

PELİN OTU (*Artemisia vulgaris* L)' NUN GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) HASTALIKLARA KARŞI DİRENÇ VE SPESİFİK OLMAYAN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Öznur Diler , Öznur Görmez , Sedef Terzioğlu , Aşkın Atabay 

Cite this article as:

Diler, Ö., Görmez, Ö., Terzioğlu, S., Atabay A. (2018). Pelin Otu (*Artemisia vulgaris* L)' nun Gökkuşacağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Hastalıklara Karşı Direnç ve Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 4(1), 1-11. DOI: 10.3153/JAEFR18001

Süleyman Demirel Üniversitesi
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su
Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü,
Isparta, Türkiye

Submitted: 25.04.2017

Accepted: 23.11.2017

Published online: 21.12.2017

Correspondence:

Öznur GÖRMEZ

E-mail:

oznurgormez@sdu.edu.tr

Journal of Aquaculture Engineering
and Fisheries Research

E-ISSN 2149-0236

4(1), 1-11 (2018)

DOI: 10.3153/JAEFR18001

ScientificWebJournals (SWJ)
©2015-2018

ÖZ

Bu çalışmada pelin otu (*Artemisia vulgaris* L)' nun gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) bağışıklık ve *Vibrio anguillarum*' a karşı direnç sağlayan uygun dozlarının tespiti amaçlanmıştır. Pelin otu, ortalama ağırlığı $20.48 \pm 0.19 - 20.81 \pm 0.04$ g olan balıkların yemlerine toz (%0, %0.1, %0.5, %1, %2) ve etanol ekstraktı (250 ve 1000 mg/kg) olarak ilave edilmiştir. Bazı hematolojik (hematokrit, eritrosit ve lökosit değerleri) ve immunolojik (lizozim, fagositik ve NBT aktivite) özellikler incelenmiştir. NBT, lizozim ve fagositik aktivitenin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Gökkuşacağı alabalıkları, 45. günde *V. anguillarum* ile deneysel yolla enfekte edilmiştir. Araştırma sonuçlarımızda pelin otunun yemlere ilavesi ile balıkların, immun sistemi ve *V. anguillarum*' a karşı direncinin arttığı belirlenmiştir. Pelin otunun balıklarda immunostimulant olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Artemisia vulgaris*, *Vibrio anguillarum*, Bağışıklık, *Oncorhynchus mykiss*, Lizozim, Fagositik aktivite

ABSTRACT

EFFECT OF WORMWOOD (*Artemisia vulgaris* L) ON RESISTANCE AGAINST DISEASES AND NONSPECIFIC IMMUNE SYSTEM IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)

The present study was aimed at determining the effects of wormwood (*Artemisia vulgaris* L) on the immune response and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Wormwood was incorporated into the diets as powder (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%) and ethanol extracts 250 and 1000 mg kg⁻¹ of rainbow trout *O. mykiss* ($20.48 \pm 0.19 - 20.81 \pm 0.04$ g). Some haematological (WBC, RBC, level) and immunological (NBT assay, lysozyme and phagocytic activity) parameters were determined in fish blood. In NBT assay, lysozyme and phagocytic activity were enhanced in wormwood treated groups compared with the control group ($p < 0.05$). After 45 days, fish were challenged with *V. anguillarum* and mortality (%) was recorded up to day 10 post-challenge. The best survival (100%) was in the 1% and 2% wormwood diet groups. These results indicate that wormwood supplementation significantly increased the immunity and makes *O. mykiss* more resistant to infection by *V. anguillarum*. It could be concluded that wormwood could be used as immunostimulant for rainbow trout.

Keywords: *Artemisia vulgaris*, *Vibrio anguillarum*, Immunity, *Oncorhynchus mykiss*, Lysozyme, Phagocytic activity

Giriş

Antimikrobiyal maddelerin hayvansal üretimde enfeksiyonların tedavisi yanı sıra büyüme destekleyici ve yem verimini arttırmak amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Gorbach, 2001). Avrupa Birliği tarafından 2006 yılından itibaren hayvansal yemlerde antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmıştır. Ülkemizde ise gerek bakteriyel dirence yol açabileceği gerekse hayvansal yan ürünlerde kalıntı bırakarak insan sağlığını tehdit edebileceği endişesiyle antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanımı eş zamanlı olarak yasaklanmıştır. Bu yasaklanma ile birlikte gerek gastro-intestinal mikrofloranın sağlığını koruyarak bakteriyel hastalıkların kontrol altına alınması gerekse hayvanların bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve büyüme performansının desteklenmesi, mortalitenin azaltılması amacıyla antibiyotiklere alternatif olabilecek bazı tıbbi bitki türlerinin yem katkı maddesi olarak kullanılmasının iyi bir alternatif olduğu bildirilmektedir (Hermann vd., 2003; Goda, 2008; Keser ve Bilal, 2008).

Balıklarda infeksiyöz hastalıklara karşı direncin artırılması için, immunostimulantlar kullanılmaktadır. Bunlar aşularla birlikte verildiklerinde spesifik savunma mekanizmasını arttıran, tek başlarına verildikleri zaman da spesifik olmayan savunma mekanizmasını aktive edebilen bileşiklerdir. Yaygın olarak kullanılanlar; büyüme destekleyiciler; bitkisel katkı maddeleri; probiyotikler, beta-glukanlar, vitaminlerdir (Goda, 2008). Son zamanlarda su ürünleri yetiştiriciliğinde de immunostimulant olarak tıbbi bitkilerin kullanılması için artan bir ilgi vardır (Goda, 2008; Galina vd., 2009; Uluköy vd., 2009; Bilen ve Bulut, 2010; Citarasu, 2010; Abdel-Tawwab vd., 2010).

