

Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliğinde Görülen Spiro-nucleosis Enfeksiyonlarının Tedavisinde *Artemisia campestris* (L)'in Kullanımı*

Öznur DİLER**, Öznur GÖRMEZ, Sedef TERZİOĞLU, Halit BAYRAK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta.

Geliş : 20.03.2018

Kabul : 24.05.2018

Araştırma Makalesi / Research Paper

** Sorumlu Yazar: oznurdiler@sdu.edu.tr

E.Dergi ISSN: 1308 -7517

DOI: [10.22392/egirdir.407905](https://doi.org/10.22392/egirdir.407905)

Özet

Bu çalışmada, *Artemisia campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktının yavru gökkuşığı alabalıklarında görülen Spiro-nucleosis (Hexamitiasis) enfeksiyonları üzerine *in vivo* antiparazitik aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ortalama ağırlıkları 1,5-2,0 g olan enfekte gökkuşığı alabalıklarına, 1,0, 1,5, 2,0 2,5 ve 3,0 g/kg oranlarında bitki ekstraktı ilaveli yemlerle 7 gün ve 21 gün periyotlarda tedavi uygulaması yapılmıştır. *A. campestris* (L) etanol ekstraktının GC-MS ile analizlenmesi sonucunda major bileşenleri; acenaphthylene 1,2-dihydro (%62,70), n-octadecane (%4,66), capillin (%4,95), curcumene (%4,45), 2,4-pentadiynylbenzene (%7,28), benzaldehide (%2,53), methacrolein (%1,35) olarak tespit edilmiştir. Tedavi uygulaması sonunda elde edilen sonuçlara göre, deney gruplarında ve pozitif kontrol grubunda kümülatif mortalitenin negatif kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Enfeksiyonun yoğunluğu ve oranı üzerine 21 günlük tedavi uygulamasının 7 günlük uygulamadan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarımızda, *A. campestris* (L) ekstraktının gökkuşığı alabalıklarında *Spiro-nucleus salmonis*'e karşı antiparazitik etki sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler *Artemisia campestris*(L), *Spiro-nucleus salmonis*, *Oncorhynchus mykiss*, antiparaziter, tedavi.

Use of *Artemisia campestris* (L) on Treatment of Spiro-nucleosis Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract

The aim of the present study was to determine the *in vivo* antiparasitic activity of the *Artemisia campestris* (L) ethanol extracts for control of Spiro-nucleosis (Hexamitiasis) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Treated rainbow trout with an average weight of 1.5-2.0 g, were fed with 7 and 21-day periods with the addition of plant extracts of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 g / kg. The composition of ethanol extract of *A. campestris* (L) was analyzed by GC-MS and the major components were acenaphthylene 1,2-dihydro (62.70%), n-octadecane (4.66%), capillin (4.95%), curcumene (4.45%), 2,4-pentadiynylbenzene (7.28%), benzaldehyde (2.53%), methacrolein (1.35%). The results of the present study showed that cumulative mortalities were decreased in all treatment groups and positive control, compared to the negative control ($p<0,05$). It was determined that 21-day treatment was more effective than 7-day treatment on the intensity and prevalence of infection. These results suggested that the ethanol extract of *A. campestris* (L) displayed the antiparasitic activity against *S. salmonis*.

Keywords: *Artemisia campestris* (L), *Spiro-nucleus salmonis*, *Oncorhynchus mykiss*, antiparasitic, treatment.

*Bu çalışma '21A0017' numaralı TÜBİTAK 1002 projesi tarafından desteklenmiştir.

GİRİŞ

Su ürünleri endüstrisinde üretimdeki artışla birlikte ekonomik kayıplara neden olan enfeksiyöz hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Diler ve Özen, 2002; Okmen vd., 2012; Diler vd., 2012; Ogut ve Parlak, 2014; Diler vd., 2014; Diler vd., 2017a; Diler vd., 2017b). Kültür balıkçılığında görülen hastalıkların %19,4'ünün paraziter etkenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Woo, 1999).

Spironucleosis, alabalık çiftliklerinde ciddi mortalitelere sebep olan protozoan paraziter bir hastalıktır. Epizootik karakter gösteren bu hastalık 2002 yılında ülkemizde Karadeniz bölgesinde bulunan alabalık çiftliklerinde %32'lere varan bir mortalite göstermişken 2007 yılında Marmara bölgesinde %20 mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir. Hastalığın balık çiftliklerinde özellikle Aralık ayından Ağustos ayına kadar görülmesi mümkündür (Ogut ve Akyol, 2005; Timur vd., 2009; Balta ve Dengiz Balta, 2018). Parazitin üreme periyodu enfeksiyonun akut döneminde hızlı ve kısa iken, kronik formunun ilkbahar ve sonbahar arasında geniş bir dönemde görülmesi mortalitelerin yıl boyunca ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Pandey, 2013).

