlamaktadır.

Radyoaktif markalamada taşıyıcı olarak mikro ve makro algler, proteinler, aminoasitler, yağ asitleri kullanılabilir.

Radyoaktif markalamada taşıyıcı olarak mikroalg (*Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros muelleri*) kullanımında, algler yoğun ışıklandırma ve ısıtma yapılan sistemlerde, $\text{NaH}^{14}\text{C}\text{O}_3$ verilerek markalanmaktadır. Bu sistemler, radyoaktif izotopun $^{14}\text{CO}_2$ formuna dönerek kayba uğramaması için, tamamen kapalı ve izole olmak zorundadır. Bu tür markalama yaklaşık 26-27 saat almaktadır. Markalanan algler daha sonra, ya canlı yemlerin zenginleştirilmesinde ya da mikrodietlerin yapımında hammadde olarak kullanılmakta ve markalama sağlanmaktadır (Tandler ve Mason, 1984; Knauer ve Southgate, 1997; Kolkovski ve diğ., 1997).

Markalamada taşıyıcı olarak makroalg kullanımında, ^{14}C izotopunun $^{14}\text{CO}_2$ formu kullanılmaktadır. Fotosentez sırasında $^{14}\text{CO}_2$ 'i tüketen makroalgler bu sayede markalanabilmektedir. Bu algler daha sonra yem hammaddesi olarak, ya doğrudan ya da yağ içeriği uzaklaştırılarak protein kaynağı olarak yem içeriğine eklenmekte ve yemlerin markalanması sağlanmaktadır (Langdon, 1989).

Radyoaktif markalama denemelerinde son yıllarda yoğun olarak kullanılmaya başlayan metod ise aminoasitlerin, yağ asitlerinin, karbonhidratların ve diğer besin maddelerinin markalamada kullanımınıdır. Bu maddeler ticari olarak hazır halde satılmakta olup, çok farklı türde ve miktarda bulunabilmektedir. Bu maddeler yem içerisinde kullanıldığında, hem yem markalanmakta, hem de kullanılan besin maddesinin spesifik olarak larva tarafından özümsemiye özümsemiye de tespit edilmektedir. Radyoaktif olarak markalanmış besin maddelerinin spesifik olarak kullanımında, force-feeding denen bir yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemde aminoasit (^{14}C -metiyonin) veya yağ asidi (^{14}C]16:0) gibi besin maddeleri mikro injeksiyon metodu ile larva sindirim tüpüne bırakılmakta, larvadaki radyoaktivite yada sudaki radyoaktivite değişimleri incelenerek, kullanılan maddenin sindirim ve özümsemiye miktarı tespit edilmektedir (Rust ve diğ., 1993; Ronnestad ve diğ., 2000, 2001). Radyoaktif markalanmış besin maddeleri ticari olarak bir çok formda piyasadan temin edilebilmektedir.

Radyoaktif markalamada, lipozom içeriğinde ^{14}C -Palmitik asit formu kullanımı bir çok avantaj sağlamaktadır. Tıp alanında ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan lipozomlar, tek veya iç içe bir çok tabakadan oluşmuş, aralarında sulu faz içeren, çapları yaklaşık 0.02 -3.5 μm çapında küresel kapsül formunda yapılarıdır (Gürsoy, 1988). Lipozomların fosfo lipid membranının içine yağda eriyebilen maddeler (vitaminler, lipidler)

eklenebilirken, sulu faz içerisine de suda eriyebilen her türlü madde (suda eriyen vitaminler, mineraller, proteinler, kemoterapötikler) kapsüle edilebilmektedir. Bu açıdan lipozomların larva beslemede kullanımı birçok avantaj yaratmaktadır (Koven ve diğ., 1999).

Ülkemizde radyoaktif maddelerin balık larvası besleme çalışmalarında kullanımı uygulanmamakla birlikte, çalışma için gereken cihazlar çeşitli kurum ve kuruluşlarda mevcuttur. Tıp alanında radyoaktif maddelerden yararlanılması nedeniyle, özellikle üniversite hastanelerinde ya da nükleer araştırma kurumlarında bu cihaz bulunmaktadır.