Doğada yetişen bitki gruplarında en fazla uçucu yağ içeren familyalardan biri de Asteraceae (Compositae)' dir. Asteraceae familyasındaki bitki türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikler gösterdiği bildirilmektedir (Brisibe vd., 2009, Dülger vd., 1999). Bu familyada yer alan pelin otu bitkisi yaprakları antitumor, antiinflamatuvar, antioksidatif, antibakteriyel, antiviral ve antiparaziter özelliklere sahip bileşenleri içermektedir (Abad vd., 2012). Ülkemiz, tıbbi bitki sayısı yönünden oldukça zengin potansiyele sahip olmasına rağmen, günümüzde ekosisteme zarar vermeyen, doğal, güvenilir, antimikrobiyal etkili bu ajanların su ürünleri sektörüne kazandırılması ve uygun dozların bilinmesi gerekmektedir.

Bu araştırma ile, ülkemiz bitki florasında yer alan ve doğadan toplanan önemli bir tıbbi ve aromatik bitki türü olan pelin otunun (Asteraceae) ilk kez gökkuşuğu alabalıklarında immunostimulant etkisi (spesifik olmayan bağışıklık siste-

minin güçlendirilmesi) ve hastalıklara karşı direncin artırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda ülkemiz tıbbi bitkilerinin katma değerinin artırılması hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada Kullanılan Balıkların Temini ve Araştırmanın Uygulama Yeri

Araştırmada kullanılmak üzere ortalama ağırlıkları $20,48 \pm 0,19$ -- $20,81 \pm 0,04$ g ve boyları 10-12 cm olan toplam 1470 adet ($(70 \times 3) \times 7 = 1470$ adet) gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Aksu bölgesindeki Dinçler alabalık üretim biriminden temin edilerek SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesine taşınmıştır.

Araştırmada balıklar içerisinde 4000 lt su bulunan 3 bölmeli 7 adet uzun beton havuza yerleştirilmiştir (Şekil 1). Deneme balıkları adaptasyon süresince ticari alabalık pelet yemiyle günde iki kez doyuncaya kadar beslenmiştir. Deneme süresince tanklardaki yem artıkları su kalitesinin bozulmaması için sifon yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce rastgele seçilen 15 adet balık mikrobiyolojik yönden (bakteri, mantar, parazit) incelenmiş ve herhangi bir enfeksiyon taşımadığı görülmüştür.

Araştırmada kullanılan artezyen suyunun debisi 12 L/dk, tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı $12 \pm 2^\circ\text{C}$, pH' sı 7.3 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 7.4 mg/L olarak ölçülmüştür.

Pelin Otunun Temini ve Teşhisi

Araştırmada kullanılan pelin otu bitkisi, Van bölgesi civarından toplanarak temin edilmiş ve uluslararası koda sahip bir herbaryum olan Gül Herbaryumu' nda (Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta) sistematik uzmanları Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK ve Dr. Belkıs MUCA tarafından klasik taksonomi metotlarına göre teşhis edilmiştir. İlgili türün teşhisinde Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol V. (Davis, 1975) eseri kullanılmıştır. Ayrıca tür teşhisi yapılırken bazı sistematik sözlüklerden ve yardımcı kaynaklardan da yararlanılmıştır (Baytop, 1984; Baytop, 1998; Seçmen vd., 2004). Pelin otu bitkisinin toz halinin ve ethanol ekstraktının ana bileşenleri yönünden kimyasal özellikleri Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Araştırma Laboratuvarındaki Gaz kromatografi cihazıyla (GC/MS kullanılarak) belirlenmiştir. Gaz kromatografisi çalışma koşulları Tablo 1' de verilmiştir.

Metot

Araştırmada Kullanılan Bitki Türünün Toz ve Etanol Ekstrakt Şeklinde Yeme İlave Edilmesi

Araştırmada kullanılan pelin otu bitkisi kurutulduktan sonra mikser yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki türü %0.1, %0.5, %1, %2 ve %0 oranlarında ticari alabalık yemine ilave edilmiştir. Pelin otu bitkisinin etanol ekstraktı ise 15 g kuru bitki örneği 50 mL etanolde 2 saat süre ile tutulduktan sonra süzme işlemi için whatman no1 filtre kağıdından geçirilmiş, su banyosu yardımıyla buharlaştırma işlemi yapılmıştır. Ekstrakt 250, 1000 ve 0 (kontrol) mg/kg oranlarında ticari alabalık yemine ayçiçeği yağı ile birlikte spreyleme yöntemi ile ilave edilmiş ve gökkuşuğu alabalıkları vücut ağırlıklarının %3 oranında 60 gün süreyle beslenmişlerdir. Kontrol grubundaki balıklar ise bitki ve ekstrakt ilavesi yapılmayan ticari alabalık yemiyle vücut ağırlığının %3' ü oranında beslenmiştir.

Araştırmada Kullanılan Bitki Türünün Gökkuşuğu Alabalıklarının Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan bitki türlerinin spesifik olmayan bağışıklık sistemine etkisinin belirlenmesi için gökkuşuğu ala-

balıklarından 20. ve 45. günde kan alınarak; lökosit ve eritrosit sayısı, hematokrit yüzdesi, NBT, fagositoz, serum lizozim aktivitesi incelenmiştir.