Spironucleosis enfeksiyonlarının etkeni olan *Spironucleus salmonis* (Diplomonadida : Hexamitidae), tatlı sularda genç alabalıklarda ve denizde Atlantik salmonların bağırsaklarından izole edilen bir türdür (Kayış vd., 2009; Poynton vd., 2007).

Balıklarda görülen *Spironucleus* cinsinde yer alan parazitler önceden *Hexamita* olarak tanımlanmıştır. Ancak elektron mikroskopik ve rRNA genlerinin sekans analizi ile yapılan moleküler araştırmalar ile yeni bir düzenleme yapılmıştır. Tatlı su balıklarında görülen türler ise *S. salmonis* (gökkuşuğu alabalığı) ve *S. vortens* (Cichlid) olarak bildirilmiştir (Poynton vd., 2007). *S. salmonis*, oval şekilli ve hızlı hareketleri ile dikkati çeken flagellalı bir parazit olup yaklaşık 14 µm boy ve 6 µm en ölçülerindedir (Francis-Floyd ve Yanong, 2015). Balıklarda letarji, anoreksiya, yalancı feçes ve renk koyuluğu dışında herhangi bir dış belirti görülmemekle birlikte viral ve bakteriyel enfeksiyonlar tarafından oluşturulan herhangi bir belirtiyeye de rastlanılmamaktadır. Hastalığın oluşumu ve yayılmasında etkili olan faktörler belirsiz olmakla beraber yetersiz beslenme, diyetteki değişiklik, sudaki düşük oksijen içeriği ya da bu faktörlerin birlikte etkisi parazitin oluşumunu ve yoğunluğunu etkilemektedirler (Ogut ve Akyol, 2005; Timur vd., 2009; Balta ve Dengiz Balta, 2018). Enfeksiyonların tedavisinde dimetridazol ve metronidazol 50 mg/kg dozunda oral olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte metronidazolün DNA ve hücre yapısı üzerinde zararlı etkilere sahip olması nedeniyle su ürünleri alanında Avrupa birliği ülkelerindeki kullanımı 613/98 sayılı direktif ile yasaklanmıştır. Hexamitiosis enfeksiyonlarının tekrarlanma olasılıkları ve tedavilerinde kullanılan kimyasal ve ilaçların insan ve çevreye güvenli olması gerekliliği tedavide alternatif bileşenlerin araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Artemisia cinsi Asteraceae (Compositae) familyasının bir üyesi olup Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika' da dağılım göstermektedir. Bu grupta yer alan bitki türleri uçucu yağ, terpen, fenolik aromatik ve alifatik bileşenlere sahip olması nedeniyle tıbbi ve aromatik bitki olarak değerlendirilmektedir (Kordali vd., 2005; Basta vd., 2007; Bora ve Sharma, 2010; Abad vd., 2012). *Artemisia* türleri antibakteriyel, antiparaziter, antiviral, antifungal, antioksidant, antimalarial olup hepatitis, kanser ve inflamasyona karşı etkisi olduğu tespit edilmiştir (Gurib-Fakim, 2006; Abad vd., 2012). *A. campestris* (L) bitki türü ülkemizde Isparta ve Kayseri'de yaygın olarak bulunan aromatik, çiçekli ve çok yıllık bir bitkidir. Bu

bitkinin antiparaziter, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal ve antiromatizmal özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Abad vd., 2012).