Bu çalışmada, farklı miktarda radyoaktif izotop içeren lipozomlar, larva yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan canlı yemlerden rotifer (*Brachionus plicatilis* Müler, 1786) ve artemianın (*Artemia salina* L., 1758) radyoaktif markalanmasında kullanılarak, optimal radyoaktif izotop kullanım oranı tespit edilmeye çalışılmış ve bu yöntemi kullanmak isteyen araştırmacılara öneriler sunulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Çalışma İsrail Eilat'da bulunan Ulusal Deniz Balıkları Merkezi'nde (National Center for Mariculture) yürütülmüştür. Çalışmada canlı yem olarak büyük boy rotifer ve artemia kullanılmıştır. Canlı yemler farklı oranda (20 μCi , 50 μCi ve 100 μCi) radyoaktif izotop (^{14}C -Palmitik asit) içeren lipozom kullanılarak markalanmıştır. Markalama işleminde bu yemlerin suyu süzerek beslenme özellikleri kullanılmıştır.

Lipozom yapımında temel olarak soya kökenli %95 fosfotilkolin içeren ticari lesitin (Epikuron 200 SH, Lucas Meyer GMBH) ile kolesterol (>%99-Sigma), radyoaktif markalamada ^{14}C izotopunun Palmitik asit formu kullanılmıştır (Koven ve diğ., 1999).

Lipozom yapımında lesitin ve kolesterol oranı 10:4 (w/w) olarak kullanılmıştır. Lesitin ve kolesterol (2:1) kloroform: metanol karışımında çözülmüş, daha sonra 250 ml.'lik yuvarlak tabanlı balona konulmuştur. Bu karışımın üzerine radyoaktif markalamayı sağlamak amacı ile farklı oranlarda ¹⁴C-Palmitik asit eklenmiştir. Balon Rotavapor R110 (Büchi, İsviçre)'a bağlanarak, orta bir dönüş hızı ile 35°C'de solventlerin buharlaştırılması sağlanmıştır. Balon yüzeyinde oluşan film tabakasında kalabilecek solventlerin tamamıyla uçurulmasını sağlamak amacı ile balon 30 dakika süre ile vakumlu desikatöre konmuştur. Lipozomun sulu fazında serbest aminoasitler (alanin, glisin) ile betain ve Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Betain, Lesitin ve Glisin sırasıyla 20:40:40 oranında, BSA 500 mg/2.5ml olacak şekilde saf su içerisinde çözülmüştür. BSA çözeltisi, çözünmeyen partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 3 no gözenekli filtreden geçirilmiştir. Daha sonra serbest aminoasit karışımından 250 mg/2.5 ml ile BSA çözeltisinden 500 mg/2.5 ml alınarak cam bilyelerle birlikte balon içerisine eklenmiştir. Balon yine Rotavapor'a bağlanmış, vakumsuz olarak yavaş dönüş hızında, 35°C'de 30 dakika süre ile işleme konmuştur. Sulu faz ve bilyeler vasıtasıyla balon yüzeyindeki film tabakası, yüzeyden ayrılarak, balon dibinde beyaz opak renkli bir çözelti toplanması sağlanmıştır. Bu çözelti polikarbonat filtre (0.6 µm) takılmış LiposoFast lipozom ekstruder'ından geçirilmiş (Avestin, Kanada) ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

Hazırlanan lipozomun radyoaktivite değerinin ölçümünde ise şu metod uygulanmaktadır. 10 µl lipozom, daha önceden hassas olarak darası ölçülmüş aliminyumdan hazırlanmış kaplara konarak, 65°C'de 2 saat süre ile kurumaya bırakılmıştır. 2 saat sonunda 10 µl lipozomun kuru ağırlığı hesap edilmiştir.