Balıklardan Kan Alımı

Araştırmanın 20 ve 45. günlerinde gökkuşuğu alabalıkları (her gruptan 6 balık) Quinaldine (50 ppm) ile anestezi edildikten sonra kuyrukları kesilerek kaudal venalarından şırınga ile heparinli tüplere kan alınmıştır (Dorucu vd., 2009).

NBT-Pozitif Hücrelerin Sayımı

NBT-pozitif hücrelerin sayımında Anderson vd. (1992) tarafından tanımlanan metot kullanılmıştır. Nitroblue tetrazolium (NBT) solüsyonu steril PBS ile %0.2 oranında taze olarak hazırlanmıştır. Lamel üzerine 50 µL kan damlatıldıktan sonra kâğıt mendillerin ıslatılıp içine konulduğu nemli petri kutularında 22°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kırmızı kan hücrelerini uzaklaştırmak için pH 7' ye ayarlanan fizyolojik tuzlu su ile lamel nazik bir şekilde yıkanmıştır. Ardından bir damla NBT solüsyonu damlatılmış lam üzerine kırmızı kan hücrelerinden arındırılmış lamel kapatılarak ve nemli petri kutularında 22°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Pozitif koyu mavi boyanmış hücreler mikroskopta x40 büyütmede her balıktan 5 lamelde ve 5 farklı alanda sayılmış ve ortalamaları alınmıştır.



Şekil 1. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi beton havuzları

Figure 1. Concrete ponds of Eğirdir Fisheries Faculty at Süleyman Demirel University

Tablo 1. Gaz kromatografisi çalışma koşulları**Table 1.** Gas chromatography working condition

| | |
|--------------------|---|
| İnjesiyon kolonu | 250° C |
| Dedektör | 250° C |
| Akış hızı (mL/min) | 1.5 |
| Dedektör | 70 eV |
| Taşıyıcı gaz | Helyum |
| Kapılar kolon | Cp WAX 52 CB 50 m * 0.32 mm, 1.2 µm |
| Sıcaklık Programı | Kolon sıcaklığı başlangıçta 40°C olup, 230°C' ye dakikada 4°C' lik artışla ulaşmıştır. 230°C' de 10 dk süreyle sabit tutulmuştur. |
| Bilgi bankası | Wiley, nist, tutor |

Eritrosit ve Lökosit Sayımı

Kuyrukları kesilerek kaudal venadan alınan kan örneği Natt-Herrick eriyiği ile eritrosit sulandırma pipeti aracılığıyla 100 kat sulandırılarak Thoma lamında eritrosit ve total lökosit sayımı yapılmıştır (Kocabatmaz vd., 1982; Hoffman ve Lommel, 1984).

Natt-Herrick solüsyonu için, 3.88 g Sodyum klorür, 2.5 g Sodyum sülfat, 2.91 g Disodyum fosfat 12H₂O₂, 25 g Monopotasyum fosfat, 7.5 cc (%37) Formalin, 0.1 g Metil kırmızısı ve 1000 cc Distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Serum Lizozim Aktivitesinin Belirlenmesi

Alınan kan örnekleri +4°C' de 24 saat bekletildikten sonra 5000 devirde soğutmalı santrifüjünde 10 dk santrifüj edilmiştir ve serum kısmı -20°C' de 30 gün içinde lizozim aktivitesi belirlenene kadar saklanmıştır. Lizozim aktivitesini belirlemek amacı ile diffüzyon agar (Agar plate, lysoplate) metod kullanılmıştır (Ellis, 1990). Kısaca, PBS (Fosfat buffer saline) içine %0.5 Agar ve %0,12 g liyofilize *Micrococcus lysodeicticus* katılarak hazırlanmıştır. Petrilerde agar katılaştıktan sonra 5 mm çapında çukurlar açılmıştır. Daha önceden alınan serum 25 µl olacak şekilde çukurlara ilave edilmiştir. Petriler 36°C' de 20 saat inkübe edildikten sonra çukurların etrafında oluşan zonların çapları ölçülmüştür.

Hematokrit Değerinin Saptanması

Hematokrit değeri (%) mikrohematokrit yöntemiyle belirlenmiştir. Mikrohematokrit tüplerinin ¾' ü kan ile doldurulduktan sonra, tüpün kan olmayan ucu alevde yakılarak kapatılarak hematokrit santrifüjinde 10500 devir/dakika 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında % hematokrit değer santrifüjün skalasından okunmuştur. Her balık örneği için iki adet mikrohematokrit tüpü hazırlanmıştır (Tanyer, 1985).

Fagositik Aktivitenin Belirlenmesi

Lökosit hücrelerinin fagositik aktiviteleri için PBS' de %0.87 oranında hazırlanan Kongo red solüsyonunun 3 mL' si maya hücreleri süspansiyonuna (1.5 g) ilave edilmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 7 mL distile su eklenerek otoklavlanmıştır. Bu metotta Kongo redle boyanan maya hücreleri fagosite ettirilerek ölçülmüştür. Lökosit solüsyonuna (250 µL) son konsantrasyonda 1:40 oranında maya hücresi: lökosit olacak şekilde 500 µL Kongo red boyası ile boyanan ve otoklavlanan maya hücreleri süspansiyonu eklenmiştir. Bu karışım oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra 1 mL buzla soğutulmuş HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) eklenmiş ve 1 mL Histopaque (1.077) her örnek tüpünün dip kısmına enjekte edilmiştir. Örnekler 850xg de 5 dakika santrifüjlenerek makrofajlar maya hücrelerinden ayrılmıştır. Makrofajlar alınmış ve HBSS' de 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler 1 mL trypsin-EDTA solüsyonu (5.0 g/L trypsin ve 2.0 g/L EDTA, Sigma) ile tekrar süspansiyon edilerek 37°C' de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbansı tripsin-EDTA kullanılarak 510 nm' de ölçülmüştür (Seeley vd., 1990).