Tıbbi bitkilerin protozoan parazitlere karşı etkileri konusunda çeşitli araştırmalar mevcuttur. Moon vd. (2006), *Lavandula uçucu yağının paraziter balık patojeni Hexamita inflata*'ye karşı %0,1 konsantrasyonunda, antiparaziter etkisini tespit etmişlerdir. Yi vd. (2012), *Carassius auratus*'da *Ichthyophthirius multifiliis* parazitine karşı *Magnolia officinalis* ve *Sophora alopecuroides* bitkisi metanol ekstraktının antiparaziter etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Tıbbi bitkilerin metazoan parazitlere karşı etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda ise Huang vd. (2013), *Dactylogyrus intermedius* parazitine karşı bazı bitkisel ekstraktların antihelmintik etkisini incelemişler ve *Caesalpinia*, *Lysima*, *Cuscuta*, *Artemisia*, *Eupatorium* bitkilerinin 125, 150, 225, 300 ve 500 mg/l oranında 48 saat süre ile kullanımının %100 antihelmintik etkisi olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Lu vd. (2012), *Dactylogyrus intermedius* parazitine karşı *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, *Polygala tenuifolia* bitkilerinin etkisini incelemişler ve *Dryopteris* bitkisinin 22-97 mg/l konsantrasyonunda 48 saat sonra %100 etkili olduğu diğer bitkilerinde metanol ekstraktlarının akuakültürde tedavi için kullanılma potansiyeli taşıdığını belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada, Millet vd. (2011), *Spironucleus vortens*'e karşı *Allium sativum*'dan elde edilen alicin türevinin parazite karşı inhibitör etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Artemisia cinsine ait bitki türlerinin balıklarda patojen parazitlere karşı tedavi dozu ile ilgili herhangi bir araştırmanın bulunmaması nedeniyle bu araştırma ile yavru dönemde gökkuşağı alabalığı üretiminde ciddi kayıplara neden olan Spironucleosis etkeni *S. salmonis* patojenine karşı *A. campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktlarının *in vivo* antiparaziter etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Aksu bölgesindeki alabalık çiftliklerinde Ocak-Şubat aylarında görülen doğal Spironucleosis enfeksiyonları ile enfekte yavru gökkuşağı alabalıklarının barsak dokuları mikroskop altında incelenmiştir. Gökkuşağı alabalıklarında barsağın son bölümüne yakın bir kısımdan hazırlanan preparattan oval şekilli ve hızlı hareketleri ile dikkati çeken 400x büyütme ışık mikroskobu ile incelenen flagellalı parazit yaklaşık 14 µm boy, 6 µm en ölçülerinde *Spironucleus salmonis* olarak teşhis edilmiştir (Poynton vd., 2007; Francis-Floyd ve Yanong, 2015). 200 adet balığın incelenmesi sonucunda %80 enfekte oranı tespit edilmiş havuzlardan seçilen yavru gökkuşağı alabalıkları Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Araştırma ve Uygulama tesisine 1/3 su, 2/3 oksijen olacak şekilde ayarlanan polietilen poşetlerle taşınmıştır. Araştırmada *S. salmonis* paraziti ile doğal enfekte olan ortalama ağırlıkları 1,5-2 g arası yavru gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) her grup için 50 adet olmak üzere 3 tekrardan oluşacak şekilde 400 lt'lik yuvarlak fiberglas tanklara yerleştirilmiş ve toplamda 2100 adet balık kullanılmıştır. Araştırma 7 gün ve 21 gün olmak üzere 2 farklı sürede sürdürülmüştür. Tanklardaki yem artıkları su kalitesinin bozulmaması için sifon yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Araştırmada kullanılan artezyen suyunun debisi 12 lt/dk, tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı 12±2°C, pH'sı 7,3 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 7,4 mg/lt olarak ölçülmüştür.

Araştırmada kullanılan *A. campestris* (L) (Şekil 1) bitki türü aktardan satın alınarak temin edilmiş ve Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK tarafından tanımlanmıştır.



Şekil 1. *A. campestris* (L) (Anonim I, II)

Bitkinin etanol ekstraktı, 15 g kuru bitki örneği 150 ml etanolde 2 gün süre ile tutulduktan sonra süzme işlemi için whatman no1 filtre kâğıdından geçirilerek su banyosunda buharlaştırma işlemi yapıldıktan sonra elde edilmiştir. Etanol ekstraktının ana bileşenleri yönünden kimyasal yapısı Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Araştırma Laboratuvarındaki Gaz kromatografisi cihazıyla (GC/MS aparatı kullanılarak) belirlenmiştir. Cihazın çalışma koşulları Tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1. Gaz Kromatografisi çalışma şartları

Kullanılan cihaz	Shimadzu (japan) gc -2010 plus / Shimadzu gcms-qp2010 se (dedektör)
Enjeksiyon bloğu	250°C
Dedektör	250°C
Akış hızı (ml/dakika)	1,61
Dedektör	70 Ev
İyonlaştırma türü	EI
Kullanılan gaz	Helyum
Kullanılan kolon	Restek rx-5sil ms 30 m 0,25 mm, 0,25 um
Sıcaklık programı	40°C’de 2 dakika bekledikten sonra 250°C’e dakikada 4°C’lik artışla ulaşıyor. 250°C’de 5 dakika bekliyor.
Kullanılan kütüphaneler	Wiley, Nist, Tutor, FFNSC
Spme şartları	Fused silica SPME fiber CAR/PDMS numune 60°C’de fibersiz 15 dakika fiber ile 30 dakika bekletilip 250°C’de desorbe edilir.

A. campestris (L) bitkisinin etanol ekstraktı 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ve 3,0 g/kg oranlarında ticari alabalık yemine ayçiçek yağı (0,05 ml/kg) ile homojenize edilerek spreyleme yöntemi ile ilave edilmiş ve yavru gökkuşuğu alabalıkları günde iki kez vücut ağırlıklarının %3 oranında 7 gün ve 21 gün süreyle beslenmiştir. Negatif kontrol grubundaki balıklar ticari alabalık yemiyle vücut ağırlığının %3’ü oranında, pozitif kontrol grubundaki balıklar ise 0,5 mg/kg Metronidazole ilave edilmiş alabalık yemiyle beslenmiştir.

Besleme süresinin sonunda gökkuşuğu alabalıklarının yaşama oranları balıkların hayatta kalma yüzdesi (RPS=Relative Percent Survival)’ ne göre değerlendirilmiştir (Santos, 1991).

$RPS = [1 - (A. campestris (L) \text{ etanol ekstraktları ile beslenen gruptaki mortalite } (\%) / \text{Kontrol grubundaki mortalite } (\%))] \times 100$

Kümülatif mortalite değeri ise gruptaki balık sayısı ve ölü balık sayısının %'si alınarak belirlenmiştir (Puk vd., 2014).