İşlem 3 paralelli olarak yapılmış, sonuçların ortalaması hesaplanmıştır. Yine 10 µl lipozom 3 paralelli olacak şekilde radyoaktif çalışmalar için dizayn edilmiş kapaklı plastik tüplere konmuş, üzerlerine 350 µl Soluen 350 (Packard, USA) eklenmiştir. Aynı zamanda, Soluen solüsyonundan kaynaklanabilecek radyoaktivite ölçümlerinin en aza indirilebilmesi için, farklı 2 tüpe aynı oranda Soluen çözeltisi konmuş ve bu tüplerde örnek tüpleri ile aynı işlemlere tabii tutulmuşlardır. Bu tüpler ağız kapatılarak 50°C'de 2 saat süre ile tutulmuşlardır. Daha sonra tüplerdeki solüsyonun üzerine tüpün tamamını dolduracak şekilde sintilasyon kokteyli (Ultima Gold, XR, Packard, USA) eklenmiş ve tüp çalkalanmıştır. Daha sonra tüp Likid Sintilasyon Sayıcıya (Tri-Carb 2100TR, Packard, USA) yerleştirilmiş ve radyoaktivite değeri dpm olarak ölçülmüştür. İşlem 3 paralelli olarak yapılmış, sonuçların ortalaması alınmıştır. Ölçülen radyoaktivite değerleri daha önceden hesaplanan kuru ağırlık değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. Hesaplama, kör örnek olarak sadece Soluen ve Sintilasyon kokteyli içeren tüplerin radyoaktivite değerleri kullanılmıştır. Hesaplanan değer radyoaktif lipozomun spesifik aktivitesi olarak adlandırılmaktadır. Buna göre lipozomun spesifik aktivitesi ;

$$LSA(dpm \mu S^{-1}) = \frac{(RD^{L(10 \mu l)} - RD^{Kör})}{LKA(10 \mu l)}$$

LSA = Lipozomun Spesifik Aktivitesi (dpm µg⁻¹); *RD*^{L(10µl)} = 10µl Lipozomun Radyoaktif Değeri (dpm); *RD*^{Kör} = Kör Örnek Radyoaktif Değeri (dpm); *LKA*^(10µl) = 10 µl Lipozomun Kuru Ağırlığı (µg).

olarak hesaplanmaktadır (Koven ve diğ., 1999).

Çalışmada rotifer (*Brachionus plicatilis*) ve artemia (*Artemia salina*) kullanılmıştır. Her iki canlı yem radyoaktif içerikli lipozomlar kullanılarak markalanmıştır. Markalama işleminde

sayılarak alınan canlı yemler, havalandırma sağlanmış, ısıtıcı beher sistemlerine stoklanmış ve ticari zenginleştiriciler için kullanılan zenginleştirme protokolleri uygulanarak lipozom ile zenginleştirilmişlerdir. Bu işlemde, 10^6 rotifer için 300 mg lipozom (kuru ağırlık), artemia içinse 200 mg l^{-1} (kuru ağırlık) lipozom kullanılmıştır. 16 saat sonra, 100 μm 'lik filtreden süzülen ve artık radyoaktif materyalin uzaklaştırılması amacı ile temiz deniz suyu ile yıkanan canlı yemler, radyoaktif olmayan beher sistemlerine alınmıştır. Canlı yemler binoküler altında, hassas bir şekilde sayılarak 2 cm çapındaki filtrelere alınmış, vakum altında saf su ile yıkanmışlardır. Filtreler, filtre çapına uygun radyoaktif çalışma tüplerine aktarılmış, üzerlerine filtrelerin yüzeyini örtecek miktarda ($\cong 1000 \mu\text{l}$) Soluen 350 (Packard, USA) eklenmiştir. Bu tüpler, üzerlerine filtrelerin kaçar tane canlı yem içerdiği yazıldıktan sonra, ağzı kapatılarak 50°C 'de 2 saat süre ile tutulmuştur. Daha sonra tüpteki solüsyonun üzerine tüpün tamamını dolduracak şekilde sintilasyon kokteyli (Ultima Gold, XR, Packard, USA) eklenmiş ve tüp çalkalanmıştır. Göz ile canlı yemlerin tam olarak çözünüp