DeneySEL Enfeksiyon Uygulamaları

Araştırmanın 45. gününde pelin otu bitkisi toz (%0.1, %0.5, %1.0, %2.0 ve %0 oranında) ve etanol ekstraktı (250, 1000 ve 0 mg/kg oranında) ilaveli yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalıklarında *Vibriosis* hastalığına karşı direnç sağlayıp sağlamadığını belirlemek için balıklar *Vibrio anguillarum* ile enfekte edilmiştir. DeneySEL enfeksiyonda kullanılan *V. anguillarum* suşu Fethiye bölgesindeki bir alabalık işletmesinden izole edilmiş olup, bu suş Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı stok kültürden alınarak T-TSA' ya ekimleri yapılmıştır. Bu besiyerinde 22°C' de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra TSB' a alınarak

subkültürü yapılmıştır. TSB besiyerinde 22°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra mililitredeki canlı bakteri sayısı (cob/mL) ve optik dansite değerleri (O.D.) spektrofotometre ile tespit edilmiştir (Ekici, 2010; Çağırğan, 2004; Altun, 2001; Santos vd., 1991).

Deneysel enfeksiyon yapılan balıklarda bağışıklığın tespitine geçmeden önce, test yapılacak balık popülasyonunda %50' ini öldüren bakteri sayısı (LD₅₀) belirlenmiştir. LD₅₀ değerini saptamak için her biri 25' er adet balıktan oluşan gruplara 2x10⁷, 2x10⁵, 2x10⁴, 2x10² ve 2x10¹ kob/mL yoğunlukta bakteri i.p. yolla injekte edilip, balıklar 25 gün boyunca takip edilmiştir. Deneysel enfeksiyon uygulamaları neticesinde elde edilen sonuçlar semilogaritmik grafik kağıdı üzerinde değerlendirilerek LD₅₀ değeri belirlenmiştir (Ekici, 2010; Ellis,1999).

Denemenin 45. gününde her gruptan 10 adet toplamda 30 adet gökkuşağı alabalığına 2x10² kob/mL LD₅₀ oranındaki *V. anguillarum* patojeni i.p. enjeksiyon (0,1 mL) ile verilmiştir. Deneysel enfeksiyon uygulamasından sonra balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölümler günlük olarak kayıt edilmiş ve ölü veya ölmekte olan balıkların iç organlarından reizolasyon için T-TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ekimler sonucu ölümlerin *V. anguillarum*' un neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı tespit edilmiştir (Ekici, 2010; Çağırğan, 2004; Altun, 2001; Santos vd., 1991).

Bağışıklığın Değerlendirilmesi

Doğal immunostimulant maddelerin oluşturduğu koruma, balıkların hayatta kalma yüzdesi (RPS= Relative Percent Survival)' ne göre değerlendirilmiştir (Altun, 2001; Santos vd., 1991).

✓ **RPS** = [1-(Bitkisel ürünlerin kullanıldığı balık gruplarındaki mortalite (%)/Kontrol grubundaki mortalite (%))] X 100

İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen veriler (immunolojik parametreler, mortalite ve RPS değerleri) SPSS 10.0 paket programında Anova testi ile değerlendirilmiştir (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Denemede incelenen çeşitli parametrelerin önem derecelerini karşılaştırırken sonuçlar ortalama değer ve standart sapma olarak verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Pelin Otunun GC-MS Analiz Sonuçları

Bu çalışmada pelin otu bitkisinin kimyasal kompozisyonunda 46 farklı bileşen elde edilmiş olup isoamyl format

(%18), β-tuyon (%14.02), vinyl amil karbinol (%7.15), β-karyofilen (%5.06)' in ana bileşenler olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada Kullanılan Bitki Türünün Gökkuşağı Alabalıklarının Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Araştırmanın 20. gününde lökosit sayımında %2 gruplarının kontrol grubu ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu 45. günde ise gruplar arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Eritrosit sayısının 20. günde %0.5, %0.1 ve 1000 mg/kg gruplarında, 45. günde ise %2, 250 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarında kontrol grubu ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Hematokrit (%) değerinin 20. günde 1000 mg/kg gruplarında, 45. günde ise %2 %0.1 ve 250 mg/kg grubunda kontrol grubu ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 2).

20. günde kontrol grubu ve diğer gruplara göre %0.1 ve %1 gruplarının en yüksek NBT aktiviteyi verdiği ve 45. günde bu aktivitenin tüm gruplarda kontrolden daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir. Lizozim aktivitesinin ise 20. ve 45. günlerde kontrole göre tüm gruplarda artmış olduğu, en etkili grupların %0.1 ve 1000 mg/kg olduğu görülmüştür. Fagositik aktivitenin tüm gruplarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı ve en yüksek aktivitenin %0,5 ve %0.1 dozlarında olduğu bulunmuştur (Tablo 2).

Gökkuşağı Alabalıklarında Pelin Otu Bitkisinin *V. anguillarum* Patojenine Karşı Direnç Etkisi ve Nisbi Yaşama Oranları (RPS)

Deneysel enfeksiyon uygulama sonrası gökkuşağı alabalıklarında *Vibrio anguillarum*' a karşı yaşama oranı bakımından sırasıyla %2, %1 ve 1000 mg/kg ekstrakt grubunun daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir (p<0,05) (Tablo 3).