Beslemenin 3, 7, 11, 15, 18 ve 21. günlerinde ise Tojo ve Santamarina (1998)'ya göre bağırsakta ve feçeste bulunan parazitler sayılarak parazit yoğunluğu tespit edilmiştir (Ogut ve Akyol, 2005). Bu amaçla balıklar fenoksietanol (0,1-0,5 ml/l) ile bayıldıktan sonra feçes ve bağırsak içeriklerinden hazırlanan lam lamel preparatları mikroskop altında 400x büyütmede incelenmiştir. Değerlendirmede; mikroskopik alanda 50 adetten fazla parazite rastlanırsa 4 puan (yüksek (+++)), 3 puan (10-50 adet arası orta (++)), 2 puan (1-10 adet arası düşük (+)), 1 puan (1 adetse minimal (+/-)), hiç parazite rastlanmazsa sıfır puan (-) olarak yorumlanmıştır.

Denemede elde edilen veriler SPSS 16.0 paket programında Anova testi (Duncan çoklu karşılaştırma testi) ile değerlendirilmiştir (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Denemede incelenen çeşitli parametrelerin önem derecelerini karşılaştırırken sonuçlar ortalama değer ve standart sapma olarak verilmiştir. Önem düzeyi $P < 0,05$ olarak seçilmiştir (Özdamar, 2001).

BULGULAR

Artemisia campestris (L) GC-MS Analiz Sonuçları

Bu araştırmada *A. campestris* (L) bitki ekstraktının kimyasal kompozisyonunda 48 farklı bileşen elde edilmiş olup polisiklik aromatik hidrokarbon olan acenaphthylene, 1,2-dihydro (%62,70), alkan hidrokarbon olan n-octadecane (%4,66), capillin (%4,95), curcumene (%4,45), 2,4-pentadiynylbenzene (%7,28), benzaldehyde (%2,53), methacrolein (%1,35)'in ana bileşenler olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *A. campestris* (L) bitki ekstraktının kimyasal kompozisyonu

R. Time	Bileşen	%
1.428	Methacrolein	1,35
1.619	2-methylfuran	0,19
1.881	2- butenal	0,16
3.741	2- butenal, 3-methyl-	0,49
4.103	Hexanal	0,39
6.663	2,4,6- octatriene, all-trans	0,11
8.979	2-heptenal	0,74
9.084	Benzaldehyde	2,53
10.415	z-6—nonenal	0,49
10.989	2,4 heptadienal	0,11
11.478	p-cymene	0,18
12.537	2-octene, 2-methyl-6-methylene	0,12
12.965	Acetophenone	0,37
13.227	Propanedioic acid, diethyl ester	0,12
13.987	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylpropyl)	0,24
14.610	Nonanal	0,36
14.715	Benzene, 1- methyl-4-(1-methylpropyl)	0,44
16.692	Nonenal	0,11
17.044	Benzoic acid, ethyl ester	0,19
17.555	p-methylacetophenone	0,19

17.987	1-dodecene	0,20
19.572	Cis-3-hexenyl valerate	0,16
20.509	Dec-2-(e)-enal	0,20
21.310	2,4-pentadiynylbenzene	7,28
22.671	Tiglate 3(z)-hexenyl	0,29
23.011	Patchoulene beta	0,29
23.697	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylpropyl)	0,18
24.486	Copaene	0,19
24.930	2-phenyl-1,3-cyclohexadiene	0,61
25.150	1-tetradecene	0,49
25.311	Benzenebutanal,gamma, 4-dimethyl	0,60
27.791	Cadinene gamma	0,24
28.030	Curcumene	4,45
28.224	Beta-selinene	0,47
28.863	Acenaphthylene, 1,2 -dihydro	62,70
29.005	Isolongifolen, 4,5,9,10- dehydro	0,18
29.097	cadinene<gamma>	0,17
29.255	cadinene<delta>	0,25
29.339	3-tert-butyl-1,2-dihydronaphthalene	0,17
29.460	Anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1-methyl	0,16
31.000	(-)-spathulenol	1,18
31.149	(-)-caryophyllene oxide	0,13
31.264	Cembrene	0,10
31.465	Salvial-4(14)-en-1-one	0,37
31.562	1-hexadecene	0,19
32.391	Capillin	4,95
39.707	z-5-nonadecene	0,26
40.259	n-octadecane	4,66
		100,00

A. campestris (L)'in Gökkuşığı Alabalıklarında Yaşama Oranı (RPS) ve Kümülatif Mortalite Üzerine Etkisi

Araştırma bulgularına göre *A. campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktları ile 7 ve 21 gün süre ile beslenen balıklarda kümülatif mortalitenin (%) pozitif kontrol grubu ile benzer olarak önemli ölçüde azaldığı ve yaşama oranlarının arttığı belirlenirken en yüksek mortalitenin negatif kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3. *A. campestris* (L) etanol ekstraktının enfekte gökkuşığı alabalıklarında nispi hayatta kalma oranı (RPS) ve kümülatif mortalite üzerine etkisi