çözünmediği kontrol edildikten sonra, tüpler Likid Sintilasyon Sayıcıya (Tri-Carb 2100TR, Packard, USA) yerleştirilmiş ve radyoaktivite değeri dpm olarak ölçülmüştür. Ölçülen radyoaktivite değerleri tüpün içine konan canlı yemlerin sayısı dikkate alınarak hesaplanmış, böylece canlı yemlerin spesifik aktivitesi hesaplanmıştır. Hesaplama diğer hesaplamalarda olduğu gibi yine kör örneklerden yararlanılmıştır. Ancak canlı yemlerin spesifik aktivitesi hesaplanırken hazırlanan kör örnekte, filtreden kaynaklanan hatalar da olabileceği düşünülerek kör örnek tüplerinin içine boş filtre konulmuştur. Canlı yemlerin spesifik aktivitesi;

$$CYS A(dpm \text{ adet}^{-1}) = \frac{(RD^{CY(dpm)} - RD^{Kör})}{CYS}$$

*CYSA=Canlı Yemin Spesifik Aktivitesi (dpm adet⁻¹);
RD^{CY(dpm)}=Tüpteki Canlı Yemlerin Radyoaktif Değeri (dpm); RD^{Kör}=Kör Örnek Radyoaktif Değeri (dpm); CYS= Tüpteki Canlı Yem Sayısı (adet)*

Bulgular

Farklı oranda radyoaktif izotop içeren lipozomlar ile canlı yemlerin markalanması denenen çalışmada alınan sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan radyoaktif madde miktarının lipozom ve canlı yem spesifik aktiviteleri üzerine etkileri.

Lipozoma Eklenen ¹⁴ C-Palmitik asit Miktarı	Lipozomun Spesifik Aktivitesi	Canlı Yemlerin Spesifik Aktivitesi
20 μCi	115.8 $\text{dpm } \mu\text{g}^{-1}$	2.51 dpm rotifer^{-1}
		3.6 dpm rotifer^{-1}
50 μCi	152.04 $\text{dpm } \mu\text{g}^{-1}$	5.49 dpm rotifer^{-1}
		7.35 dpm rotifer^{-1}
		62.78 dpm artemia^{-1}
100 μCi	310.46 $\text{dpm } \mu\text{g}^{-1}$	8.76 dpm rotifer^{-1}
		61.04 dpm artemia^{-1}
		62.08 dpm artemia^{-1}
100 μCi	310.46 $\text{dpm } \mu\text{g}^{-1}$	16.15 dpm rotifer^{-1}
		18.3 dpm rotifer^{-1}
		106.6 dpm artemia^{-1}
		100.8 dpm artemia^{-1}

Tabloda da görüldüğü gibi, lipozom içerisinde kullanılan radyoaktif izotop miktarındaki artışa bağlı olarak canlı yemlerin spesifik aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Çalışmada 20 μCi ile yapılan denemede, sistemdeki bir arıza nedeniyle artemianın markalanması çalışılmamıştır.

Çalışmada ayrıca, markalamada aynı spesifik aktiviteye sahip lipozom kullanılması durumunda artemiaların, 5-12 kat arasındaki oranlarda, daha yüksek spesifik aktiviteye ulaştıkları görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada, radyoaktif markalama işleminde lipozom kullanımının, iyi sonuç veren, hızlı ve kolay bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Canlı yemlerin radyoaktivite değerlerinin verildiği, tabloda spesifik aktivite değerleri dpm/canlı yem birey olarak verilmektedir. Bu değeri, dpm μg^{-1} birey (kuru ağırlık) değerine çevirdiğimizde, karşımıza şöyle bir sonuç çıkmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Canlı yemlerin kuru ağırlığına bağlı spesifik aktivite değerlerinin hesaplanması.