Hızla gelişmekte olan su ürünleri yetiştiriciliğinde intensif üretim şartlarında infeksiyöz hastalıklar nedeniyle ekonomik kayıplar görülmektedir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler su ürünlerinde ve son tüketicilerde olumsuz etkilere ve patojenik bakterilerin direnç kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca, oral kemoterapi sindirim sistemindeki yararlı olan mikrobiyal florayı inhibe etmektedir (Teuber, 2001; Hermann vd. 2003). Bu nedenle, hastalıklara karşı direnç kazandıran alternatif ürünlerin kullanılması gündemdedir (Xiang ve Zhou 2000; Irianto ve Austin 2002; Lin ve Zhang., 2004; Abdel-Tawwab vd., 2008; Ard' o vd., 2008; Goda, 2008; Kesarcodi-Watson vd., 2008).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde farklı tıbbi bitki türlerinin immunostimulant etkilerinin incelendiği araştırmalar yapılmaktadır (Terzioglu ve Diler 2016, Goda, 2008; Galina vd.,

2009; Uluköy vd., 2009; Bilen ve Bulut, 2010; Citarasu, 2010; Abdel-Tawwab vd., 2010; Pratheepa ve Sukumaran, 2014). Bu çalışmalarda, Pratheepa ve Sukumaran (2014), farklı konsantrasyonlarda hazırlanan *Euphorbia hirta* ekst- raktı ile beslenen ve deneysel yolla *Aeromonas hydrophila* ile enfekte edilmiş *Cyprinus carpio* balıklarında eritrosit, he- moglobin, lökosit sayımı gibi hematolojik reaksiyonların bakteriyel enfeksiyonun olumsuz etkilerini azalttığı bildiril- miştir. Aynı araştırmada bitkiyle beslenen gruplarda NBT+ hücre sayısı ve lizozim aktivitesinin de kontrol grubuna göre önemli seviyede arttığı tespit edilmiştir.

Benzer olarak Bilen vd. (2013) ise tetra (*Cotinus coggygia*) bitkisinin metanol ekstraktı ile koi balıklarını (*Cyprinus car- pio carpio*) 3 farklı dozda 4 hafta beslemişlerdir. Balıklarda lökosit, NBT + hücre sayısı ve lizozim aktivitesinin önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca Ndong ve Fall (2011), hibrid tilapia (*Oreochromis niloticus x O. aureus*) balıklarının diyetine 0, 0.5 ve 1 g/kg sarımsak (*Allium sati- vum*) ilavesinin bağışıklık sistemi üzerine etkisini değerlen- dirmiştir. 4 hafta sonunda 0,5 g/kg sarımsak ilave edilen di- yetle beslenen balık grubunun kontrol grubuna göre toplam lökosit sayısı, fagositik aktivite ve lizozim aktivitesinde önemli artış olduğunu belirlemişlerdir.

Lizozim bakteri hücrelerine karşı etkili bir antimikrobiyal peptid olup bağışıklık sistemi için önemli bir parametredir. Lizozim aktivitesi stres, su sıcaklığı, besin maddeleri, en- feksiyon gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Bitkisel ekstraktların balık yemlerinde yem katkı maddesi olarak kullanımı sonucu lizozim salgısı yapan fagositik makrofaj hücrelerinde artış sağlamaktadır. Ayrıca lizozim aktivitesi- nin artışı kandaki monosit ve nötrofil varlığı ile ilişkili ol- ması sonucunda lizozim artışı ile NBT+ hücre sayısının da arttığı tespit edilmiştir (Pratheepa ve Sukumaran, 2014). Spesifik olmayan bağışıklık çalışmaları için lökosit sayımı önemli bir parametre olup lökosit sayısındaki artış immu- nostimulasyon için bir kanıt olarak kabul edilmektedir (Tre- ves-Brown, 2000).

Awad ve Austin (2010) %1 oranında *Lupinus perennis*, *Mangifera indica*, *Urtica dioica* bitkileri ile 21 gün beslenen gökkuşacağı alabalıklarında *Aeromonas hydrophila*' ya karşı yapılan deneysel enfeksiyonda mortalitenin kontrole göre 3 farklı bitki grubunda önemli ölçüde azalması, söz konusu etkinin balıklarda lizozim, bakterisidal etki ve respiratory burst aktivitelerinin artması ile bağlantılı bulunmuştur. Ay- rıca hematolojik parametreler bakımından *U. dioica* hariç diğer bitkilerin eritrosit ve lökosit değerleri, *U. dioica*' da ise hematokrit (%) sayısında artış tespit edilmiştir.

Dorucu vd. (2009), gökkuşacağı alabalıkları *Nigella sativa* (çörek otu) bitkisi ile %1, %2.5 ve %5 oranlarında 21 gün süre ile beslemişlerdir. Hematolojik parametreler ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine etkiyi araştırdıkları bu çalışmanın sonunda %1, %2.5 gruplarında hematokrit de- ğerlerinin kontrole göre değişmediği ancak %5 çörek otu di- yeti ile beslenen balık gruplarında hematokritin arttığı löko- sit sayısının değişmediği belirlenmiştir.

Bu araştırmada ise 20. günde pelin otu ile beslenen grup- larda lökosit sayımında %2 gruplarının kontrol grubu ve di- ğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür (p<0.05). Eritrosit sayısının 20. günde %0.5, %0.1 ve 1000 mg/kg gruplarında, 45. günde ise %2, 250 mg/kg ve 1000 mg/kg gruplarında kontrol grubu ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hematokrit (%) değerinin 20. günde 1000 mg/kg gruplarında, 45. günde ise %2 %0.1 ve 250 mg/kg gruplarında kontrol ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada hematolojik bulgular bakımından 20. günde %2 grubunda lökosit sayımı ve hematokrit değerlerinde ar- tışlar nedeniyle sırasıyla Awad ve Austin (2010) ve Dorucu vd. (2009)' a benzer, Treves-Brown (2000)' dan farklı so- nuçlar elde edilmiştir.