<i>A. campestris</i> (L)	Kümülatif mortalite (%)		RPS	
	7. gün	21. gün	7. gün	21. gün
1,0 g/kg	0,67±0,66 ^a	5,34±1,33 ^{ab}	87,50	39,59
1,5 g/kg	3,34±0,66 ^{ab}	7,34±0,66 ^{ab}	29,17	18,75
2,0 g/kg	1,34±1,33 ^a	4,67±2,00 ^{ab}	75,00	45,84
2,5 g/kg	1,33±0,00 ^a	2,67±2,66 ^a	70,84	66,67
3,0 g/kg	2,00±0,68 ^{ab}	7,33±2,00 ^{ab}	58,34	16,67
Pozitif kontrol	2,00±0,67 ^{ab}	4,00±0,00 ^{ab}	58,34	56,25
Negatif kontrol	4,67±0,69 ^b	9,34±1,33 ^b	-	-

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki bakımdan önemlidir ($p<0,05$)

A. campestris (L)'in Gökkuşığı Alabalıklarının Sindirim Kanalındaki Parazit Sayısı Üzerine Etkisi

Araştırmanın 3, 7, 11, 15, 18 ve 21. günlerinde *A. campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktları ile beslenen enfekte gökkuşığı alabalıklarının barsak lümeninde bulunan parazitler, ışık mikroskobunda 400x büyütme objektif yardımı ile sayılarak parazit yoğunluğu tespit edilmiştir. *A. campestris* (L)'in 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ve 3,0 g/kg oranları ile beslenen gruplarında 7. günde antiparazitik etki göstermediği 21. günde negatif kontrole göre etkili olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4, 5).

Tablo 4. 7. günde *A. campestris* (L) bitki ekstraktının enfekte gökkuşığı alabalıklarındaki enfeksiyon yoğunluğu (intensite) ve enfeksiyon oranı (prevalans) üzerine etkisi

<i>A. campestris</i> (L)	7. gün Enfeksiyon yoğunluğu (intensite)	Canlı kalan balık sayısı toplamı	Enfekte balık sayısı	Enfeksiyon oranı (prevalans)%
1,0 g/kg	++	149	130	87,24±2,04 ^b
1,5 g/kg	+++	145	135	93,10±1,55 ^a
2,0 g/kg	++	148	130	87,83±1,06 ^b
2,5 g/kg	++	148	139	93,91±1,13 ^a
3,0 g/kg	+	147	139	94,55±1,26 ^a
Pozitif kontrol	+	147	95	64,62±1,51 ^c
Negatif kontrol	+++	143	127	88,81±0,93 ^b

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki bakımından önemlidir ($p<0,05$)

Tablo 5. 21. günde *A. campestris* (L) bitki ekstraktının enfekte gökkuşığı alabalıklarındaki enfeksiyon yoğunluğu (intensite) ve enfeksiyon oranı (prevalans) üzerine etkisi

<i>A. campestris</i> (L)	21. gün Enfeksiyon yoğunluğu (intensite)	Canlı kalan balık sayısı toplamı	Enfekte balık sayısı	Enfeksiyon oranı (prevalans)%
1,0 g/kg	+	142	70	49,29±1,22 ^b
1,5 g/kg	+	139	65	46,76±3,04 ^{bc}
2,0 g/kg	+	143	66	46,15±1,99 ^c
2,5 g/kg	+	146	60	41,09±1,88 ^d
3,0 g/kg	+	139	55	39,56±0,96 ^d
Pozitif kontrol	+/-	144	10	6,94±0,10 ^e
Negatif kontrol	+++	136	136	100,00±0,00 ^a

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki bakımından önemlidir ($p<0,05$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde tıbbi bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, tedavilerde kullanılan ilaçların bir bölümünü oluşturmaktadır. Sentetik yapılı metronidazol gibi bazı kimyasalların sitotoksik ve mutagenik zararlı etkilerinin ortaya çıkması sonucu kullanımlarına sınırlama getirilmesi veya yasaklanması, enfeksiyöz parazitler etkenlerle mücadelede kullanılacak doğal, güvenilir ve ekonomik yeni ürünlerin kullanılma zorunluluğunu arttırmıştır. Bu nedenle akuakültürde balık patojenleri ile mücadele amacıyla tıbbi bitkilerin antiparazit

etkileri konusunda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Chitmanat vd., 2004; Moon vd., 2006; Aboud, 2010; Kumar vd., 2012 a,b; Gholipour-Kanani vd., 2012; Gholipour-Kanani vd., 2012).