Lipozoma Eklenen ^{14}C -Palmitik asit Miktarı	Lipozomun Spesifik Aktivitesi	Canlı Yemlerin Spesifik Aktivitesi
20 μCi	115.8 dpm μg^{-1}	5.57 dpm μg^{-1} (rotifer)
		8 dpm μg^{-1} (rotifer)
50 μCi	152.04 dpm μg^{-1}	12.2 dpm μg^{-1} (rotifer)
		16.33 dpm μg^{-1} (rotifer)
		20.05 dpm μg^{-1} (artemia)
		19.46 dpm μg^{-1} (rotifer)
100 μCi	310.46 dpm μg^{-1}	20.01 dpm μg^{-1} (artemia)
		20.35 dpm μg^{-1} (artemia)
		35.88 dpm μg^{-1} (rotifer)
		40.66 dpm μg^{-1} (rotifer)
		34.95 dpm μg^{-1} (artemia)
		33.04 dpm μg^{-1} (artemia)

Rotifer kuru ağırlık = 0.45 μg (Yufera ve diğ., 2000)

Artemia kuru ağırlık = 3.05 μg (16 saatlik zenginleştirme periyodu sonunda) (Garcia-Ortega ve diğ., 1998)

Tabloda da görüldüğü gibi, canlı yemlerin kuru ağırlık değerleri kullanıldığında, her iki canlı yemin de birbirine çok yaklaşık değerlerde radyoaktif olarak markalanabildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda standart bir protokol uygulanmasını sağlayacağından, larvalar üzerinde yapılacak denemelerin planlanmasında kolaylığa yol açmaktadır.

Canlı yemler özellikle deniz balıkları larvalarının beslenmesinde, farklı dönemlerde farklı miktarlarda kullanılmaktadır. Üzerinde denemenin yapılacağı larvanın, büyüklüğüne ve tahmini canlı yem tüketimine bağlı olarak, kullanılacak radyoaktivite miktarı yukarıdaki tablodan yararlanılarak hesaplanabilmektedir.

Üzerinde deneme yapılacak larva büyük ve canlı yem tüketim oranı fazla ise, markalamada 20 μCi radyoaktif izotop kullanımı yeterli olabilirken, özellikle larvaların ilk beslemeye geçtikleri ve yem tüketim oranlarının düşük olduğu dönemlerde daha yüksek radyoaktif madde kullanılması gerekmektedir. Böylece, üzerinde çalışılan larva kısıtlı miktarda canlı yem tüketse ve çalışma sırasında ortam koşullarından ortaya çıkabilecek radyoaktivite madde kayıpları olsa bile, yüksek radyoaktif içerikli canlı yemin ışıma miktarı kolaylıkla tespit edilebilmektedir.

Radyoaktif lipozom ile yapılan markalama işlemi, diğer radyoaktif

yöntemlerle karşılaştırıldığında çok daha kısa sürede (12-16 saat) markalama yapılmasına olanak tanımaktadır. Canlı yemlerin markalanmasında radyoaktif içerikli alg kullanılması durumunda, markalama işlemi 27 saat sürmekte olup, mikroalglerin markalanması sırasında kullanılan $\text{NaH}^{14}\text{C}\text{O}_3$ formunun, $^{14}\text{CO}_2$ haline dönüşerek kayba uğrama ve havaya karışma riski bulunmaktadır (Tandler ve Mason, 1984). Kullandığımız yöntemde ise markalamada kullandığımız ^{14}C -Palmitik asit, taşıyıcı olarak kullanılan lipozomun fosfo-lipid çeperinde bağlanmış olup, havaya karışma riski bulunmamaktadır.

Lipozom, içeriğindeki lipid (kolesterol, lesitin) nedeniyle, canlı yemler tarafından kolayca tüketilebilecek bir yapıdadır. Bu durum, canlı yemlerin lipozom tüketim oranının artmasına yol açmakta, dolayısıyla radyoaktivite değeri artarak, daha verimli bir markalama gerçekleştirilebilmektedir.