Terzioğlu ve Diler (2016) tarafından *Echinacea angustifolia* Hell)' nın %1 ve %0.1 olmak üzere 2 farklı konsantrasyo- nunun gökkuşacağı alabalıklarında spesifik olmayan bağışık- lık sistemi üzerine etkisini tespit etmek amacıyla yapılan bir araştırmada, çalışmanın 20.gününde %1 grubunda NBT ak- tivitenin arttığı, %0.1' de ise kontrole benzer olduğu, 45.günde ise her 2 grupta da kontrole göre NBT aktivitenin önemli seviyede arttığı tespit edilmiştir. Bu araştırmada da 20. günde NBT aktivitenin artmaya başladığı 45. günde ise kontrole göre %2, %1, %0.5, %0.1, 250 mg/kg, 1000 mg/kg gruplarında kontrole göre önemli seviyede artmış olması Terzioğlu ve Diler (2016)' nın bulgularını desteklemiştir.

Table 2. 20 ve 45. günlerde *A. vulgaris*' in gökkuşağı alabalıklarında hematolojik ve immünolojik parametreler üzerine etkisi

Table 2. Effect of *A. vulgaris* on hematologic and immunological parameters in rainbow trout at 20 and 45 days

| | Günler | % 2 | % 1 | % 0,5 | % 0.1 | 250 mg/kg | 1000 mg/kg | KONTROL |
|--|--------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Lökosit Sayısı ($\times 10^5/\mu\text{L}$) | 20 | 0.168 \pm 0.11 ^b | 0.90 \pm 0.03 ^{bc} | 0.143 \pm 0.06 ^{bc} | 0.097 \pm 0.02 ^{bc} | 0.065 \pm 0.03 ^a | 0.093 \pm 0.04 ^{bc} | 0.088 \pm 0.02 ^{bc} |
| | 45 | 1.125 \pm 0.15 | 1.300 \pm 0.63 | 1.175 \pm 0.38 | 1.550 \pm 0.64 | 1.075 \pm 0.50 | 1.275 \pm 0.28 | 1.000 \pm 0.21 |
| Eritrosit Sayısı ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 20 | 0.098 \pm 0.04 ^{ab} | 0.080 \pm 0.03 ^a | 0.173 \pm 0.01 ^c | 0.150 \pm 0.02 ^c | 0.085 \pm 0.04 ^a | 0.135 \pm 0.04 ^{bc} | 0.103 \pm 0.02 ^{ab} |
| | 45 | 0.238 \pm 0.06 ^b | 0.118 \pm 0.04 ^a | 0.133 \pm 0.03 ^a | 0.135 \pm 0.26 ^a | 0.178 \pm 0.06 ^{ab} | 0.165 \pm 0.05 ^{ab} | 0.115 \pm 0.19 ^a |
| Hemotokrit (%) | 20 | 35.25 \pm 4.64 ^{ab} | 33.50 \pm 1.29 ^a | 38.50 \pm 2.64 ^{ab} | 35.75 \pm 0.95 ^{ab} | 33.00 \pm 4.08 ^a | 39.75 \pm 5.25 ^c | 36.75 \pm 1.70 ^{ab} |
| | 45 | 45.75 \pm 1.18 ^c | 35.50 \pm 2.59 ^a | 38.25 \pm 0.75 ^{ab} | 45.50 \pm 1.32 ^c | 44.75 \pm 1.10 ^c | 40.50 \pm 2.39 ^{abc} | 41.75 \pm 2.65 ^{bc} |
| NBT (+) Hücre Sayısı | 20 | 3.25 \pm 1.25 ^a | 19.00 \pm 5.20 ^c | 4.40 \pm 2.08 ^a | 14.30 \pm 5.15 ^b | 4.55 \pm 1.40 ^a | 4.60 \pm 2.01 ^a | 1.65 \pm 0.66 ^a |
| | 45 | 3.55 \pm 0.77 ^{bc} | 3.70 \pm 0.93 ^{bc} | 2.30 \pm 0.66 ^b | 2.60 \pm 1.24 ^{bc} | 4.20 \pm 0.28 ^c | 3.90 \pm 2.12 ^{bc} | 0.30 \pm 0.11 ^a |
| Lizozim Aktivitesi (cm) | 20 | 7.00 \pm 1.73 ^b | 10.67 \pm 0.58 ^c | 9.00 \pm 1.00 ^{bc} | 8.00 \pm 2.65 ^b | 9.00 \pm 1.00 ^{bc} | 9.00 \pm 0.00 ^{bc} | 4.00 \pm 0.00 ^a |
| | 45 | 10.67 \pm 0.58 ^{ab} | 11.00 \pm 3.46 ^{ab} | 8.00 \pm 1.00 ^{ab} | 11.67 \pm 2.08 ^b | 10.00 \pm 1.73 ^{ab} | 11.33 \pm 0.58 ^b | 7.00 \pm 3.46 ^a |
| Fagositik Aktivite | 20 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 45 | 2.286 \pm 0.28 ^d | 2.073 \pm 0.07 ^{cd} | 2.867 \pm 0.03 ^e | 2.119 \pm 0.12 ^{cd} | 1.759 \pm 0.19 ^b | 1.983 \pm 0.02 ^{bc} | 1.428 \pm 0.08 ^a |