Puk vd. (2014), *Spironucleus salmonis* enfeksiyonu için *Ichthio Hexan* (*Allium sativum*, *Chelidonium majus*, *Origanum vulgare*, carvacrol ve cinnamic aldehit ekstraktları)'ın etkinliğini incelemişlerdir. Bu amaçla, doğal enfekte yavru balıklar 0,1 ve 1 ml/kg oranlarında *Ichthio Hexan* ilaveli yem ile 38 gün süresince beslenmişlerdir. Enfeksiyonun prevelansı ve yoğunluğunun tespiti için barsak içeriği incelenmiş ve 0,1 ml/kg oranında kullanılan *Ichthio Hexan*'ın balıklarda mortaliteyi azalttığı tespit edilmiştir. *S. salmonis* trafozoitleri 38 günün sonunda önemli ölçüde azalmış, parazit sayısının posterior barsakta sınırlı sayıya indiği tespit edilmiştir. 1 ml/kg oranında kullanılan *Ichthio Hexan*'ın ise yüksek doz olması nedeniyle balıklarda mortaliteyi artırdığı ve kontrol grubuyla aynı olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise *Artemisia annua* ekstraktı olan artemisinin *H. longifilis* balık türündeki monogenean parazitlere karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Ekanem ve Brisibe, 2010). Oriakpono vd. (2012), *Artemisia annua*'nın *Saratherodon melanotheron* balık türünde monogenean parazite karşı etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla *A. annua* bitkisi ekstraktları 5, 10, 20, 40, 80 mg/L konsantrasyonlarında kullanılmış ve kontrol amacıyla kullanılan 2 mg/l paraziquental ile mukayese edilmiştir. *A. annua*'nın terpenoidler, flavonoidler, comerinler ve uçucu yağlar içerdiği belirlenmiş olup araştırmada 80 mg/l dozunda hazırlanan bitki ekstraktının etkili doz olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, *A. annua* ekstraktı ile yapılan tedavi uygulamalarında balıklarda herhangi bir toksik etki görülmemiştir. Moon vd. (2006), yapmış oldukları bir çalışmada *Lavandula* uçucu yağının balık patojenlerinden *Hexamita inflata*'ye karşı antiparaziter etkilerini incelemişlerdir. *Lavandula* uçucu yağının %0.1 konsantrasyonunda, *H. inflata*'ye karşı etkili olduğunu bulmuşlardır.

Bu araştırmada ise *S. salmonis* paraziti ile doğal enfekte olan yavru gökkuşuğu alabalıklarında *A. campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktları yemlere ilave edilmiş ve 3, 7, 11, 15, 18 ve 21. günlerde parazitin barsak lümenindeki sayıları incelenerek enfeksiyonun yoğunluk ve oranı aynı zamanda balıkların hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile mukayese edildiğinde *A. campestris* (L) bitki ekstraktının *S. salmonis* paraziti üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca parazite karşı tedavide uzun süreli uygulamanın (21 gün) kısa süreye (7 gün) göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Araştırma bulgularına göre 21. günde *A. campestris* (L) bitkilerinin etanol ekstraktları ile beslenen balıklarda hayatta kalma oranlarının arttığı belirlenirken en yüksek mortalitenin negatif kontrol grubunda olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen bulgular Moon vd. (2006), Oriakpono vd. (2012), Puk vd. (2014)'nın sonuçlarını desteklemiştir.

Bu araştırmadan elde ettiğimiz sonuçlar *Artemisia* türlerinin balıklarda enfeksiyon etkeni *Hexamita* üzerinde antiparaziter etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Tıbbi bitkilerin uçucu yağ ve ekstraktları farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Terpenoidler *Artemisia* cinsinde en çok incelenen metabolitler olup antiseptik, bakterisid, fungisid, pestisid ve insektisid özellik gösterdikleri ve immunostimulant, antioksidant, antiinflamator, antistress, antikanserojen, diüretik etkileri bulunmaktadır (Mercier vd., 2009). *Artemisia* grubunda farklı coğrafik orjinlerden gelen bitki örneklerinin farklı fitokimyasal özellik gösterdiği bildirilmektedir (Abad vd., 2012).