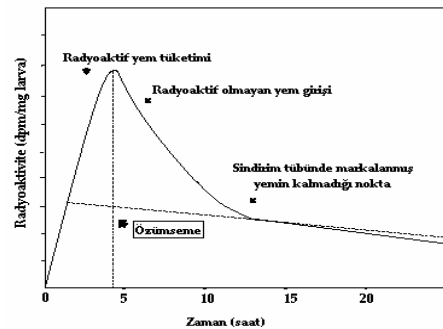
Lipozomların fosfo lipid membranının içine yağda eriyebilen maddelerin (vitaminler, lipidler), sulu faz içerisine de suda eriyebilen her türlü maddenin (suda eriyen vitaminler, mineraller, proteinler, kemoterapötikler) kapsüle edilebilmesi radyoaktif markalama açısından da kolaylık sağlamakta, lipozom içeriğinde kapsüle edilebilecek herhangi bir maddenin radyoaktif formunun kullanılması markalamayı sağlayabilmektedir. Bu da radyoaktif izotop formunun seçiminde esneklik sağlamaktadır.

Radyoaktif markalanmış lipozom ve canlı yemler, her türlü larvanın yem tüketim, yem sindirim ve özümseme oranlarının tespiti çalışmalarında kullanılabilir. Lipozom, ağız açıklığı küçük (*Epinephelus aeneus*) olan bazı larvalar için yem olarak da kullanılabilir ve bu sayede radyoaktif içerikli lipozom kullanılarak, larval besleme çalışmalarının yapılması mümkün olmaktadır (Koven ve diğ., 1999).

Yem tüketim oranlarının ölçüldüğü çalışmalarda, radyoaktif yemlerle beslenen

larvaların, radyoaktif ışınma değerleri ölçülmekte ve her bir larvanın radyoaktif ışınma değeri ve canlı yemin spesifik aktivite değerinden yola çıkarak tüketim oranları tespit edilebilmektedir (Kolkovski ve diğ., 1997; Koven ve diğ., 2001; Gamsız, 2002).

Radyoaktif markalanmış yemler, yem tüketim oranlarının yanında, sindirim (özümseme) oranlarının tespiti denemelerinde de kullanılabilir. Hedeflenen maddenin larvalar tarafından sindirim (özümseme) oranlarının tespiti çalışmalarında, markalanmış yemler planlanan sürede larvalara verilmektedir. Daha sonra larvaların bulunduğu ortamdaki artık radyoaktif maddeler uzaklaştırılmakta, larvalar radyoaktif olmayan yemlerle beslenerek vücutta sindirilmeyen radyoaktif markalanmış yem artıklarının uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu arada kısa aralıklarla larva örnekleri alınarak, radyoaktivite değerleri ölçülmektedir. Ölçülen radyoaktivite değeri sabitlendiğinde, ölçülen radyoaktivite değeri ve hedeflenen besin maddesinin spesifik aktivitesi arasındaki orantı hesaplanarak, maddenin sindirim (özümseme) oranı tespit edilebilmektedir. Bu tür bir çalışmada, larvalarda tespit edilen radyoaktivite ölçümlerinin değişimi Şekil 1'de verilmiştir (Kolkovski ve diğ., 1993).



Şekil 1. Çipura larvaları üzerinde yapılan yem sindirim (özümseme) denemesinde zamana bağlı radyoaktivite değişimi (Kolkovski ve diğ., 1993).

Radyoaktif markalama yönteminin alternatifi olan, diğer markalama yöntemleri, canlı yemlerin markalanmasında ve bu yemlerin larva besleme denemelerinde kullanımında bir çok sorunlar ortaya çıkarmaktadır (Planas ve Cunha, 1999). Bunlar; renk maddeleri kullanılarak markalama yapılan canlı yemlerin larva besleme çalışmasında kullanımı durumunda, tüketim oranlarının tespiti için larvaların ışık geçirgenliğinin olması gerekmektedir. Larva büyüdükçe deri kalınlığının ve pigmentasyonun artması mikroskop kullanımını imkansız hale getirmektedir, boyama tekniğinin uygulanması çok zaman almaktadır, boyar maddelerin canlı yem içerisinde zamana bağlı olarak kaybı söz konusudur, boyar madde ile markalanan yemlerin sindirim oranlarının ölçümü çok zor ya da olanaksızdır, yemlerin miktarının tespiti sırasında, gözlemsel hatalar ortaya çıkabilmektedir, boyar maddelerin toksik etkisi bulunabilmektedir.