Tablo 3. Gökkuşığı alabalıklarında *A. vulgaris*' in koruyuculuk değerleri (RPS) ve ölüm oranları**Table 3.** Relative percent survival (RPS) and mortality of *A. vulgaris* in rainbow trout

| | MORTALİTE (%) | RPS |
|---------|--------------------------|--------------------------|
| % 2 | 0 ±0.00 ^a | 100 ±0.00 ^c |
| % 1 | 0 ±0.00 ^a | 100 ±0.00 ^c |
| % 0,5 | 9.33 ±2.30 ^b | 81.74 ±4.19 ^b |
| % 0.1 | 13.33 ±2.30 ^c | 73.73 ±5.52 ^b |
| 250 | 22.67 ±2.30 ^d | 55.47 ±5.44 ^a |
| 1000 | 4.00 ±4.00 ^a | 91.99 ±8.16 ^c |
| Kontrol | 51.00 ±1.73 ^c | - |

Lizozim aktivitesinin ise 20. ve 45. günlerde kontrole göre tüm gruplarda artmış olduğu, en etkili grupların %0,1 ve 1000 mg/kg olduğu görülmüştür. Bu çalışmada spesifik olmayan bağışıklığın iki önemli parametresi olan lizozim ve NBT aktivitelerinin 45. günde pelin otu ile beslenen bütün gruplarda artış göstermiş olup dolayısı ile bulgularımız söz konusu parametrelerin birbiri ile bağlantılı olarak artabileceği görüşünü (Pratheepa ve Sukumaran, 2014) desteklemiştir.

Fagositik aktivitenin tüm gruplarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı ve en yüksek aktivitenin %0.5 ve %0.1 dozlarında olduğu bulunmuştur. Pelin otunun gökkuşığı alabalıklarında hematolojik ve immunolojik parametreleri olumlu olarak etkilediği tespit edilen bu çalışmadaki bulgular, Bilen vd. (2013), Ndong ve Fall (2011) ve Dorucu vd. (2009)' un bulgularını desteklemiştir.

Diler vd. (2016), gökkuşığı alabalıklarında yeme ilave edilen *Origanum onites* uçucu yağının 0.125, 1.5 and 2.5 mL/kg oranlarının gökkuşığı alabalıklarda mortaliteyi azalttığı 3.0 mL/kg grubunda ise *L. garvieae*' ye karşı %100 yaşama oranı sağladığını tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışma da Diler vd. (2014), *Origanum vulgare* ile beslenen gökkuşığı alabalıklarında *Lactococcus vulgare* ve *Vibrio anguillarum* patojenlerine karşı direnç meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Terzioğlu (2012), %0.1 ve %1 oranında yaban mersini ilave edilen yemlerle beslenen gökkuşığı alabalıklarında lizozim aktivitesini arttığını ve *Vibrio anguillarum* ile deneysel enfeksiyon uygulaması sonrası yaşama oranının yükseldiğini tespit etmiştir.

Sahu vd. (2007), *Lobelia rohita*' larda sarımsağın (*Allium sativum*) bağışıklık sistemi ve hastalıklara karşı direnç üzerine etkisinin incelendiği çalışmada %0 (kontrol), %0.1, %0.5, %1.0 oranlarında sarımsak (*Allium sativum*) ilave edilmiş yemlerle beslenmişlerdir. Sarımsak ilave edilmiş diyetle

beslenen balıklarda kontrole göre serum bakteriyel aktivitesi, lizozim, serum protein ve albüminin arttığı ve 60 gün sonra *Aeromonas hydrophila* ile yapılan deneysel enfeksiyon sonrası yaşama oranlarının kontrol grubuna göre artmış olduğu belirlenmiştir.

Awad ve Austin (2010), yaptıkları çalışmada gökkuşığı alabalıklarını % 1 oranında *Lupinus perennis*, *Mangifera indica* ve *Urtica dioica* ile beslemişler ve 14 gün sonra *Aeromonas hydrophila* ile yapılan deneysel enfeksiyon uygulaması sonrasında ölüm oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda gökkuşığı alabalığına uygulanan deneysel enfeksiyon sonrası %1 ve %2 oranında pelin otu ile beslenen grupların diğer gruplara göre *Vibrio anguillarum*' a karşı %100 yaşama oranı sağladığı görülmüştür. Pelin otunun *V. anguillarum*' a karşı direnç oluşturması nedeniyle bulgularımız Diler vd. (2016), Diler vd. (2014), Terzioğlu (2012), Sahu vd. (2007) ve Awad ve Austin (2010)' in yaptığı çalışma sonuçlarını desteklemiştir.