Bu araştırmada ise *A. campestris* (L) bitkisi etanol ekstraktının kimyasal kompozisyonunda 48 farklı bileşen elde edilmiş olup polisiklik aromatik hidrokarbon olan acenaphthylen 1,2–dihydro'nun (%62,70) major bileşen olduğu ayrıca diğer bileşenler olarak, n-octadecane (%4,66), capillin (%4,95), curcumene (%4,45), 2,4-pentadienylbenzene (%7,28), benzaldehyde (%2,53), methacrolein (%1,35)'in de bulunduğu tespit edilmiştir. Bellomaria vd. (2001) İtalya'da yaptıkları bir çalışmada *Artemisia variabilis* türünde major bileşen olarak %73 oranında acenaphthylen 1,2–dihydro'nun tespit etmişler ve bu kimyasalın varlığını bitkinin substrat kirlenmesi meydana gelmiş bir ekolojik ortamda yetişmesi ile izah etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da söz konusu bileşenin antimikrobiyal etkisinin olmadığı diğer bileşenler olan n-octadecane (%4,66), capillin (%4,95), curcumene (%4,45) bileşenlerinin antimikrobiyal etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Whelan ve Ryan, 2004; Abubacker ve Devi, 2015). Ayrıca, Ghorab vd. (2013) tarafından yapılan bir araştırmada hidrodistilasyon yolu ile elde edilen *A. campestris* (L) uçucu yağının bileşenleri GC/MS ile analizlenmiş ve 47 farklı bileşenden beta myrsen (%16,47), alfa pinen (%14,18), trans-Beta ocimene (%12,61), beta cymene (%8,15) ve kamfor (%5,85)'ün yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir. Belhattap vd. (2011), *A. campestris* (L) uçucu yağ kompozisyonunu incelemişler, α -terpenyl acetate (%19), α -pinene (%18), camphor (%9), camphene (%8), limonene (%5) ve borneol (%5) bileşenlerini tespit etmişlerdir. Akrouit vd. (2001), Tunus'un Güney doğusundan 4 farklı bölgeden *A. campestris* (L)'in uçucu yağlarını analiz etmişler ve her bir örnekte 13 ile 15 bileşen tanımlamışlardır. Major bileşen olarak β -pinene (%24,2-27,9), *p*-cymene (%17,4-22,3) ve α -pinene (%4,1-11,0) tespit etmişlerdir. Bu araştırmada *A. campestris* (L) bileşenleri Akrouit vd. (2001), Belhattap vd. (2011), Ghorab vd. (2013)'den farklı olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda ilk kez ülkemizde bulunan tıbbi bitki türü olan *A. campestris* L. bitkisi etanol ekstraktının balık patojenlerine karşı tedavideki etkin dozları incelenmiş olup, parazite karşı tedavide uzun sürenin (21 gün) kısa süreye (7 gün) göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu araştırma ile *Spironucleus* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif bir uygulama imkânı sağlanmıştır.

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.
- About, O.A. (2010). Application of some Egyptian medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. and *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Researcher*, 2(10), 12-16.
- Abubacker, M.N., & Devi, P.K. (1779). *In vitro* antifungal efficacy of bioactive compounds heptadecane, 9-hexyl and octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl) from *Lepidagathis cristata* willd. (Acanthaceae) root extract. *European J of Pharmaceutical and Medical Res*, 2(5), 2015.
- Akrouit, A., Chemli, R., Chreïf, I., & Hammami, M. (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour and fragrance journal*, 16(5), 337-339.
- Anonim, I. "Artemisia campestris (L)" Wikipedia. Erişim Tarihi: 12.01.2015.
- Anonim, II. "Artemisia campestris (L)" Wikipedia. Erişim Tarihi: 20.05.2018.
- Balta, F., & Dengiz Balta, Z. (2018). Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen hexamitozis'in tanı ve tedavisi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 4-8.
- Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M., & Pavlović, M. (2007). Chemical composition of *Artemisia absinthium* L. from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 19(4), 316-318.

- Belhattab, R., Boudjouref, M., Barroso, J.G., Pedro, L.P., & Figueirido, A.C. (2011). Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 429-433.
- Bellomaria, B., Valentini, G., & Biondi, E. (2001). Chemotaxonomy of *Artemisia variabilis* Ten. and *A. campestris* L. ssp. *glutinosa* (Ten.) Briq. et Cavill. (Asteraceae) from Italy. *Journal of Essential Oil Research*, 13(2), 90-94.
- Bora, K.S., & Sharma, A. (2010). Phytochemical and pharmacological potential of *Artemisia absinthium* Linn. and *Artemisia asiatica* Nakai: a review. *J. Pharm. Res.*, 3, 325-328.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., & Nunsong, W. (2005). The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, 27(Suppl 1), 359-64.
- Diler, Ö., & Özen, M.R. (2002). Eğirdir Gölünde ağ kafeslerde kültüre alınan aynalı sazamlarda görülen epidermal papillomanın histopatolojisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 26, 1207-1211.
- Diler, Ö., Özçelik, H., Kubilay, A., Özkan, G., Didinen, B.I., Koca, S.B., Yiğit, N.Ö., Metin, S., İzci, L., Erdoğan, Ö., & Görmez, Ö. (2012). Gökkuşuğu alabalığı anaç ve yumurtalarında enfeksiyona neden olan *Saprolegnia* spp. karşı bazı doğal bitkisel ürünlerin antifungal etkileri. TAGEM-10 /AR-GE/21.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, A., & Metin, S. (2014). Antimicrobial activity of *Origanum onites* L. on protection against *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aqua Cyprus 2014, 1st International Symposium on AquaticSciencesandTechnology, 15-17 May, Girne, Cyprus, 22.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. (2017a). 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.
- Diler, Ö., Görmez, Ö., Metin, S., İlhan, İ., & Diler, İ. (2017b). *Origanum vulgare* L. uçucu yağının gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda büyüme, lizozim ve antioksidan aktivite ve *Vibrio anguillarum*'a karşı direnç üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 13(1), 42-57.
- Ekanem, A.P., & Brisibe, E.A. (2010). Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitology Research*, 106(5), 1135-1139.
- Francis-Floyd, R., & Yanong, R.P.E. (2015). *Spironucleus* infestations (Spironucleosis) in freshwater aquarium fish. University of Florida IFAS Extension, <http://edis.ifas.ufl.edu/wm053>.
- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J., & Taheri, A. (2012). Influence of garlic (*Allium sativum*) and mother worth (*Matricaria chamomilla*) extract on *Ichthyophthirius multifiliis* parasite treatment in Sail Fin Molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. *APCBEE Procedia*, 4, 6-11.
- Ghorab, H., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z., & Kabouche, Z. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5(2), 189-192.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- Huang, A.G., Yi, Y.L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q.Z., & Wang, G.X. (2013). Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 112(12), 4065-4072.
- Kayış, Ş., Özçelep, T., Çapkın, E., & Altınok, İ. (2009). Protozoan and metazoan parasites of culture fish in Turkey and their applied treatments. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61(2), 93-102.

- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakır, A., Ala, A., & Yıldırım, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9452-9458.
- Kumar, A., Raman, R.P., Kumar, K., Pandey, P.K., Kumar, V., Mohanty, S., & Kumar, S. (2012a). Antiparasitic efficacy of piperine against *Argulus* spp. on *Carassius auratus* (Linn. 1758): *in vitro* and *in vivo* study. *Parasitology Research*, 111(5), 2071-2076.
- Kumar, S., Raman, R.P., Kumar, K., Pandey, P.K., Kumar, N., Mohanty, S., & Kumar, A. (2012b). *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of Azadirachtin against *Argulus* spp. in *Carassius auratus* (Linn. 1758). *Parasitology Research*, 110(5), 1795-1800.
- Lu, C., Zhang, H.Y., Ji, J., & Wang, G.X. (2012). *In vivo* anthelmintic activity of *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, and *Polygala tenuifolia* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 110(3), 1085-1090.
- Mercier, B., Prost, J., & Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331-342.
- Millet, C.O., Lloyd, D., Williams, C., Williams, D., Evans, G., Saunders, R.A., & Cable, J. (2011). Effect of garlic and allium-derived products on the growth and metabolism of *Spironucleus vortens*. *Experimental Parasitology*, 127(2), 490-499.
- Moon, T., Wilkinson, J.M., & Cavanagh, H.M. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitology Research*, 99(6), 722-728.
- Ogut, H., & Akyol, A. (2005). Prevalence and intensity of *Hexamita salmonis* in rainbow trout farms in the southeastern black sea and their relationship to environmental factors. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 57(2), 97-104.
- Ogut, H., & Parlak, R. (2014). Hexamitiasis leads to lower metabolic rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) juveniles. *Journal of Fish Diseases*, 37(12), 1013-1020.
- Okmen, G., Ugur, A., Sarac, N. & Arslan, T. (2012). *In vivo* and *in vitro* antibacterial activities of some essential oils of Lamiaceae species on *Aeromonas salmonicida* isolates from cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(15), 2762-2768.
- Oriakpono, O., Aduabobo, H., Awi-Waadu, G.D., & Nzeako, S. (2012). Anti-parasitic effects of methanolic extracts of *Artemisia annua* L. against parasites of *Sarotherodon melanotheron*. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 1(2), 108-116.
- Özdamar, K. (2001). Tıp Biyoloji Eczacılık ve Diş Hekimliği Öğrencileri için SPSS ile Biyoistatistik, Kaan Kitabevi, 452s.
- Pandey, D.G. (2013). Treatment for certain parasitic diseases of fishes. *Universal Journal of Pharmacy*, 2(2), 1-3.
- Poynton, S.L., Sterud, E., Jorgensen, A., & Saghari Fard, M.R. (2007). A Review of Piscine Diplomonads: Updates on *Spironucleus salmonis* et al. IAAAM ARCHIVE.
- Puk, K., Guz, L., & Sopińska, A. (2014). Use of complementary feeding stuff *Ichthio Hexan* to control *Spironucleus salmonis* infections in rainbow trout. *Medycyna Weterynaryjna*, 70(10), 616-619.
- 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.
- Timur, G., Karataş, S., Akayli, T., Ercan, M.D., & Yardimci, R. E. (2009). A histopathological study of Hexamitiasis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 29(3), 104.

- Tojo, J.L., & Santamarina, M.T. (1998). Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. II: *Gyrodactylus* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33(3), 187-193.
- Whelan, L.C., & Ryan, M.F. (2004). Effects of the polyacetylene capillin on human tumour cell lines. *Anticancer Research*, 24(4), 2281-2286.
- Woo, P.T.K. (1999). Fish Diseases and Disorders Volume 1, Protozoan and Metazoan Infections, ISBN 0851988237, 673 p.
- Yi, Y.L., Lu, C., Hu, X.G., Ling, F., & Wang, G.X. (2012). Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 111(4), 1771-1778.