Görüldüğü gibi radyoaktif maddelerin markalamada kullanımı su ürünleri larva besleme çalışmaları açısından bir çok avantaja sahiptir. Ancak, radyoaktif maddeler, gerekli koşullara uyulmadığı takdirde, sağlığı etkileyebilen durumlar ortaya çıkabilmektedir. Bu amaçla, bu tür maddelerle çalışırken bazı önlemler alınmak zorundadır. Bunlardan en önemlileri şunlardır (Nuclide Safety Data Sheet);Radyoaktif maddenin çalışılacağı laboratuvar, diğer bölümlerden ayrı ve iyi havalandırılmalı olmalıdır. Radyoaktif maddeler ile çalışılırken çeker ocak sistemlerinde çalışılmalıdır. Laboratuvarda kesinlikle bir şey yenip, içilmemelidir. Çalışacak personel, bu konuda eğitilmiş ve çalışma protokolünü biliyor olmalıdır. Çalışma sırasında, mutlak surette lastik eldiven giyilmelidir. Bazı ¹⁴C formları, tek kat lastik eldivenden deriye nüfuz edebilmektedir. Bu amaçla 2 kat eldiven giyilmeli ve her 20 dakikada bir eldiven değiştirilmelidir.Radyoaktif maddelerle kontamine olmuş tüm malzemeler,

makine ya da el ile çok dikkatli bir şekilde yıkanmalıdır. Atık sarf malzemeler, radyoaktif maddeler için ayrılmış ve izole edilmiş özel atık bölümlerine atılmalıdır. Çalışanlar ve laboratuvar periyodik olarak kontrole tabi tutulmalıdır. Ülkemizde, başta nükleer araştırma enstitüleri olmak üzere, bir çok hastanede radyoaktivite ölçümünde kullanılabilecek cihaz bulunmaktadır. Gerekli koşulların sağlanması durumunda, ortak projelere gidilerek bu cihazların su ürünleri araştırmalarında kullanımı da mümkün görülmektedir.

Kaynakça

- Alarcon, F.J., Moyano, F.J., Diaz, M., Fernandez-Diaz, C., Yufera, M. 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. *Aquaculture Nutrition*, Vol:5, pp:107-113.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J. 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture Nutrition*.Vol:6, pp:171-182.
- Dendrinis, P., Dewan, S., Thorpe, J.P. 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.) by the use of staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. *Aquaculture* 38,137-144.
- Fernandez-Diaz, C., Pascual, E., Yufera, M. 1994. Feeding behaviour and prey size selection gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Marine Biology*, Vol:118, pp:323-328.
- Gamsız, K., 2002. Investigation on using microencapsulated feeds instead of zooplankton in larval nutrition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (in Turkish). PhD thesis, Ege University, 103p.
- Gürsoy, A., 1988. Liposomes (in Turkish), p.173-196. In: A.Gürsoy, E.Pişkin, B. Dortunç, N.A. Peppas [Eds]. *Controlled Drug Release Sytems*. Faculty of Pharmacy of Marmara University. No: 469/5.
- Knauer, J., Southgate, P.C. 1997. Assimilation of gelatine-acacia microencapsulated lipid