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada, pelin otu bitkisinin terpenoid bileşenler bakımından zengin olması nedeniyle *Vibrio anguillarum*' a karşı direnç sağladığı, ayrıca pelin otunun lizozim aktivitesi, fagositoz aktivite ve NBT pozitif hücre sayısında artış sağlaması nedeniyle bağışıklık sistemini stimüle ettiği ve gökkuşığı alabalıklarında etkili bir immunostimulant olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Teşekkür

Çalışmamıza 1120484 nolu Hızlı Destek projesi ile destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu TÜBİTAK 'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P. (2012). The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*, 17(3), 2542-2566.
- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael, N.E. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1), 185-189.
- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Seden, M.E., Sakr, S. F. (2010). Use of green tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(s2), 203-213.
- Altun, S. (2001). *Yersinia ruckeri* Suşlarının Bazı Antijenik ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilimdalı Doktora Tezi, 105s., Isparta.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281-307.
- Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z., Jeney, G. (2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275(1), 26-33.
- Awad, E., & Austin, B. (2010). Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33(5), 413-420.
- Baytop, T. (1984). Türkiye' de Bitkiler İle Tedavi. İstanbul Üniversitesi, s: 353, İstanbul.
- Baytop, A. (1998). İngilizce-Türkçe Botanik Klavuzu. İstanbul Üniversitesi Yayınları, ISBN: 9754044821, 9789754044829.
- Bilen, S., Bulut, M. (2010). Effects of laurel (*Laurus nobilis*) on the non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 1275-1279.
- Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A. M. (2013). Influence of tetra (*Cotinus coggygria*) extract against *Vibrio anguillarum* infection in koi carp, *Cyprinus carpio* with reference to haematological and immunological changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(3), 517-522.
- Brisibe, E.A., Umoren, U.E., Brisibe, F., Magalhães, P.M., Ferreira, J.F., Luthria, D., Wu, X., Prior, R.L. (2009). Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chemistry*, 115(4), 1240-1246.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.
- Çağırğan, H. (2004). Levrek Yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Vibriozise Karşı Aşı Geliştirilmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21, 271-274.
- Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol V., Edinburgh University Press, pp. 8-312.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, A. (2014). Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* L. on Protection Against *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). 7th International Symposium on Aquatic Animal Health, August 31- September 4, Portland, Oregon USA.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., Metin, S. (2016). Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 844-851.
- Dorucu, M., Colak, S.O., Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y. (2009). The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 2(1), 27-33.

- Dülger, B., Ceylan, M., Alitsaous, M., Uğurlu, E. (1999). *Artemisia absinthium* L.(Pelin)' un antimikrobiyal aktivitesi. *Turkish Journal of Biology*, 23(3), 377-384.
- Ekici, S. (2010). Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis' e Karşı Aşı Uygulanmasının Bağışıklık Sistemine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği ABD. Doktora Tezi. Isparta.
- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. *Techniques in Fish Immunology*, 1, 101-103.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 291-308.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L., Jeney, Z. (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 669-676.
- Goda, A. (2008). Effect of dietary Ginseng herb (Ginsana® G115) supplementation on growth, feed utilization, and hematological indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(2), 205-214.
- Gorbach, S. L. (2001). Antimicrobial use in animal feed-time to stop. *N. Engl. J. Med.*, 345, 1202-1203.
- Hermann, J.R., Honeyman, M.S., Zimmerman, J.J., Thacker, B.J., Holden, P.J., Chang, C.C. (2003). Effect of dietary on viremia and performance in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 81(9), 2139-2144.
- Hoffmann, R., & Lommel, R. (1984). Effects of repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 24(3), 245-251.
- Irianto, A., Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11), 633-642.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.
- Keser, O., Bilal, T. (2008). Beta-glukanın hayvan beslemede bağışıklık sistemi ve performans üzerine etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5(2), 107-119.
- Kocabatmaz, M., Ekingen, G. (1982). Değişik tür balıklarda kan örneği alınması ve hematolojik metotların standardizasyonu. Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje No: VHAG-557, 72s.
- Lin, Z. B., & Zhang, H. N. (2004). Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 1387-1395.
- Ndong, D., Fall, J. (2011). The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research*, 3(1), 1-9.
- Pratheepa, V., Sukumaran, N. (2014). Effect of *Euphorbia hirta* plant leaf extract on immunostimulant response of *Aeromonas hydrophila* infected *Cyprinus carpio*. *PeerJ Journal*, 2, e671.
- Sahu, S., Das, B.K., Mishra, B.K., Pradhan, J., Sarangi, N. (2007). Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(1), 80-86.
- Santos, Y., Bandin, I., Nunez, S., Gravningen, K., Toranzo, A. E. (1991). Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *Journal of Fish Diseases*, 14(3), 407-411.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (2004). Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, s: 299. ISBN: 9754830282.
- Seeley, K.R., Gillespie, P.D., Weeks, B.A. (1990). A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Marine Environmental Research*, 30(1), 37-41.

- Tanyer, G. (1985). Hematoloji ve Laboratuvarı. Ders Kitabı. Ankara Ayyıldız A.Ş.. 442s.
- Terzioğlu, S. (2012). Bazı tıbbi bitki türlerinin gökkuşacağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum) spesifik olmayan bağışıklık sistemi ve büyüme performansı üzerine etkisi. SDU Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Terzioğlu, S., Diler, Ö. (2016). Adaçayı (*Salvia officinalis* L.), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.), yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L.) ve ekinezyanın (*Echinacea angustifolia* Hell) gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) spesifik olmayan bağışıklığa ve *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna etkisi. *Süleyman demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 12(2), 110-118.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493-499.
- Treves-Brown, K.M. (2000). Applied fish pharmacology, Aquacultures series 3, Kluwer Academic Publishers, 309pp.
- Uluköy, G., Baba, E., Mammadov, R. (2009). Çipura Balığına (*Sparus aurata* L. 1758) Uygulanan Geofit Bitki Ekstraktlarının (*Muscari comosum* (L.) Mill., *Urginea maritima* (L.) Baker) Bazı Kan Parametreleri Üzerine Etkisi. 15. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu Bildiri Özetleri, Rize Üniversitesi. 01-04 Temmuz 2009, Rize.
- Xiang, X., Zhou, X.H. (2000). Application effect of Chinese herb medicine to aquatic animal feeds. *Cereal Feed Index*, 3, 27-29.