- by Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Aquaculture, Volume.153, pp:291-300.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W.M., Gertler, A. 1993. The Effect Of Dietary Exogenous Digestive Enzymes On Ingestion, Assimilation, Growth And Survival Of Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*, Sparidae, L.) Larvae. Fish Physiology And Biochemistry, 12:203-209.
- Kolkovski, S., Arieli, A., Tandler, A.1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. Aquaculture Int. Vol:5, p:527-536.
- Korkut, A.Y., Hoşsu, B. 1998. Fish Nutrition and Feed Technology II. Ege University, Faculty of Fisheries, Publication No:54, Ders Kitabı Dizini No:23, İzmir.
- Koven, W., Barr, Y., Hadas, E., Ben-Atia, I., Chen, Y., Weiss, R., Tandler, A. 1999. The potential of liposomes as a nutrient supplement in first-feeding marine fish larvae. Aquaculture Nutrition, Vo:5, pp:251-256.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsız, K., Tandler, A. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture 194, pp:107-121.
- Langdon, C.J., 2000. Artificial microparticles for delivery of nutrients to marine suspension-feeders. The Advocate, February 2000, pp:40-41.
- Langdon, C.J., 1989. Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspension-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine biology, 102, 217-224.
- Leibovitz, H.E., D.A. Bengtson, P.D. Maugle and K. L. Simpson. 1987. Effects of dietary Artemia lipid fractions on growth and survival of larval inland silversides, *Menidia beryllina*. pp. 469-478 in P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Decleir and E. Jaspers, editors, Artemia research and its applications, Volume 3. Universa Press, Wetteren, Belgium.
- NCHPS. Nuclide safety data sheet Carbon-14. (<http://www.nchs.org>).
- Önal, U., Langdon, C. 2000. Characterization of two microparticulate types for delivery of food to altricial fish larvae. Aquaculture Nutrition, Vol:6, pp:159-170.
- Parra, G., Yufera, M. 2000. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae in relation to prey density. Journal of the Experimental Marine Biology and Ecology, Vol: 243, pp: 1-15.
- Planas, M., Cunha, I., 1999. Simple techniques for labeling prey and gut content analysis in short-term feeding experiments with fish larvae. Aquat. Living Resour., 12(2), 145-149.
- Rice, A.M., Bengston, D.A., Jaworski, C. 1994. Evaluation of artificial diets for cultured fish. NRAC Fact Sheet, No:22.
- Rønnestad, I., Conceição, E.C., Aragao, C., Dinis, M.T., 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). American Society for Nutritional Sciences, 22, 2809-2812.
- Rønnestad, I., Rojeas-Garcia, C.R., Tonheim, S.K., Conceição, E.C., 2001. In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. Aquaculture, 201, pp, 161-175.
- Rust, M.B., Hardy, R.W., Stickney, R.R., 1993. A new method for force-feeding larval fish. Aquaculture 116, 341-352.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Hernandez-Cruz, C.M., Socorro, J., Fernandez-Palacios, H. 1997. The improved incorporation of polyunsaturated fatty acids and changes in liver structure in larval gilthead seabream fed on microdiets. Journal of Fish Biology, Vol:51, pp:869-879.
- Tandler, A. 1984/1985. Overview: Food For The Larval Stages Of Marine Fish. Live Or Inert? Israel Journal Of Zoology. Vol: 33, Sayfa: 161-166.
- Tandler, A., Mason, C., 1984. The use of ¹⁴C labeled rotifer (*Brachionus plicatilis*) in the larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata*): Measurements of the effect of rotifer concentration, the lighting regime and seabream larval age on their rate of rotifer ingestion. EAS Special Publication, No:8. pp: 241-259. Belgium.
- Walford, J., Lim, T.M., Lam, T.J. 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lateolabrax japonicus*) larvae: Do the larvae ingest and digest protein-membran microcapsules.

- Aquaculture, Vol:92, pp: 225-235.
- Yufera, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E.
1995. Feeding Rates Of Gilthead Seabream
Sparus aurata Larvae On Microcapsules.
Aquaculture 134, pp: 257-268.
- Yufera, M., Fernandez-Diaz, C., Pascual, E.,
Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Diaz, M.,
Alarcom, F.J., Garcia-Gallego, M., Parra, G.
2000. Towards an inert diet for first-
feeding gilthead seabream *Sparus aurata*
L. Larvae. Aquaculture Nutrition, Vol:6,
pp:143-152.
- Yufera, M., Pascual, E., Fernandez-Diaz, C.
1999. A highly efficient microencapsulated
food for rearing early larvae of marine
fish. Aquaculture, Vol:177, pp: 249-256.